

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Centro de Ciências da Saúde

Faculdade de Medicina

Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias

**ANÁLISE DO RESISTOMA, VIRULOMA E MOBILOMA EM
Enterococcus DE RELEVÂNCIA CLÍNICA: CORRELAÇÕES ENTRE
TOLERÂNCIA A METAIS PESADOS E OUTROS MICROBICIDAS,
DETERMINANTES PLASMIDIAIS E DIVERSIDADE
POPULACIONAL**

CLARA FERREIRA GUERRA

Rio de Janeiro

2025



**ANÁLISE DO RESISTOMA, VIRULOMA E MOBILOMA EM
Enterococcus DE RELEVÂNCIA CLÍNICA: CORRELAÇÕES
ENTRE TOLERÂNCIA A METAIS PESADOS E OUTROS
MICROBICIDAS, DETERMINANTES PLASMIDIAIS E
DIVERSIDADE POPULACIONAL**

CLARA FERREIRA GUERRA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Infectologia.

Orientação: Prof^ª. Dr^ª. Lúcia Martins Teixeira

Dr^ª. Adriana Rocha Faria

**Rio de Janeiro
2025**

FICHA CATALOGRÁFICA

Guerra, Clara Ferreira

Análise do resistoma, viruloma e mobiloma em *Enterococcus* de relevância clínica: correlações entre tolerância a metais pesados e outros microbicidas, determinantes plasmidiais e diversidade populacional/Clara Ferreira Guerra. Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: UFRJ / Faculdade de Medicina, 2025.

119 f.:16 il.; 31 cm.

Orientador: Lúcia Martins Teixeira & Adriana Rocha Faria

Dissertação (Mestrado) - UFRJ, Faculdade de Medicina,

Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, 2025.

Referências Bibliográficas: f. 103

1. *Enterococcus faecium*. 2. *Enterococcus faecalis*. 3. Resistoma e Viruloma. 4. Resistência aos antimicrobianos. 5. Tolerância a metais pesados e microbicidas. 6. Multirresistência. 7. Diversidade populacional. 8. Análises de bioinformática. 9. Doenças Infecciosas e Parasitárias - Dissertação. I. Teixeira, Lúcia Martins. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias. III. Título.


**ANÁLISE DO RESISTOMA, VIRULOMA E MOBILOMA EM *Enterococcus* DE
RELEVÂNCIA CLÍNICA: CORRELAÇÕES ENTRE TOLERÂNCIA A METAIS
PESADOS E OUTROS MICROBICIDAS, DETERMINANTES PLASMIDIAIS E
DIVERSIDADE POPULACIONAL**

Clara Ferreira Guerra


Orientação: Prof^a. Dr^a. Lúcia Martins Teixeira
Dr^a. Adriana Rocha Faria

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Infectologia.


Aprovada em 11/03/2025 por:

Documento assinado digitalmente
 ELIANE DE OLIVEIRA FERREIRA
Data: 05/06/2025 10:14:45-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Eliane de Oliveira Ferreira (Presidente)

Documento assinado digitalmente
 KARLA RODRIGUES MIRANDA
Data: 04/06/2025 13:12:04-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof.^a Dr.^a Karla Rodrigues Miranda

Documento assinado digitalmente
 GABRIELA BERGIANTE KRAYCHETE
Data: 03/06/2025 09:38:36-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr.^a Gabriela Bergiante Kraychete

Rio de Janeiro

Março 2025

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Apoio Biotecnológico do Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPPG), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Lúcia Martins Teixeira e coorientação da Dr^a. Adriana Rocha Faria

AGRADECIMENTOS

Expressar minha gratidão em tão poucas palavras parece tão difícil quanto a realização deste trabalho. No entanto, não poderia deixar de reconhecer e agradecer profundamente às pessoas e instituições que tornaram possível essa jornada, que tantas vezes me pareceu impossível.

À minha mãe, a maior incentivadora da minha educação, obrigada pelo amor incondicional, pelo apoio incansável e por nunca permitir que eu desistisse, mesmo nos momentos mais difíceis. Sem você, nada disso seria possível. Você é simplesmente incrível. Amo você!

Ao Ruan, a pessoa com quem escolhi compartilhar a vida, por estar ao meu lado nos melhores momentos, mas, mais importante ainda, nos piores. Por ter escolhido crescer e aprender comigo o que é amar alguém. Por me apoiar quando tudo que eu tinha eram dúvidas.

À minha orientadora, professora Lúcia Martins Teixeira, por sua orientação, paciência e por abrir as portas do seu laboratório para mim. Por me inspirar todos os dias, mostrando o quão longe uma mulher cientista pode chegar. Sua dedicação e conhecimento foram fundamentais para minha formação.

À minha querida coorientadora, Adriana Faria, por todo o aprendizado, pelos conselhos valiosos e pela ajuda constante ao longo dessa caminhada. Obrigada por tanto.

Ao Vitor, que, mesmo não sendo oficialmente meu orientador, teve um papel essencial na minha trajetória acadêmica e profissional. Mas, mais do que isso, obrigada por ser esse amigo leal, que aceita minha pior versão e me incentiva a ser a melhor. Obrigada pelos longos áudios, pelas conversas intermináveis, pelas *watch parties*, pelos cafés depois do almoço, pelos conselhos profissionais e de vida e por compartilhar tanto conhecimento comigo.

Aos amigos e colegas do Lab 027, que marcaram minha trajetória de alguma forma. Vou sempre guardar vocês com muito carinho na memória.

À minha amiga Victória, por crescer comigo e me mostrar todos os dias que duas pessoas tão opostas podem manter uma amizade inabalável por tantos anos. Não consigo me imaginar sem você ao meu lado. Amo muito você!

A Mariano, Elizabete, Isabela e Mariana, por serem minha família no sentido mais amplo e verdadeiro da palavra. Vocês são essenciais para mim.

E, por fim, aos órgãos de fomento ao ensino e à pesquisa – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), especialmente por meio do projeto Instituto Nacional de Pesquisa em Resistência a Antimicrobianos (INPRA) do programa Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia (INCT), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) –, pelo suporte financeiro fundamental para a realização deste trabalho.

RESUMO

ANÁLISE DO RESISTOMA, VIRULOMA E MOBILOMA EM *Enterococcus* DE RELEVÂNCIA CLÍNICA: CORRELAÇÕES ENTRE TOLERÂNCIA A METAIS PESADOS E OUTROS MICROBICIDAS, DETERMINANTES PLASMIDIAIS E DIVERSIDADE POPULACIONAL

Clara Ferreira Guerra

Orientação: Prof^ª. Dr^ª. Lúcia Martins Teixeira & Dr^ª. Adriana Rocha Faria

Resumo de Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Infectologia.

O gênero *Enterococcus* representa uma importante questão de saúde pública global, devido a sua atuação como agente causador de Infecções Relacionadas a Assistência à Saúde (IRAS) e à sua destacada capacidade de adquirir e transmitir genes de resistência a antimicrobianos e de virulência. A tolerância a compostos não antibióticos, tais como metais pesados e outros microbicidas, também pode contribuir para a manutenção dessas características através de co-seleção. Este estudo investigou, sob uma perspectiva genômica, 110 genomas de *E. faecium* e 60 de *E. faecalis* provenientes de amostras isoladas de pacientes hospitalizados no Rio de Janeiro. Os genomas, sequenciados por WGS, foram anotados e analisados quanto ao resistoma (antimicrobianos, microbicidas e metais pesados), viruloma, mobiloma e plasmidoma, além da estrutura populacional e das relações filogenéticas (MLST e Máxima Verossimilhança). A análise do resistoma identificou 23 genes, destacando o operon *vanHAX* e o gene *aac(6')-aph(2'')* que codifica a enzima bifuncional de resistência aos aminoglicosídeos (presentes em >69% dos genomas), enquanto o viruloma compreendeu 19 genes e 4 operons associados à adesão, invasão, formação de biofilme e produção de feromônios. Também foram identificados genes e operons para tolerância a metais (cobre, cádmio, mercúrio) e biocidas (triclosan, clorexidina, cloreto de benzalcônio, acriflavina). Em *E. faecium*, genomas com os operons *YAZBtcr* e *2CS-CHX*, e genes como *cueO*, *merA* e *efrA/B*, apresentaram um grande número de genes de resistência e virulência; em *E. faecalis*, genomas portadores de *cadA*, *emeA* e *efrA/B* também abrigaram esses determinantes. A

análise do mobiloma revelou uma alta prevalência de plasmídeos com perfis distintos entre as espécies. Em *E. faecium*, o plasmídeo multi-replicon *repUS15/rep17* carregava genes de tolerância a metais (*YAZBtcr*, *cueO* e *merA*), resistência a antimicrobianos (*vanHAX*, *aac(6')-Ie-aph(2'')*-*Ia*, *ant(6')-Ia*, *aph(3')-IIIa*, *erm(B)*) e virulência (*pilA*), além das *ISEfa4* e *ISEfm2*. Em *E. faecalis*, o plasmídeo *repUS43* foi o mais frequente, portando os genes *efrA/B*, *tet(M)* e *tpx*, frequentemente associado no mesmo genoma o plasmídeo multi-replicon *rep7a/rep9* que inclui os genes *vanHAX*, *aac(6')-aph(2'')*, *cat*, *erm(B)*, *agg* e o operon *cyl*. A análise da estrutura populacional apontou que cerca de 60% dos genomas de *E. faecium* pertenciam a linhagens hospitalares (antigo CC17, clado A1), evidenciando uma maior concentração de plasmídeos com perfis robustos de resistência e virulência, especialmente no ST78. Por outro lado, em *E. faecalis*, a análise filogenética revelou a formação de dois clados distintos: um composto por STs predominantes em ambientes não hospitalares e outro fortemente associado a infecções hospitalares, onde os plasmídeos *repUS43*, *rep7/rep9* com genes de resistência aos antimicrobianos e virulência foram mais frequentes. Em síntese, os resultados demonstram a co-ocorrência de genes de resistência a antimicrobianos, virulência e tolerância a metais e microbicidas tanto no mesmo genoma quanto em elementos genéticos móveis, reforçando a hipótese de que a co-seleção por diversos compostos pode favorecer a disseminação de cepas multirresistentes em diferentes estruturas populacionais.

Palavras-chave: *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, resistoma, viruloma, mobiloma, resistência aos antimicrobianos, tolerância a metais pesados e microbicidas, multirresistência, diversidade populacional, análises de bioinformática.

ABSTRACT

ANALYSIS OF THE RESISTOME, VIRULOME, AND MOBILOME IN CLINICALLY RELEVANT *Enterococcus*: CORRELATIONS AMONG TOLERANCE TO HEAVY METALS, AND OTHER MICROBICIDES, PLASMID DETERMINANTS, AND POPULATION DIVERSITY

The genus Enterococcus represents an important public health concern worldwide, due to its role as a cause of healthcare-associated infections and its remarkable ability to acquire and transmit antimicrobial resistance and virulence genes. Tolerance to non-antibiotic compounds, such as heavy metals and microbicides, can also contribute to the maintenance of these characteristics through co-selection. This study investigated, from a genomic and bioinformatics perspective, 110 genomes of *E. faecium* and 60 of *E. faecalis* isolates recovered from hospitalized patients in Rio de Janeiro. The genomes, sequenced by WGS, were annotated and analyzed regarding their resistome (antimicrobials, biocides, and heavy metals), virulome, mobilome, and plasmidome, as well as population structure and phylogenetic relationships (MLST and maximum likelihood). Resistome analysis identified 23 genes, notably the *vanHAX* operon and the *aac(6')-aph(2'')* gene that codes for a bifunctional aminoglycoside resistance enzyme, which were present in over 69% of the genomes, while the virulome comprised 19 genes and 4 operons associated with adhesion, invasion, biofilm formation, and pheromone production. Additionally, genes and operons conferring tolerance to metals (copper, cadmium, mercury) and biocides (triclosan, chlorhexidine, benzalkonium chloride, acriflavine) were identified. In *E. faecium*, genomes harboring the *YAZB_{tr}* and *2CS-CHX* operons, along with genes such as *cueO*, *merA*, and *efrA/B*, exhibited a high number of resistance and virulence determinants; similarly, in *E. faecalis*, genomes carrying *cadA*, *emeA*, and *efrA/B* also contained these factors. Mobilome analysis revealed a high prevalence of plasmids with distinct profiles between the species. In *E. faecium*, the multi-replicon plasmid *repUS15/rep17* carried genes for metal tolerance (*YAZB_{tr}*, *cueO*, and *merA*), antimicrobial resistance (*vanHAX*, *aac(6')-Ie-aph(2'')*-Ia, *ant(6')-Ia*, *aph(3')-IIIa*, *erm(B)*), and virulence (*pilA*), in addition to the insertion sequences *ISEfa4* and *ISEfm2*. In *E. faecalis*, the *repUS43* plasmid was the most frequent, harboring the genes *efrA/B*, *tet(M)*, and *tpx*, and was often found in the same genome as the multi-replicon plasmid *rep7a/rep9*, which includes the genes *vanHAX*, *aac(6')-aph(2'')*, *cat*, *erm(B)*, *agg*, and the *cyl* operon. Population structure analysis indicated that approximately 60% of *E. faecium* genomes belonged to hospital-associated lineages (formerly CC17, clade A1), evidencing a higher concentration of plasmids with robust resistance and virulence profiles, particularly in ST78. Conversely, in *E. faecalis*, phylogenetic analysis revealed the formation of two distinct clades: one composed of STs predominant in non-hospital environments and another strongly associated with hospital infections, where the *repUS43* and *rep7a/rep9* plasmids carrying

antimicrobial resistance and virulence genes were more frequent. In summary, the results demonstrate the co-occurrence of antimicrobial resistance, virulence, and tolerance to metals and biocides genes both within the same genome and in mobile genetic elements, reinforcing the hypothesis that co-selection by various compounds may favor the dissemination of multi-resistant strains across different population structures.

Keywords: *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* resistome, virulome, mobilome, antimicrobial resistance, tolerance to heavy metals and microbicides, multidrug resistance, population diversity, bioinformatics analyses.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAC	Acetiltransferase
ABC	do inglês <i>ATP-binding cassette</i>
ANI	do inglês <i>Average Nucleotide Identity</i>
ANT	Nucleotidiltransferase
APH	Fosfotransferase
AS	do inglês <i>Aggregation Substance</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
BLAST	do inglês <i>basic local alignment search tool</i>
CATs	do inglês <i>chloramphenicol acetyltransferases</i>
CC	Complexo Clonal
Cd	Cádmio
CDC	do inglês <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CGE	do inglês <i>Center for Genomic Epidemiology</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	do inglês <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
COVID-19	do inglês <i>Coronavirus disease 19</i>
Cu	Cobre
Cyl	Citolisina
D-lac	D-lactato
D-ser	D-serina
dDDH	do inglês <i>digital DNA-DNA hybridization</i>
DLV	do inglês <i>Double Locus Variant</i>
DNA	do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGMs	Elementos genéticos móveis
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa e Enterobacter</i>
Esp	Proteína de superfície enterocócica
GBDP	do inglês <i>Genome BLAST distance phylogeny</i>
GC	Guanina e Citosina
Hg	Mercúrio
HiRECCs	Complexos clonais de alto risco
HLAR	do inglês <i>high-level aminoglycoside resistance</i>
Hyl	Glicosil Hidrolase
IRAS	Infecções relacionadas à assistência à saúde
IS	do inglês <i>Insertion Sequence</i>
ITUs	Infecções de trato urinário
LAP	L-leucina- β -naftilamida

LPSN	do inglês <i>List of Procaryotic Names with Standing in Nomenclature</i>
MALDI-TOF MS	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry</i>
MCO	Multicobre Oxidase
MDR	do inglês <i>Multidrug Resistance</i>
MFS	do inglês <i>major facilitator superfamily</i>
MLS	do inglês <i>macrolide-lincosamide-streptogramin</i>
MLST	do inglês <i>Multilocus Sequence Typing</i>
MSCRAMM	do inglês <i>Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules</i>
NaCl	Cloreto de sódio
PBPs	Proteínas de ligação à penicilina
PCR	do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial de hidrogênio iônico
PubMLST	do inglês <i>Public Databases for Molecular Typing and Microbial Genome Diversity</i>
PYR	L-pirrolidonil- β -naftilamida
QAC	do inglês <i>quaternary ammonium compound</i>
QRDR	do inglês <i>quinolone resistance- determining regions</i>
RAxML	do inglês <i>Randomized Axelerated Maximum Likelihood</i>
RCR	do inglês <i>Rolling Circle Replication</i>
RNA	do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>
rRNA	do inglês <i>ribosomal RNA</i>
SLV	do inglês <i>Single Locus Variant</i>
ST	do inglês <i>Sequence Type</i>
TGI	Trato Gastrointestinal
TGU	Trato Geniturinário
THG	Transferencia horizontal de genes
Tn	Transposon
TSA	Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos
Txp	do inglês <i>Thioredoxin Peroxidase</i>
TYGS	do inglês <i>Type Strain Genome Server</i>
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UV	Ultravioleta
VRE	do inglês <i>Vancomycin-resistant enterococci</i>
VREfm	VRE da espécie <i>Enterococcus faecium</i>

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Mecanismos de Ação e Resistência Antimicrobiana: Relação entre Classes, Genes e Mecanismos.....	13
Quadro 2	Fatores de Virulência: Genes, Operons e Mecanismos Associados...	19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição das amostras de <i>Enterococcus faecium</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> de acordo com as fontes de isolamento.....	38
Tabela 2	Características gerais dos genomas de amostras de <i>E. faecium</i> e <i>E. faecalis</i> isoladas de pacientes humanos hospitalizados no Rio de Janeiro..	46
Tabela 3	Co-ocorrência de genes de tolerância a metais e outros microbicidas com genes associados a resistência a antimicrobianos em 60 genomas de <i>E. faecalis</i> e 110 de <i>E. faecium</i> isolados de pacientes humanos hospitalizados no Rio de Janeiro.....	56
Tabela 4	Co-ocorrência de genes de tolerância a metais e outros microbicidas com genes associados a determinantes de virulência em 60 genomas de <i>E. faecalis</i> e 110 de <i>E. faecium</i> isolados de pacientes humanos hospitalizados no Rio de Janeiro.....	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fluxo de trabalho realizado para a análise de 110 genomas de <i>E. faecium</i> e 60 de <i>E. faecalis</i> oriundos de amostras isoladas de pacientes humanos hospitalizados no estado do Rio de Janeiro.....	40
Figura 2	Frequência de genes associados a resistência a antimicrobianos, a virulência, e a tolerância a metais pesados e outros microbicidas em genomas de amostras de <i>E. faecalis</i> e <i>E. faecium</i> isoladas de pacientes humanos hospitalizados no Rio de Janeiro.....	48
Figura 3	Perfil de genes de resistência a antimicrobianos* em genomas de amostras de <i>E. faecalis</i> e <i>E. faecium</i> isoladas de pacientes humanos hospitalizados no Rio de Janeiro.....	51
Figura 4	Perfil de determinantes de virulência em genomas de amostras de <i>E. faecalis</i> e <i>E. faecium</i> isoladas de pacientes humanos hospitalizados no Rio de Janeiro	54
Figura 5	Frequência de EGMs (Famílias <i>rep</i> , IS e Transposons) em 110 genomas de <i>E. faecium</i> e 60 de <i>E. faecalis</i> de amostras isoladas de pacientes humanos hospitalizados no Rio de Janeiro.....	62
Figura 6	Distribuição de genes associados a resistência a antimicrobianos, a virulência e a tolerância a metais pesados e outros microbicidas, de acordo com o perfil de plasmídeos, em 110 genomas oriundos de amostras de <i>E. faecium</i> isoladas de humanos hospitalizados no Rio de Janeiro.....	64
Figura 7	Distribuição de genes associados a resistência a antimicrobianos, a virulência e a tolerância a metais pesados e outros microbicidas, de acordo com o perfil de plasmídeos em 60 genomas oriundos de amostras de <i>E. faecalis</i> isoladas de pacientes hospitalizados no Rio de Janeiro.....	65
Figura 8	Grafo representando a organização dos principais plasmídeos (<i>repUS15</i> , <i>rep17</i> e <i>repUS15/rep17</i>) relacionados a co-circulação de genes associados a resistência a antimicrobianos, a virulência e a tolerância a metais pesados e outros microbicidas em genomas oriundos de amostras de <i>E. faecium</i> isoladas de pacientes hospitalizados no Rio de Janeiro.....	66
Figura 9	Grafo representando a organização dos plasmídeos <i>rep7a</i> , <i>rep9</i> e <i>rep7a/rep9</i> em três genomas oriundos de amostras de <i>E. faecalis</i> isoladas de pacientes hospitalizados no Rio de Janeiro.....	69
Figura 10	Árvore Geradora Mínima de MLST de 110 genomas oriundos de amostras de <i>E. faecium</i> isoladas de pacientes humanos hospitalizados no Rio de Janeiro...	71

Figura 11	Distribuição de genes associados a resistência a antimicrobianos, a virulência e a tolerância a metais pesados e outros microbicidas, de acordo como os diferentes STs, em 110 genomas oriundos de amostras de <i>E. faecium</i> isoladas de pacientes humanos hospitalizados no Rio de Janeiro.....	73
Figura 12	Árvore Geradora Mínima de MLST de 60 genomas oriundos de amostras de <i>E. faecalis</i> isoladas de pacientes humanos hospitalizados no Rio de Janeiro...	74
Figura 13	Distribuição de genes associados a resistência a antimicrobianos, a virulência e a tolerância a metais pesados e outros microbicidas, de acordo com os diferentes STs, em 60 genomas oriundos de amostras de <i>E. faecalis</i> isoladas de pacientes humanos hospitalizados no Rio de Janeiro.....	75
Figura 14	Árvore filogenética de máxima verossimilhança baseada no core-genoma de 110 genomas oriundos de amostras de <i>Enterococcus faecium</i> isoladas de pacientes hospitalizados no Rio de Janeiro, destacando plasmídeos portadores de genes de tolerância a metais pesados e outros microbicidas, resistência a antimicrobianos e determinantes de virulência, além de informações sobre outros plasmídeos presentes nos mesmos genomas.....	77
Figura 15	Análise taxonômica dos genomas CL9251 e CL9552 por Hibridização DNA-DNA Digital (dDDH).....	79
Figura 16	Árvore filogenética de máxima verossimilhança baseada no core-genoma de 60 genomas oriundos de amostras de <i>Enterococcus faecalis</i> isoladas de pacientes hospitalizados no Rio de Janeiro, destacando plasmídeos portadores de genes de tolerância a metais pesados e outros microbicidas, resistência a antimicrobianos e determinantes de virulência.....	81

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Gênero <i>Enterococcus</i>.....	01
1.2 Características gerais e identificação bacteriana.....	03
1.3 Os <i>Enterococcus</i> e o ambiente hospitalar.....	05
1.3.1 Genes Associados à Resistência a Antimicrobianos.....	06
1.3.2 Genes Associados à Virulência.....	14
1.3.3 Genes Associados à Tolerância a Microbicidas e a Metais.....	20
1.4 Transferência horizontal de genes em <i>Enterococcus</i>.....	25
1.5 Plasmídeos e outros EGM.....	26
1.6 Estruturas populacionais de <i>Enterococcus</i> definidas por MLST.....	31
1.6.1 <i>Enterococcus faecium</i>	32
1.6.2 <i>Enterococcus faecalis</i>	33
2. JUSTIFICATIVA.....	35
3. OBJETIVOS.....	36
4. MATERIAS E MÉTODOS.....	37
4.1 Amostras bacterianas.....	37
4.2 Seleção das amostras para sequenciamento do genoma completo.....	38
4.3 Sequenciamento do genoma completo e montagem genômica.....	38
4.4 Caracterização genômica por análises de bioinformática.....	39
4.5 Anotação do resistoma, viruloma e mobiloma.....	41
4.6 Extração do plasmidoma e análise do seu conteúdo gênico.....	41
4.7 Epidemiologia molecular por análise de MLST.....	43
4.8 Análises filogenéticas dos genes conservados por Máxima Verossimilhança.....	44
4.9 Taxonomia baseada em genoma.....	45
4.10 Testes estatísticos.....	45
5. RESULTADOS.....	46
5.1 Características gerais das sequências genômicas.....	46
5.2 Determinantes genéticos de resistência a antimicrobianos, virulência e tolerância a metais pesados e outros microbicidas.....	46
5.3 Elementos genéticos móveis.....	60
5.4 Análise do plasmidoma.....	63
5.5 Estrutura populacional, diversidade genética e reconstrução filogenética de <i>E. faecium</i> e <i>E. faecalis</i>	70
6. DISCUSSÃO.....	82
7. CONCLUSÃO.....	101
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103
Apêndice – Dados e métricas de 110 genomas de <i>Enterococcus faecium</i> e 60 genomas de <i>Enterococcus faecalis</i> incluídos no presente estudo.....	115

1. INTRODUÇÃO

1.1 Gênero *Enterococcus*

O termo "enterococo" teve origem no final do século XIX, quando Thiercelin descreveu um coco gram-positivo saprofítico de origem intestinal, com capacidade de causar infecções (Thiercelin, 1899). Nesse mesmo ano, MacCallum & Hastings relataram a primeira infecção enterocócica, associada a uma endocardite fatal, inicialmente identificando o microrganismo como *Micrococcus zymogenes* (MacCallum; Hastings, 1899), atualmente conhecido como *Enterococcus faecalis*. Em 1903, Thiercelin e Jouhaud propuseram a nomenclatura *Enterococcus* para o gênero (Thiercelin; Jouhaud, 1903; Thiercelin, 1899).

Em 1906, Andrewes e Horder renomearam a espécie como *Streptococcus faecalis* com base nas semelhanças morfológicas do gênero *Streptococcus*, como a capacidade deste microrganismo para formar cadeias sob certas condições. De 1912 a 1917, autores descreveram a ocorrência de bacteremia e infecções causadas por *Streptococcus/Enterococcus faecalis*, incluindo feridas de soldados na Primeira Guerra Mundial (Andrewes; Horder, 1906; Houston; Mcoloy, 1916; Orla-Jensen, 1919).

Em 1933, Lancefield classificou os *S. faecalis* como *Streptococcus* do grupo D. Apesar de Thiercelin ter proposto o termo enterococo em 1899, somente em 1970 Kalina propôs o gênero *Enterococcus* para agrupar os estreptococos entéricos pertencentes ao grupo D de Lancefield, se baseando em suas propriedades bioquímicas, morfológicas e de outras características fenotípicas desses microrganismos. Com o surgimento das técnicas moleculares na década de 80 a criação do gênero *Enterococcus* foi enfim validada em 1984, por meio de consistentes evidências genéticas obtidas por experimentos de hibridização DNA-DNA e DNA-rRNA que finalmente demonstraram que os enterococos compartilham de pouca correlação genética com os demais integrantes do gênero *Streptococcus*, portanto, sustentando a reclassificação dessas espécies para um novo gênero (Kalina, *et al.*, 1970; Lancefield, 1933; Schleifer; Kilpper-Bälz, 1984). Desde então, a complexa composição do gênero *Enterococcus* vem sendo revelada, conforme ilustrado atualmente pela descrição de mais de 80 espécies, segundo o LPSN - List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature (Parte *et al.*, 2020; <https://lpsn.dsmz.de/genus/enterococcus>, acesso em fevereiro 2025).

Os *Enterococcus* apresentam uma notável capacidade de persistência ambiental (Gaca; Lemos, *et al.*, 2019). Sua capacidade de sobreviver em condições diversas, como variações de

temperatura, pH, concentração osmótica e atmosférica, parece ter-se revelado como uma vantagem seletiva. Esse atributo favoreceu a ampla distribuição das espécies desse gênero em uma variedade de ambientes. Além de serem considerados comensais no trato intestinal de seres humanos, essas bactérias também são encontradas em outros animais de sangue quente, répteis, insetos e animais marinhos. Na natureza, há relatos da presença dos *Enterococcus* em diversos tipos de solo e em ambientes aquáticos, como água e sedimentos marinhos, efluentes de esgoto tratado, e, como resultado da associação com plantas e animais, também em animais de produção e alimentos. Nos humanos, além do trato gastrointestinal (TGI), podem ser encontrados em menor proporção no trato geniturinário (TGU), na cavidade oral e na pele (García-Solache; Rice, 2019; Guzman Prieto *et al.*, 2016; Müller *et al.*, 2001; Mundt, 1963; Ott *et al.*, 2001; Švec, *et al.*, 2014 *et al.*, 2014).

Desde suas primeiras descrições, estabeleceu-se o paradigma dos enterococos como comensais oportunistas. Mais de um século após essas observações iniciais, os enterococos são agora amplamente reconhecidos como um dos principais agentes causadores de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), uma realidade que se estende também ao contexto brasileiro, onde dados obtidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária em 2022 indicam que os enterococos estão entre os principais cocos Gram-positivos causadores de infecções do trato urinário e de corrente sanguínea (ANVISA, 2022; Werner *et al.*, 2008). Uma análise conduzida pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos da América (CDC - Centers for Disease Control and Prevention) revelou que, em 2019, foram registrados aproximadamente 54.500 casos de infecções causadas por *Enterococcus* spp., resultando em um total de 5.400 óbitos (CDC, 2019).

Dentre as espécies, as de maior relevância médica humana são *E. faecalis* e *Enterococcus faecium*, sendo a primeira descrita como a mais virulenta em relação a segunda, relacionada aos maiores índices de isolamento a partir de espécimes clínicos de pacientes infectados entre as espécies do gênero. Até meados da década de 1990, *E. faecalis* representava 90–95% dos isolados clínicos, e a infecção por *E. faecium* em menor frequência, entre 5% e 10% (Huycke; Sahm; Gilmore, 1998). Desde então, a proporção de isolados de *E. faecium* aumentou, em grande parte devido à alta incidência de resistência a múltiplas drogas (MDR- *multidrug resistance*) nesta espécie (Gilmore *et al.*, 2013; Top *et al.*, 2007).

Essas bactérias têm se destacado como patógenos nosocomiais oportunistas, estando bastante associados a infecções do trato urinário (ITUs), bacteremias, endocardites, meningites, infecções de ferida ou queimadura, infecções intra-abdominais e pélvicas e

infecções de cateter e outros dispositivos médicos implantados. São considerados indivíduos em situação de risco à aquisição dessas infecções: idosos; indivíduos imunocomprometidos de outras faixas etárias; pacientes hospitalizados por longos períodos; pacientes submetidos ao uso de dispositivos invasivos; pacientes tratados com antimicrobianos de amplo espectro de ação, entre outros (Arias; Murray, 2012; García-Solache; Rice, 2019; Guzman Prieto *et al.*, 2016; Ni; Huycke, 2014; Teixeira *et al.*, 2022).

Relatórios baseados em dados de estudos de vigilância epidemiológica hospitalar começaram a identificar um conjunto específico de patógenos nosocomiais que representam um desafio significativo para o tratamento de infecções hospitalares e destacam a necessidade contínua de pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos e estratégias de controle de infecções como "patógenos ESKAPE". O termo "ESKAPE" é um acrônimo abrangente que engloba espécies Gram-positivas e Gram-negativas, compreendendo *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Enterobacter* (Rice, *et al.*, 2008). Considerando a importância de *E. faecium* como causa de infecções hospitalares difíceis de tratar devido à sua resistência a múltiplos antibióticos, ele foi incluído no grupo ESKAPE de microrganismos de risco à saúde humana. Contudo, alguns autores, observando o aumento de infecções causadas por *E. faecalis*, sugeriram sua inclusão no grupo ESKAPE (Alcántar-Curiel *et al.*, 2023; Santajit; Indrawattana, 2016). A ameaça significativa à saúde pública representada pelo grupo de patógenos destaca-se à medida que as taxas de resistência aos antibióticos aumentam, impulsionadas pela aquisição de múltiplos mecanismos de resistência. Essa situação reforça a urgência de esforços imediatos para pesquisa, desenvolvimento de novos antimicrobianos e implementação efetiva de controle (Santajit; Indrawattana, 2016).

1.2 Características gerais e identificação bacteriana

O gênero *Enterococcus* pertence ao grupo de bactérias Gram-positivas, catalase-negativas, caracterizadas por um baixo conteúdo de guanina e citosina (%GC) em seu DNA. A capacidade de permanência e a notável flexibilidade metabólica em diferentes ambientes distinguem esse gênero. Os enterococos são capazes de metabolizar uma ampla variedade de carboidratos como fontes de energia para o seu crescimento. Além disso, membros deste gênero podem crescer em temperaturas que variam de 8 a 45°C, em grandes variações de pH (entre 4,0 a 9,6), e toleram altas concentrações de sais biliares e azida de sódio. A maior parte

das amostras apresenta o ácido teicóico associado à parede celular (Paulsen *et al.*, 2003; Teixeira *et al.*, 2022). Membros deste gênero também são capazes de crescer em meio contendo concentrações elevadas de cloreto de sódio (NaCl a 6,5%), e de hidrolisar esculina na presença de sais biliares. A maioria das espécies produz as enzimas pirrolidonilarilamidase e leucina aminopeptidase que hidrolisam os substratos L-pirrolidonil- β -naftilamida (PYR) e L-leucina- β -naftilamida (LAP), respectivamente. São homofermentativos e o ácido láctico é o produto do metabolismo fermentativo da glicose ou de outros carboidratos (Hollenbeck; Rice, 2012; Švec, *et al.*, 2014; Teixeira *et al.*, 2022). A sua capacidade de resistir a estresses químicos e ambientais hostis, letais para a maioria das bactérias não formadoras de esporos, foi inicialmente usada para separar os enterococos dos estreptococos morfológica e metabolicamente semelhantes. E já foi demonstrado que essa notável resiliência ao estresse é aprimorada após a exposição a condições de estresse subletal. Coletivamente, esses fatores situam o *Enterococcus* como um gênero modelo para estudar a tolerância ao estresse em bactérias comensais e patogênicas (Gaca; Lemos, 2019).

A identificação convencional das espécies do gênero *Enterococcus* baseia-se em testes fisiológicos, como a produção de ácidos a partir do metabolismo de carboidratos, tais como arabinose, manitol, rafinose, sorbitol, e sorbose, a descarboxilação da arginina, utilização de piruvato de sódio, crescimento em meio contendo telurito de potássio, produção de pigmento e motilidade. Esses testes geralmente diferenciam apenas as espécies mais comuns. O uso de técnicas moleculares, como PCR (PCR, do inglês *Polimerase Chain Reaction*) e espectrometria de massa por tempo de voo, ou MALDI-TOF MS (do inglês, *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry*), tem contribuído para identificar outras espécies de *Enterococcus*, especialmente em amostras com comportamento atípico nos testes convencionais (Griffin *et al.*, 2012; Teixeira *et al.*, 2022).

Com o primeiro sequenciamento do genoma completo (em inglês *Whole Genome Sequencing*, WGS) de *E. faecalis* em 2003 e o avanço no desenvolvimento de ferramentas modernas para manipulação e caracterização genética, o campo da biologia enterocócica passou por uma revolução sem precedentes. Na década seguinte, abordagens genômicas funcionais, transcriptômicas e proteômicas forneceram precisão na identificação bacteriana, detecção de genótipos de resistência a antimicrobianos e atributos de virulência, fornecendo respostas rápidas em surtos bacterianos, sendo os enterococos um grupo amplamente estudado nessa abordagem, refletido no grande número de genomas depositados em bancos de dados públicos (Kwong *et al.*, 2015; Moustafa, *et al.*, 2020).

1.3 Os *Enterococcus* e o ambiente hospitalar

Enterococcus é um gênero diverso de bactérias capazes de tolerar condições ambientais adversas. Essas bactérias colonizam o trato gastrointestinal de humanos e de uma ampla variedade de hospedeiros no reino animal, adaptando-se a diferentes desafios ambientais. Além de desempenharem um papel relevante nas infecções hospitalares devido à multirresistência a antimicrobianos, a capacidade adaptativa dos *Enterococcus* para competir eficazmente no trato gastrointestinal também os torna particularmente aptos a persistirem em ambientes hospitalares.

A resposta ao estresse em *Enterococcus* abrange os mecanismos adaptativos que essas bactérias utilizam para sobreviver a condições adversas, como variações ambientais, exposição a antimicrobianos e pressões do sistema imunológico. Em *E. faecalis* e *E. faecium*, a tolerância ao estresse está estreitamente associada à patogenicidade, refletindo a relação entre resistência e virulência. Essa robustez intrínseca também desempenha um papel crucial na transmissão entre hospedeiros e na persistência em diferentes ambientes (Gaca; Lemos, 2019).

A aquisição de genes de resistência a antimicrobianos, principalmente por transferência horizontal, amplia a capacidade dos enterococos de sobreviver e se adaptar em ambientes hospitalares. Sua resistência intrínseca também potencializa a infectividade das cepas multirresistentes resultantes. Para se disseminarem entre indivíduos infectados e suscetíveis, os enterococos enfrentam o desafio de sobreviver a compostos tóxicos e conseguir se estabelecer em novos hospedeiros, superando as defesas imunes naturais do hospedeiro e competindo com outros microrganismos presentes no ambiente (Gaca; Lemos, 2019).

Os membros desse gênero possuem uma notável capacidade de permanecerem viáveis por longos períodos em diversos fômites no ambiente hospitalar, inclusive após procedimentos de desinfecção. Essa persistência é evidente em sua capacidade de sobreviver a processos de dessecação e estresse nutricional, resistir à esterilização por radiação UV, suportar descontaminação por antissépticos e tolerar a ação do álcool 70%, frequentemente utilizado na higienização das mãos (Guzmán Prieto, *et al.*, 2017; Maraccini, *et al.*, 2012; Noskin *et al.*, 1991; Pidot, *et al.*, 2018; Wendt *et al.*, 1998).

A ascensão de algumas amostras enterocócicas no ambiente hospitalar pode ser explicada por alguns fatores cruciais, como a resistência intrínseca a diversos antimicrobianos, a notável plasticidade genômica que permite a aquisição de elementos genéticos móveis, incluindo genes de resistência a antimicrobianos e a outros compostos e

determinantes de virulência, bem como, a persistência e expansão de linhagens altamente adaptadas (García-Solache; Rice, 2019 *et al.*, 2014).

1.3.1 Genes Associados à Resistência a Antimicrobianos

A relevância clínica do gênero *Enterococcus* está diretamente relacionada à sua resistência a antimicrobianos, o que aumenta significativamente o risco de colonização e infecção. Essa resistência é provavelmente crucial na maioria dos ambientes ecológicos naturais onde os *Enterococcus* habitam e desempenha um papel fundamental na dinâmica ecológica que ocorre durante e após a terapia antibiótica, uma vez que, como comensais normais do trato gastrointestinal humano, esses microrganismos estão frequentemente expostos a uma variedade de antibióticos durante tratamentos médicos (Kristich *et al.*, 2014).

Entre as espécies mais clinicamente relevantes estão o *E. faecalis* e o *E. faecium* e embora as características de susceptibilidade a antimicrobianos e outros compostos microbicidas destas duas espécies diferem em aspectos importantes, ambas apresentam redução ou ausência da susceptibilidade categorizadas como intrínseca, adquirida e tolerância. Configuram resistência intrínseca às características resultantes da expressão de genes do próprio cromossomo, conferindo um fenótipo comum a todos os representantes de uma determinada espécie ou grupos de espécies. A resistência adquirida, por sua vez, resulta de mutações genéticas ou da aquisição de genes por transferência horizontal, frequentemente mediada por elementos genéticos móveis (EGMs) como plasmídeos e transposons, o que dá origem a diversos fenótipos de susceptibilidade em cada espécie. A tolerância, por outro lado, significa que o crescimento bacteriano pode ser inibido por concentrações dos antimicrobianos que são clinicamente alcançáveis, mas só serão eliminadas por concentrações muito superiores àquelas que causam a inibição (Hollenbeck; Rice, 2012; Kristich *et al.*, 2014; Santajit; Indrawattana, 2016).

Os enterococos são intrinsecamente resistentes a muitos agentes antimicrobianos comumente usados. Entre os fármacos aos quais os enterococos possuem resistência intrínseca estão duas grandes classes: os β -lactâmicos e os aminoglicosídeos, ambos em baixas concentrações (Guzman-Prieto *et al.*, 2016).

Os β -lactâmicos atuam através da inativação das proteínas ligantes de penicilina (PBPs-*penicillin-binding proteins*), interferindo assim na síntese do peptidoglicano. Todos os enterococos apresentam suscetibilidade diminuída aos β -lactâmicos devido à expressão de PBPs com baixa afinidade e intrínseca, com o fenótipo de resistência adquirida associada a

alterações genéticas por mutações na PBP5 em *E. faecium* e na PBP4 em *E. faecalis* (García-Solache.; Rice, 2016).

Os aminoglicosídeos atuam ligando-se ao rRNA 16S da subunidade ribossômica 30S e interferindo na síntese proteica. Os enterococos geralmente exibem um nível moderado de susceptibilidade aos aminoglicosídeos, atribuído à má absorção dos antimicrobianos dessa classe. Em *E. faecalis*, acredita-se que a resistência intrínseca seja causada pela incapacidade de os aminoglicosídeos passarem pela parede celular bacteriana e inibirem a síntese de proteínas pelos ribossomos no citoplasma. No *E. faecium* foi descrito um gene cromossômico associado à resistência intrínseca, por ser encontrado na grande maioria das amostras, o gene *aac(6')-Ii* (Galimand *et al.*, 2011).

Devido à redução de susceptibilidade aos β -lactâmicos pela produção de PBPs de baixa afinidade e da susceptibilidade moderada aos aminoglicosídeos, é recomendada uma terapia combinada desses antimicrobianos para a terapia de infecções sistêmicas (Arbloa, *et al.* 2004; Cattoir.; Giard, 2014; Rice, 2009; Teixeira, *et al.*, 2022). Esta combinação determina um efeito sinérgico muito recomendado nesses casos (Fiore *et al.*, 2019; Hollenbeck; Rice, 2012). O sinergismo ocorre, presumivelmente, como resultado da maior captação do aminoglicosídeo, devido ao aumento da permeabilidade exercida por inibidores da síntese de parede celular. Entretanto, no caso de fenótipos de resistência às concentrações clínicas dos β -lactâmicos, é recomendado o uso de outro agente antimicrobiano que atua em parede celular, a vancomicina. No entanto, estudos demonstraram que a ceftarolina e o ceftobiprole, cefalosporinas de nova geração, podem ser eficazes em *E. faecalis* in vitro (Rice *et al.*, 2009).

Os enterococos também demonstram resistência intrínseca à clindamicina, mediada pelo produto do gene *lsaA*, ainda que o mecanismo permaneça pouco definido. *E. faecalis* se apresenta naturalmente resistente à combinação de estreptograminas quinupristina-dalfopristina, por um mecanismo baseado na baixa permeabilidade celular e na presença da enzima de acetilação inativadora codificadas pelo gene *lsa*, combinação que se mostra ativa contra linhagens de *E. faecium* que carecem de determinantes específicos de resistência (Fiore *et al.*, 2019; Hollenbeck; Rice, 2012; Kristich *et al.*, 2014; Santajit; Indrawattana, 2016). Embora o gene *lsaA* também possa estar associado a elementos genéticos móveis. Por outro lado, o gene *msrC* é intrinsecamente encontrado em *E. faecium*, diferentemente de *E. faecalis*, que geralmente não possui esse gene. A presença do *msrC* em *E. faecium* contribui para sua capacidade de resistir à eritromicina e outros macrolídeos (Hollenbeck; Rice, 2012).

Além da resistência e tolerância intrínsecas, os enterococos têm sido extraordinariamente bem-sucedidos em adquirir rapidamente resistência a praticamente qualquer agente antimicrobiano colocado em uso clínico (Hollenbeck; Rice, 2012). Entre esses antimicrobianos estão incluídos: β -lactâmicos e aminoglicosídeos em níveis elevados, glicopeptídeos, fluoroquinolonas, tetraciclinas, macrolídeos, estreptograminas (em *E. faecium*), cloranfenicol e até mesmo aos agentes mais recentemente licenciados como oxazolidinonas (linezolida) e lipopeptídeos cíclicos (daptomicina) (Fiore *et al.*, 2019; Hollenbeck; Rice, 2012; Kristich *et al.*, 2014; Santajit; Indrawattana, 2016).

A resistência dos enterococos a níveis elevados de β -lactâmicos — que inclui o limitado número de penicilinas aos quais esses microrganismos não são intrinsecamente resistentes (ampicilina, mezlocilina, e piperacilina) — pode ser mediada pela atividade de β -lactamases, ou, sobretudo, pela superexpressão ou mutações nas PBPs de baixa afinidade de ligação (Miller *et al.*, 2014).

Apesar da presença de β -lactamases ter sido descrita em amostra de *E. faecalis*, ainda assim representam episódios incomuns nessa espécie, e relatos de produção de β -lactamases por *E. faecium* são ainda mais raros. Por isso o principal mecanismo de resistência adquirida a níveis elevados de β -lactâmicos é o acúmulo de mutações nos genes envolvidos na expressão das PBP5 para *E. faecium* e PBP4 para *E. faecalis*, diminuindo consideravelmente a eficácia desses antimicrobianos nessas amostras (García-Solache; Rice, 2019).

A resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos (HLAR, do inglês *High-level Aminoglycoside Resistance*) pode ser conferida pela aquisição de determinantes genéticos ou por mutações. Os mecanismos mais preocupantes, do ponto de vista clínico, são aqueles que conferem resistência à gentamicina e/ou à estreptomicina, que são os fármacos dessa classe mais utilizados em esquemas de terapia combinada para tratamento de infecções sistêmicas (Kristich *et al.*, 2014; Noskin *et al.*, 1991). A HLAR geralmente é adquirida em um elemento móvel que codifica uma enzima modificadora de aminoglicosídeos. Essas enzimas podem ser fosfotransferases (APHs) que usam ATP para fosforilar um grupo hidroxila no antimicrobiano, acetiltransferases (AACs) que usam acetil-CoA para acetilar um grupo amino, ou nucleotidiltransferases (ANTs) que usam ATP para adenililar uma hidroxila (Kristich *et al.*, 2014; Miller *et al.*, 2014).

A HLAR é mais frequentemente associada ao gene *aph(2'')-Ia-aac(6')-Ie*, que codifica uma enzima bifuncional capaz de inativar a gentamicina por fosforilação e todos os outros aminoglicosídeos por acetilação, com a exceção da estreptomicina; aos genes *aph(2'')*-

Ib, *aph(2'')*-*Ic* e *aph(2'')*-*Id*, os quais também conferem resistência à gentamicina, porém são menos frequentes; aos genes *ant(6')*-*Ia* e *ant(3'')*-*Ia*, que por sua vez codificam adeniltransferases capazes de inativar a estreptomicina e outros aminoglicosídeos semelhantes estruturalmente; ao gene *aph(3')*-*IIIa*, associado à síntese de uma fosfotransferase que confere resistência à canamicina; e o gene *ant(4'')*-*Ia*, codificador de uma nucleotidiltransferase que confere resistência à tobramicina, amicacina, neomicina e kanamicina (Kariyama *et al.*, 1998; Kristich *et al.*, 2014; Miller *et al.*, 2014).

A adaptabilidade marcante dos *Enterococcus* se evidencia na aquisição dos genes que conferem resistência à vancomicina. Desde o primeiro registro de enterococos resistentes à vancomicina (VRE, do inglês *Vancomycin-resistant Enterococci*) em 1988 até o final da primeira década deste século, essa resistência se disseminou globalmente. Em alguns hospitais, observa-se que até 80% dos isolados de *E. faecium* são resistentes à vancomicina, representando uma séria ameaça à saúde pública (Arias; Murray, 2012).

Os glicopeptídeos, como vancomicina e teicoplanina, atuam ligando-se à porção terminal D-alanina-D-alanina (D-Ala-D-Ala) dos precursores do peptidoglicano, inibindo a ligação cruzada das cadeias de peptidoglicano e, assim, impedindo a síntese da parede celular. Os enterococos desenvolvem resistência à vancomicina quando os aminoácidos terminais dos precursores do peptidoglicano são modificados de D-Ala-D-Ala para D-Ala-D-lactato (D-Ala-D-Lac) ou para D-Ala-D-Serina (D-Ala-D-Ser). Essas alterações conferem em resistência de alto e baixo nível à vancomicina, respectivamente (Hollenbeck; Rice, 2012; Kristich *et al.*, 2014; Miller *et al.*, 2014).

Nove grupos de genes envolvidos na resistência à vancomicina já foram identificados em *Enterococcus*, sendo *vanA* e *vanB* os mais frequentes e clinicamente relevantes. O gene *vanA* confere resistência tanto à vancomicina quanto à teicoplanina, enquanto o *vanB* confere resistência exclusivamente à vancomicina. Os setes genes que participam da expressão do fenótipo VanA estão divididos em três grupos funcionais. Os genes *vanS* e *vanR* participam da regulação da resposta. Estes são responsáveis pela expressão de proteínas relacionadas à detecção da presença do antimicrobiano no meio extracelular e na sinalização intracelular para ativação da transcrição dos genes *vanHAX*, que desempenham o papel efetor da resistência, e de *vanYZ* que são genes acessórios (Arthur; Quintiliani, 2001; Miller *et al.*, 2014).

Em um estudo conduzido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, foi constatado que, em 2022, o fenótipo de resistência à vancomicina foi observado em 58% das

amostras de *E. faecium* isoladas de pacientes com infecção de corrente sanguínea internados em UTIs de instituições hospitalares brasileiras. Entre *E. faecalis*, este fenótipo foi observado em 18% das amostras no mesmo período (ANVISA, 2022). Para prevenir a disseminação da resistência à vancomicina, recomenda-se a vigilância regular de amostras das espécies *E. faecalis* e *E. faecium* para detectar amostras resistentes. Além disso, é importante implementar um programa de triagem da colonização intestinal (Tacconelli, E.; Cataldo, 2009).

As fluoroquinolonas, principalmente a ciprofloxacina e a levofloxacina, atuam inibindo a DNA girase ou a DNA topoisomerase IV, enzimas essenciais para a viabilidade celular, envolvidas no processo de replicação do DNA. A resistência às fluoroquinolonas é comum em enterococos, sendo seu uso limitado, utilizada para tratar infecções do trato urinário causadas por amostras de *E. faecalis* sensíveis (Correia *et al.*, 2017). O mecanismo de resistência a esses antimicrobianos é atribuído, principalmente, a mutações nas regiões chamadas de regiões determinantes de resistência às quinolonas (QRDR, do inglês, *quinolone resistance- determining regions*) nos genes *gyrA* e *gyrB* para DNA girase e *parC* e *parE* para topoisomerase IV. Além disso, outros mecanismos, como produção de bombas de efluxo e enzimas modificadoras de antimicrobianos, podem estar associados à resistência, muitas vezes mediados por plasmídeos (García-Solache; Rice, 2019; Yasufuku *et al.*, 2011).

A classe das tetraciclinas é amplamente utilizada na clínica humana devido ao seu amplo espectro de ação, baixa toxicidade e baixo custo, o que levou à emergência de bactérias resistentes a essa classe, inclusive entre os enterococos. São agentes bacteriostáticos que exercem seu efeito antibacteriano ligando-se à subunidade 30S do ribossomo, bloqueando o acesso do RNA transportador ao sítio A ribossomal e, conseqüentemente, impedindo a síntese proteica. Entre os mecanismos de resistência às tetraciclinas estão: a produção de proteínas envolvidas no efluxo da droga, codificadas pelos genes *tetK* e *tetL*; proteínas que protegem o ribossomo bloqueando a ligação da droga, codificadas pelos genes *tetO*, *tetS* e *tetM*, sendo o *tetM* frequentemente carregado por transposons conjugativos relacionados ao Tn916; e de uma enzima que inativa a droga através de alteração química, codificada pelo gene *tetX* (Chopra; Roberts, 2001; Schnappinger; Hillen, 1996; Schwarz; Cardoso; Wegener, 1992).

Devido aos altos índices de resistência dos enterococos aos antimicrobianos de primeira escolha, os macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas (MLS, do inglês *Macrolide-Lincosamide-Streptogramin*) podem ser cogitados como alternativas para o tratamento dessas infecções. Os macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas atuam inibindo a síntese proteica por meio da ligação à subunidade 50S do ribossomo. Mecanismos

adquiridos em amostras bacterianas de enterococos podem resultar em resistência cruzada aos antimicrobianos MLS. Esses mecanismos incluem a alteração do sítio alvo por metilação do rRNA 23S, realizada pelas metilases codificadas por genes *erm*, associados à resistência a macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina B, sendo o gene *ermB* o mais prevalente entre os enterococos; e o efluxo da droga, regido pela ação de proteínas codificadas pelos genes *mefA*, *mefE*, *msrA*, *mreA* e *msrC*, entre os quais os genes *mef* têm sido associados à resistência aos macrolídeos, enquanto os genes *msr* estão envolvidos na resistência aos macrolídeos e à estreptogramina B (quinupristina) (Aarestrup *et al.*, 2000; Tenson; Lovmar; Ehrenberg, 2003; Zalipour; Esfahani; Havaei, 2019). Os genes *ermA* e *ermB*, capazes de conferir o fenótipo de resistência MLS, podem ser adquiridos através de plasmídeos (Hollenbeck; Rice, 2012). Outro mecanismo de resistência para macrolídeos ocorre por meio da proteção ribossomal exercida por uma das proteínas da família ABC-F, codificada pelos genes *mre* e *lsa* (*lsaA* e *lsaE*). Além disso, a inativação do fármaco por modificação enzimática é outro mecanismo de resistência observado para lincosamidas, essa inativação é facilitada pelo gene *lnuB*.

A preocupação com a limitação de opções terapêuticas para tratar infecções graves por *E. faecium* resistentes à vancomicina vem crescendo. Embora a combinação com estreptograminas (quinupristina/dalfopristina) tenha sido recomendada, há relatos de efeitos adversos, e muitas amostras dessa espécie carregam o gene *erm(B)*, cujo produto neutraliza o efeito bactericida dessa combinação de antimicrobianos. Essas limitações representam obstáculos significativos para sua utilização mais segura e generalizada (Hollenbeck; Rice, 2012).

O cloranfenicol é um antimicrobiano cujo mecanismo de ação também consiste na inibição da síntese de proteínas através da ligação à subunidade 50S do ribossomo bacteriano, bloqueando o centro peptidiltransferase e, conseqüentemente, impedindo a formação da cadeia polipeptídica. Esse antimicrobiano é ocasionalmente explorado como alternativa terapêutica em casos de infecções por VRE por demonstrar eficácia *in vitro* e, em muitos casos, já demonstrou êxito inclusive no tratamento de infecções enterocócicas graves (Wang; Hsueh, 2009). Dentre os mecanismos de resistência ao cloranfenicol relatados na literatura, o mais significativo para os *Enterococcus* é a inativação enzimática por acetilação, através da ação de acetiltransferases (CATs, do inglês *Chloramphenicol Acetyltransferases*). Acetiltransferases dos tipos A-7 e A-8, ambas codificadas pelos genes *cat*, já foram descritas em *E. faecalis* e *E. faecium*, respectivamente, ambas encontradas em plasmídeos. Uma das principais preocupações relacionadas à utilização do cloranfenicol é a sua toxicidade inerente

à medula óssea e, como resultado, os dados clínicos limitados sugerem que este composto pode ser utilizado apenas em último caso, quando outras terapias ou combinações falharam (Aakra *et al.*, 2010; Schwarz *et al.*, 2004).

Entre os antimicrobianos mais recentemente aprovados para o tratamento de infecções por *Enterococcus*, destacam-se a linezolida e a daptomicina. A linezolida, pertencente à classe das oxazolidinonas, exerce sua ação inibindo a síntese proteica. A resistência a essa classe pode ser disseminada horizontalmente através da aquisição de genes específicos, *cfr* e *optrA*. Associado a plasmídeos e outros elementos genéticos móveis, o gene *cfr* tem potencial de rápida disseminação. Outro mecanismo é o acúmulo de mutações no gene *23S rRNA*, que altera o local de ligação da linezolida, reduzindo sua afinidade pelo alvo e, conseqüentemente, sua eficácia. A daptomicina, por sua vez, é um lipopeptídeo cíclico com ação bactericida, atuando nos canais de cálcio da membrana celular bacteriana e causando despolarização. Mutações nos genes *liaFSR*, responsáveis pela regulação da resposta ao estresse celular, foram previamente associadas a um aumento na Concentração Inibitória Mínima (CIM) para esse antimicrobiano (Munita *et al.*, 2012).

O **Quadro 1** ilustra os principais tipos e mecanismos de resistência a antimicrobianos descritos em *Enterococcus*.

Quadro 1 - Mecanismos de Ação e Resistência Antimicrobiana: Relação entre Classes, Genes e Mecanismos

Classe de antimicrobianos	Mecanismo de ação	Gene/Operon	Mecanismo de resistência
Aminoglicosídeos (Níveis Elevados)	Ligam-se irreversivelmente às subunidades 30S dos ribossomos bacterianos inibindo a síntese proteica	<i>aph(2'')-Ia-aac(6')-Ie, aph(2'')-Ib, aph(2'')-Ic, aph(2'')-Id, ant(6')-Ia e ant(3'')-Ia, aph(3')-IIIa e ant(4'')-Ia</i>	Modificação da droga, reduzindo sua afinidade pelo ribossomo bacteriano
Macrolídeos, Lincosamidas e Estreptograminas	Interferem na translocação do ribossomo ao longo do mRNA interferindo na síntese proteica	<i>erm(A), ermB, mef(A) e lsaE</i> (Macrolídeos), <i>lnuB</i> (Lincosamidas) e <i>msr(C)</i> (Macrolídeos e Estreptograminas)	Alteração do sítio alvo (<i>ermA, ermB</i>); Bomba de Efluxo [<i>mef(A) e msr(C)</i>]; Modificação da droga (<i>lnuB</i>)
Tetraciclínas	A síntese proteica é interrompida em resultado do bloqueio da ligação do aminoacil-tRNA	<i>tetK, tetL, tetO, tetS e tetM</i>	Produção de proteínas envolvidas no efluxo da droga.
Glicopeptídeos	Ligam-se ao precursor do peptidoglicano inseridos na síntese da parede celular	<i>vanHAX</i>	Modificação dos precursores de peptidoglicano, reduzindo a afinidade da droga pela parede celular bacteriana.
β -lactâmicos (Níveis Elevados)	Inibição da síntese da parede celular	PBP5 (<i>E. faecium</i>) e PBP4 (<i>E. faecalis</i>)	Diminuição da afinidade aos antibióticos, resultante de sua estrutura alterada da PBP, o que permite a continuidade da síntese da parede celular apesar da presença do antibiótico.
Fluoroquinolonas	Ligam-se à enzima DNA girase interferindo na replicação do DNA	<i>gyrA, gyrB, parC e parE</i>	Alterações no sítio alvo, geralmente devido a mutações genéticas.
Anfenicóis (Cloranfenicol e Florfenicol)	Ligam-se à subunidade 50S do ribossomo bacteriano e bloqueiam a síntese de proteínas	<i>cat e fex</i>	Modificação e inativação da droga (<i>cat</i>); Bomba de efluxo (<i>fex</i>)
Lipopeptídeos cíclicos (Daptomicina)	Ligam-se à membrana celular, causando disfunção na estrutura e permeabilidade da membrana.	<i>liaFSR</i>	Modificação da membrana celular, reduzindo a afinidade com a droga.
Oxazolidinonas (Linezolida)	Ligam-se à subunidade 50S do ribossomo bacteriano e bloqueiam a síntese de proteínas	<i>cfr e oprA</i>	Alteração no sítio alvo (<i>cfr</i>); Bomba de efluxo (<i>oprA</i>)

1.3.2 Genes Associados à Virulência

A transição dos enterococos de organismos comensais para agentes patogênicos é impulsionada por diversos fatores, sendo especialmente relevante sua habilidade de superar as barreiras das defesas imunológicas inatas e adaptativas do hospedeiro. Os fatores de virulência dos microrganismos desempenham um papel crucial nesse processo. A virulência de um microrganismo está diretamente relacionada à sua capacidade de causar danos ao hospedeiro, incluindo agressão e invasão de tecidos, bem como evasão dos mecanismos de defesa imunológica. Os enterococos, especialmente *E. faecalis*, são capazes de produzir uma variedade de fatores de virulência (Fiore *et al.*, 2019).

As substâncias agregativas (AS) referem-se às proteínas Asa1 e Agg, presentes na parede celular, característica de *E. faecalis*, desempenhando uma variedade de funções, especialmente na conjugação bacteriana. Codificada pelo gene *asa1*, a proteína Asa1 é frequentemente encontrado em plasmídeos do tipo pAD1, a expressão da substância agregativa é induzida por feromônios e está associada a diversos mecanismos que contribuem para a patogênese de infecções como adesão às células do hospedeiro, à matriz extracelular, aumento da hidrofobicidade da superfície celular bacteriana, resistência à fagocitose, sobrevivência dentro de leucócitos polimorfonucleares, entre outros (Gilmore *et al.*, 2002 *et al.*, 2014). Já a Agg, codificada pelo gene homônimo, medeia a formação de agregados durante a conjugação, promovendo a transferência de elementos genéticos móveis e contribuindo para a patogenicidade (Soares *et al.*, 2014).

A proteína de superfície de enterococos (Esp) é uma adesina inicialmente identificada em *E. faecalis* e posteriormente em *E. faecium*, codificada pelo gene *esp*, localizado em ilhas de patogenicidade em ambas as espécies. Enquanto a proteína Esp é amplamente identificada em amostras de *E. faecalis* de diferentes origens, tanto na comunidade quanto em ambientes hospitalares, em *E. faecium* é predominantemente encontrada em amostras hospitalares (Gilmore *et al.*, 2002; Leavis *et al.*, 2004). Essa adesina está associada à produção de biofilme, facilitando a adesão a dispositivos médicos e a transmissão de infecções nosocomiais. Além disso, promove a adesão dos enterococos a valvas cardíacas lesionadas, contribuindo para o desenvolvimento de endocardite (Didem *et al.*, 2017; Heikens *et al.*, 2011; Paganelli; Willems; Leavis, 2012).

A gelatinase (GelE), produzida e liberada principalmente por *E. faecalis*, é uma metaloprotease com capacidade de quebrar gelatina, colágeno, elastina, caseína, hemoglobina, glucagon, neurotensinas e outros peptídeos bioativos. Além disso, ela

influencia a resposta imune do hospedeiro ao inativar a proteína C3 do sistema complemento, resultando na redução da fagocitose dos enterococos por leucócitos polimorfonucleares (Park *et al.*, 2008). Há evidências sugerindo que a gelatinase desempenha um papel na patogênese da endocardite enterocócica. A síntese da gelatinase é controlada pela expressão do gene *gelE*, parte do operon *gelE-sprE*, que é regulado positivamente pelo sistema FSR regulado pelo gene *fsrB* (Nakayama *et al.*, 2006). Além da degradação de moléculas do hospedeiro, a gelatinase age na remoção de proteínas defeituosas da superfície bacteriana e na ativação de autolisina, que degrada o peptidoglicano da parede celular e induz a liberação de DNA no meio extracelular, um processo importante para o desenvolvimento do biofilme (Thomas *et al.*, 2009).

Uma das primeiras descrições de fatores de virulência em enterococos foi a citolisina (Cyl), também chamada de hemolisina, e codificada por um operon de oito genes (*cylRI*, *cylR2*, *cylLL*, *cylLS*, *cylM*, *cylB*, *cylA*, *cylI*) geralmente carregado em plasmídeos feromônio-responsivos, como o pAD1, ou inserido em ilhas de patogenicidade do cromossomo. A presença desse operon é frequentemente associada a genes codificadores de substância agregativa (Gilmore *et al.*, 2002 *et al.*, 2014). Seu mecanismo de virulência está associado a sua capacidade de promover a lise de células vermelhas e a lise de macrófagos e neutrófilos, contribuindo para a evasão das defesas do sistema imunológico do hospedeiro, e relacionada ao aumento da severidade das infecções enterocócicas (Fiore *et al.*, 2019; Ghosh; Dowd; Zurek, 2011).

Entre os genes associados a amostras hospitalares de *E. faecium*, destaca-se o *hylEfm*. Inicialmente identificada como hialuronidase, a proteína Hyl é na verdade uma glicosil hidrolase. Embora ainda não haja evidências diretas de sua contribuição para a patogenicidade da espécie, estudos indicam sua associação com o aumento da capacidade de colonização de *E. faecium* no trato gastrointestinal e da virulência de amostras comensais em casos de peritonite experimental (Arias *et al.*, 2009). O gene *hyl* é predominantemente encontrado em amostras clínicas de *E. faecium*, localizado em uma ilha genômica cromossômica, flanqueado por cópias da *IS1476*. Além disso, é comum encontrá-lo em megaplasmídeos como o pLG1, que pode ser transferido horizontalmente entre bactérias desta espécie, embora não para *E. faecalis*, conforme demonstrado experimentalmente (Arias *et al.*, 2009). Embora, até onde se tem informação, não existam muitos estudos que indiquem o potencial dessa proteína como fator de virulência, foi

sugerido que ela poderia levar à cotransferência e disseminação de genes de resistência a antimicrobianos (Arias *et al.*, 2009).

Exclusivamente presente em isolados de *E. faecium*, o antígeno secretado A (SagA) é uma proteína relacionada ao estresse, que aparentemente também desempenha um papel no crescimento celular, possivelmente através de interações com o metabolismo da parede celular (Teng *et al.*, 2003). Além disso, SagA pode se ligar a várias proteínas da matriz extracelular e também foi associada à formação de biofilmes, mas apenas em enterococos pertencentes ao clado A1 relacionado a amostras hospitalares (Paganelli; Willems; Leavis, 2012; Pedicord *et al.*, 2016).

As MSCRAMMs (do inglês, *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) são elementos essenciais na superfície celular bacteriana que reconhecem e se ligam a moléculas na matriz extracelular do hospedeiro, desempenhando um papel crucial nos estágios iniciais da infecção (Patti; Höök, 1994). Em *Enterococcus*, algumas dessas proteínas já foram bem caracterizadas, incluindo as adesinas de colágeno Ace, Acm e EcbA. A Ace, codificada pelo gene *ace* e presente em amostras de *E. faecalis*, é associada ao aumento da colonização das valvas cardíacas, desempenhando um papel importante no desenvolvimento da endocardite enterocócica. Por outro lado, a Acm, codificada pelo gene *acm*, é uma proteína homóloga encontrada em aproximadamente 99% das amostras de *E. faecium* isoladas de IRAS (García-Solache; Rice, 2019; Gilmore *et al.*, 2002).

Assim como a AS e a Esp, as adesinas de colágeno possuem o motivo estrutural LPXTG, que é a região da proteína que se ancora à superfície bacteriana através de sua ligação ao peptidoglicano da parede celular (Miller *et al.*, 2016). A EfaA é um antígeno de superfície chave de *E. faecalis*, identificado através da análise de soros de pacientes diagnosticados com endocardite causada por *E. faecalis*. O gene *efaA* faz parte de um operon composto por três genes, *efaBCA*, que se prevê codificar componentes de um transportador do tipo ABC, onde EfaA desempenha o papel de lipoproteína ligante de substrato (Lowe; Lambert; Smith, 1995).

A metaloprotease Eep, codificada pelo gene *eep*, é produzida por *E. faecalis* e está associada à produção de feromônios por células receptoras de plasmídeos. É possível que esta proteína esteja envolvida no processamento de moléculas precursoras de feromônio ou que, de alguma forma, regule a expressão ou a secreção dessas substâncias. A presença do gene *eep* também pode influenciar a síntese de outros feromônios, destacando a

importância desse regulador nos processos de transferência horizontal de genes em enterococos e, conseqüentemente, na disseminação de determinantes de resistência ou virulência que contribuem para a adaptação desses microrganismos a diferentes pressões seletivas (Clewell, 1993; Gilmore *et al.*, 2002). Alguns outros exemplos de feromônios nas espécies de enterococos são Cpd, Cob e Ccf (Fiore *et al.*, 2019).

As estruturas superficiais são determinantes importantes de virulência para muitos patógenos: especificamente, a presença de uma cápsula pode permitir que o microrganismo evite o sistema imunológico do hospedeiro. De fato, vários polissacarídeos da parede celular com implicações na patogênese das infecções enterocócicas têm sido relatados. *E. faecalis* codifica dois grupos de genes que são conhecidos por contribuir para a biossíntese da cápsula: os genes *epa* e *cps*. Os genes *epa* são considerados contribuintes para a produção de uma cápsula de polissacarídeo contendo ramanose, enquanto o agrupamento de genes *cps* produz polissacarídeos compostos por glicose e galactose, às vezes referidos como dieteroglicanos (Gilmore *et al.*, 2002; Leavis *et al.*, 2004)

Os pili se estendem a partir da superfície das células bacterianas e estão envolvidos em uma variedade de funções, como motilidade, adesão e conjugação. Em *E. faecalis* e *E. faecium*, os pili desempenham um papel importante na ligação das bactérias às células hospedeiras e na formação de biofilmes, que podem proteger as bactérias do sistema imunológico do hospedeiro e dos antimicrobianos. As características específicas e funções dos pili bacterianos podem variar dependendo da espécie bacteriana e do tipo. Em *E. faecalis*, as proteínas Ebp (pili associados à endocardite e biofilme), nomeadamente EbpA, EbpB e EbpC, são componentes dos pili Ebp (Fiore *et al.*, 2019; Gilmore *et al.*, 2002). Dois outros genes, *pilA* e *pilB*, também estão relacionados à produção de pili em *Enterococcus*. Esses dois tipos de pili, PilA e PilB, são distintos em sua composição e função. Esses pili apresentam diferenças fenotípicas, devido à composição de diferentes subunidades de pilina. Para formarem-se, as bactérias geralmente requerem um ambiente de temperatura elevada (Hendrickx *et al.*, 2008, 2010; Kim *et al.*, 2010).

O gene *tpx* em *Enterococcus* codifica a enzima tiorredoxina peroxidase (Tpx), crucial na proteção contra estresses oxidativos intracelulares. Em situações de estresse oxidativo, como exposição a peróxidos, a Tpx catalisa a redução desses compostos oxidantes, evitando danos celulares. Possui uma estrutura única com cisteínas reativas na região ativa, essenciais para sua eficiente atividade antioxidante. Altamente conservado entre amostras bacterianas, sugere-se que a Tpx desempenha papel fundamental na resposta

ao estresse oxidativo em *Enterococcus* e na sua adaptação a diversos ambientes. Estudos indicam que a expressão do gene *tpx* pode ser regulada por fatores ambientais, como a presença de peróxidos, permitindo à bactéria ajustar sua resposta a condições específicas e utilizar a Tpx como uma ferramenta adaptativa contra o estresse oxidativo.

A identificação de determinantes genéticos de virulência nos enterococos (**Quadro 2**), bem como a compreensão das funções de seus produtos, é essencial para integrar conhecimentos que elucidem não só os mecanismos de patogenicidade dessas bactérias, mas também que forneçam noções sobre a disseminação e a trajetória evolutiva de diferentes linhagens (Van Tyne; Gilmore, 2014).

Quadro 2 - Fatores de Virulência: Genes, Operons e Mecanismos Associados

Fatores de virulência	Genes/Operons	Mecanismo de Virulência
Substâncias Secretadas	<i>hyl, gelE, fsr(A/B/C), cyl, e sprE</i>	Favorecem a resistência às defesas do hospedeiro facilitando a colonização e disseminação nos tecidos.
Substâncias Agregativas	<i>agg</i> e <i>asa1</i>	Substâncias que promovem a agregação bacteriana, facilitando a formação de biofilmes e adesão a superfícies.
Proteínas de Superfície	<i>esp, sgrA</i> e <i>efaA</i>	Codificam proteínas de parede celular envolvidas na conjugação e adesão a células eucarióticas.
Proteínas MSCRAMMS	<i>ace, acm, scm, ecbA</i> e <i>fss</i> (1-3)	Codificam proteínas bacterianas que aderem a componentes da matriz extracelular do hospedeiro.
Feromônios	<i>eep, cob, cpd</i> e <i>cad</i>	Controlam a produção, detecção e resposta a feromônios.
Pili	<i>pilA, pilB</i> e <i>ebp(A/B/C)</i>	Codificam filamentos na superfície bacteriana que aderem a diferentes superfícies facilitando a formação de biofilme
Cápsula Polissacarídica	<i>cps(A-K)</i>	Codificam polissacarídeos capsulares e polissacarídeos de parede celular antifagocíticos.
Tiorredoxina Peroxidase	<i>Txp</i>	Catalisa a redução de compostos oxidativos evitando danos celulares.

1.3.3 Genes Associados à Tolerância a Microbicidas e a Metais

Biocidas e metais são amplamente utilizados em diversos setores, como medicina, agricultura, aquicultura e indústria, com um histórico que remonta a séculos, antecedendo até mesmo a teoria dos germes de Pasteur e os postulados desenvolvidos por Koch (Craig, 1986; Fraise; Maillard; Sattar, 2012; Hobman; Crossman, 2015; Joseph Lister, 1867; Lemire; Harrison; Turner, 2013).

Os biocidas antimicrobianos, também conhecidos como microbicidas, possuem um amplo espectro de atividade contra microrganismos e são mais versáteis em sua aplicabilidade do que os antimicrobianos. Projetados para agir de forma letal em uma única aplicação, os microbicidas atingem múltiplos alvos estruturais e bioquímicos, resultando em um impacto abrangente nos microrganismos (Jones; Joshi, 2021).

Atualmente, uma variedade de agentes microbicidas é utilizada em ambientes hospitalares e de cuidados de saúde, destacando-se os compostos de amônio quaternário (QACs - *quaternary ammonium compounds*), a Clorexidina e o Triclosan. A lista de QACs é extensa, e eles são amplamente utilizados em desinfetantes, antissépticos, produtos de limpeza, itens de cuidados pessoais e até mesmo em medicamentos, ocasionalmente combinados com outros desinfetantes como a clorexidina. A atividade microbicida dos QACs está fundamentada na interação do produto com as membranas citoplasmáticas, causando distúrbios na estrutura e integridade da membrana e resultando no extravasamento do conteúdo citoplasmático. Além disso, quando absorvidos pela célula, os QACs induzem à desnaturação de proteínas citoplasmáticas e se ligam ao DNA (Jones *et al.*, 2021; Maillard *et al.*, 2021; Maillard *et al.*, 2024).

A clorexidina, desenvolvida em 1950 e presente no mercado desde 1954, ganhou considerável popularidade no cuidado de pacientes, especialmente nas últimas duas décadas. Este desinfetante é amplamente utilizado na pele e membranas mucosas de pacientes e profissionais de saúde. Ademais, também em aplicação em diversos produtos de consumo, como géis desinfetantes para as mãos e enxaguatórios bucais. Sua eficácia microbicida está fundamentada na capacidade de se ligar às membranas citoplasmáticas carregadas negativamente e penetrar nas células. Em baixas concentrações, inibe enzimas nas membranas e aumenta a permeabilidade, impedindo o crescimento celular. Em concentrações mais elevadas, coagula proteínas citoplasmáticas, neutraliza o potencial de membrana e desativa a

enzima ATPase, resultando na eliminação da célula bacteriana (Jones; Joshi, 2021; Maillard, 2021; Maillard; Pascoe, 2024).

O Triclosan, originário do fenol, um fluido de nebulização desinfetante introduzido pelo cirurgião Lister em 1865, é amplamente utilizado como agente antimicrobiano em produtos de higiene e implantes médicos. Sua presença em águas superficiais e sedimentos é comum devido ao uso generalizado e à sua baixa degradabilidade (Apua, 2011). Nos EUA, centenas de toneladas são liberadas anualmente no meio ambiente por empresas de purificação de água. Estudos revelaram que cerca de 75% da população americana tinha traços de triclosan na urina, correlacionando-se com o uso de produtos contendo o agente, como enxaguatórios bucais e protetores solares (Calafat *et al.*, 2008). Além disso, o triclosan é frequentemente encontrado no leite materno e no muco nasal humano (Jones; Joshi, 2021; Maillard, 2021; Pal *et al.*, 2017; Syed *et al.*, 2014).

A maioria dos microbicidas modernos surgiu no século XX. Com o crescente conhecimento público sobre infecções e "superbactérias", tornou-se difícil encontrar produtos de higiene que não contenham microbicidas. Esse fenômeno se intensificou após a pandemia de COVID-19, que aumentou a demanda global por microbicidas em cerca de 600%. Esse aumento reflete a maior utilização de produtos de desinfecção e antissepsia, resultando em uma maior exposição bacteriana a esses compostos (Maillard; Pascoe, 2024).

O uso inadequado ou baixas concentrações de um microbicida podem atuar como um estressor sem matar patógenos bacterianos, que em resposta, desenvolvem vários mecanismos para prevenir o efeito prejudicial causado pelo microbicida. Esses mecanismos visam diminuir suficientemente a concentração do agente até que não seja mais danoso para as células bacterianas (Maillard; Pascoe, 2024).

Há diversas definições de resistência a microbicidas, algumas indicando apenas uma leve redução na suscetibilidade, ao contrário da resistência bacteriana a antimicrobianos, que está mais associada à resistência clínica. A variedade de termos utilizados, como "resistência", "tolerância" e "susceptibilidade reduzida" evidencia a falta de consenso na comunidade científica. Em termos práticos, uma bactéria que sobrevive a um microbicida é considerada resistente, independentemente da concentração do produto (Maillard, 2018).

A resistência aos microbicidas pode surgir devido a mutações genéticas, amplificação de genes cromossômicos ou aquisição de genes de resistência em elementos genéticos extracromossômicos, como plasmídeos e transposons. Essa resistência pode envolver diferentes estratégias, incluindo mudanças na membrana celular que afetam a absorção ou a

expressão de mecanismos de bomba de efluxo. A resistência por inativação do microbicida é rara e específica para algumas classes de agentes microbicidas (Maillard, 2021; Maillard; Pascoe, 2024).

As principais bombas de efluxo em enterococos incluem a EfrAB, pertencente à superfamília de transportadores de efluxo de múltiplas drogas ABC (*ATP-binding cassette*), e a EmeA, uma superfamília de facilitadores principais (MFS - *major facilitator superfamily*) homóloga à NorA de *Staphylococcus aureus*. Ambas as bombas de efluxo foram identificadas em amostras de *E. faecium* e *E. faecalis* (Gaca; Lemos, 2019; Syed *et al.*, 2014).

A EfrAB, que só é ativa quando os genes *efrA* e *efrB* são co-expressos, consiste em transportadores de membrana que colaboram para expulsar compostos tóxicos ou indesejáveis da célula bacteriana para o ambiente externo. Essa bomba de efluxo já foi descrita associada a resistência a desinfetantes como triclosan e clorexidina, bem como a antissépticos como a acriflavina (Lavilla Lerma *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2003; Pazoles *et al.*, 2001).

Por sua vez, a bomba de efluxo de resistência a múltiplas drogas em enterococos, EmeA (Enterococcal Multidrug Resistance Efflux), é codificada pelo gene *emeA* e transportada por um elemento genético transferível no cromossomo do *Enterococcus* spp. Essa bomba também foi implicada na resistência a Clorexidina e ao cloreto de benzalcônio, um composto de amônio quaternário (Poole, 2005; Sobhanipoor *et al.*, 2021).

Os genes *chtS* e *chtR* são responsáveis pela tolerância à Clorexidina em algumas amostras de *E. faecium*, especialmente aos pertencentes ao Clado A1, associado ao ambiente hospitalar em estudos filogenéticos, como parte do operon 2CS-CHX. O *chtS* codifica uma histidina quinase, enquanto o *chtR* codifica um regulador de resposta de ligação ao DNA. Juntos, formam um sistema que regula a expressão desses genes. É importante destacar que fenótipos de tolerância estão intimamente ligados a um único polimorfismo de aminoácido não sinônimo (P102H) presente no *chtR* (Duarte *et al.*, 2019; Guzmán Prieto, *et al.*, 2017).

Metais, diferentemente dos microbicidas, são elementos abundantemente presentes no ambiente de forma natural. E apesar de certos metais desempenharem funções celulares que não podem ser exercidas por moléculas orgânicas, certos metais não essenciais são extremamente tóxicos para a maioria das bactérias e têm atividade microbicida em concentrações excepcionalmente baixas e por conta da sua potente toxicidade, compostos metálicos como: mercúrio, sais de prata, ouro, telúrio, cádmio, e compostos inorgânicos e orgânicos de arsênio e antimônio têm sido utilizados como antimicrobianos há décadas, antes mesmo do uso generalizado de antibióticos (Hobman; Crossman, 2015; Pal *et al.*, 2017).

Por conta de suas propriedades antibacterianas e antifúngicas, produtos contendo metais são regularmente utilizados na medicina (Lemire; Harrison; Turner, 2013). O mercúrio é utilizado em amálgamas em obturações dentárias, e seus compostos são usados como conservantes ou antissépticos em tintas, cosméticos, medicamentos e vacinas. Por exemplo, o timerosal é um composto contendo mercúrio utilizado como conservante em vacinas contra hepatite B, difteria, coqueluche, e tétano no Brasil (Osinka; Pasternak, 2014).

O cobre é utilizado em dispositivos contraceptivos intrauterinos, e novos biomateriais contendo cobre, que exibem propriedades únicas na proteção do sistema cardiovascular, na promoção da cicatrização de fraturas ósseas e na produção de efeitos antibacterianos vem sendo desenvolvidos. O cobre também pode ser utilizado na promoção da cicatrização de feridas incisionais, na eliminação de células cancerígenas (Wang *et al.*, 2021a). Além disso, metais antimicrobianos, como arsênio, mercúrio, cobre e cádmio, têm sido usados para muitos outros fins além dos cuidados de saúde, como promotores de crescimento em rações, particularmente na produção de suínos e aves e em sistemas de saneamento de Água (Lemire; Harrison; Turner, 2013; Nriagu, 1996).

As concentrações de metais variam no ambiente e, semelhante ao que ocorreu com os antimicrobianos, as bactérias desenvolveram mecanismos de resistência a esses compostos ao longo do tempo. A fim de manter níveis intracelulares de metais suficientes para um crescimento equilibrado e, ao mesmo tempo, evitar o acúmulo de substâncias tóxicas, isto é, a homeostase dos metais, as bactérias desenvolveram sistemas sofisticados para regular a absorção e o efluxo de metais, como a formação de complexos metálicos ou o sequestro e desintoxicação de metais, reduzindo íons intracelulares e expelindo metais através de bombas de efluxo (Pal *et al.*, 2017).

A resistência ao mercúrio (Hg) é reconhecida como a primeira forma de resistência a metais descoberta em bactérias. O mecanismo subjacente envolve a conversão da forma tóxica do mercúrio (Hg^{2+}) em uma forma menos prejudicial (Hg^0), mediada pela enzima citoplasmática mercúrio redutase, codificada pelo gene *merA* presente no operon *mer*. Este operon, frequentemente encontrado em plasmídeos bacterianos, abriga uma série de genes que coordenam a detecção, eliminação, transporte e redução do mercúrio. Em diversas espécies de *Enterococcus* spp., a presença desse gene confere resistência ao mercúrio (Pal *et al.*, 2017; Rebelo *et al.*, 2021; Zscheck; Murray, 1990).

O cobre (Cu), com sua capacidade de alternar entre Cu^{2+} e Cu^+ , é fundamental em muitos processos enzimáticos, mas sua toxicidade em concentrações elevadas exige um

controle rigoroso. As bactérias desenvolvem mecanismos para equilibrar o cobre, incluindo o gene *tcrB* (*transferable copper resistance gene B*) encontrado em plasmídeos de *Enterococcus*. Esse gene, parte do operon *tcrYAZB*, regula a homeostase do cobre, garantindo níveis seguros dentro da célula, mesmo em ambientes com altas concentrações. Isso é alcançado por meio de diferentes estratégias, como a redução da entrada de cobre, sua exportação ou ligação a proteínas específicas que o tornam menos tóxico (Hasman, 2005; Hasman; Aarestrup, 2002). Além do gene *tcrB*, o gene *cueO* também desempenha um papel importante na resistência ao cobre em *Enterococcus*. Codificando uma Multicobre Oxidase (MCO), o *cueO* transforma Cu(I) em Cu(II), menos tóxico, em condições aeróbias, conferindo proteção contra altas concentrações de cobre. Este gene frequentemente coexiste com *tcrB*, localizando-se próximo ao operon *tcrYAZB*. A ação do *cueO* é provavelmente regulada pelo sistema de dois componentes, *cusR* e *cusS*, que expressam as proteínas que detectam e respondem à presença de Cu(I) (Silveira *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015a, 2015b).

Uma estratégia proeminente de resistência ao cádmio (Cd) em bactérias Gram-positivas envolve o operon *cad*, inicialmente descobertos em *Staphylococcus aureus*. Esses operons, que incluem os genes *cadA*, *cadC* e *cadD*, são comumente transportados por elementos genéticos móveis, como plasmídeos e cassetes cromossômicos, e frequentemente co-localizados com genes de resistência a antimicrobianos. O gene *cadA* é especialmente relevante, conferindo alta resistência ao Cd ao codificar uma bomba de efluxo que diminui o acúmulo intracelular de cádmio. Sua atividade, demonstrada como dependente de ATP, implicando em consumo energético, sendo classificado como uma ATPase do tipo classe P (Argudín; Hoefler; Butaye, 2019; Oger; Mahillon; Petit, 2003).

A co-seleção de resistência a antimicrobianos, desencadeada pela exposição a metais e microbicidas em bactérias, desempenha um papel crucial na manutenção e propagação dessa resistência mesmo na ausência de antimicrobianos. Esse fenômeno é primariamente impulsionado por mecanismos de resistência cruzada ou co-resistência. A resistência cruzada ocorre quando um único mecanismo, como uma bomba de efluxo, confere resistência a diferentes compostos simultaneamente. Por outro lado, a co-resistência se manifesta quando dois ou mais genes de resistência diferentes estão fisicamente agrupados no mesmo elemento genético, como um plasmídeo, transposon ou ilhas genômicas, ou estão presentes na mesma célula bacteriana, cada um conferindo resistência a diferentes compostos.

Por exemplo, foi descrito que a resistência cruzada entre a clorexidina e a gentamicina, bem como entre a clorexidina e a estreptomicina em *E. faecalis*, e entre a clorexidina e o

cloranfenicol em *E. faecium*, é mediada pela bomba de efluxo EfrAB. A inibição dessa bomba de efluxo, utilizando EDTA, levou a um aumento significativo na susceptibilidade tanto aos antimicrobianos quanto aos microbicidas (Lavilla Lerma *et al.*, 2014). Além disso, a inativação da EmeA contribuiu para uma redução na resistência a fluoroquinolonas, lincosamidas, macrolídeos e novobiocina em *E. faecalis* (Jonas; Murray; Weinstock, 2001).

A co-resistência a antimicrobianos e a microbicidas e metais em *Enterococcus* representa um desafio na contenção de amostras multirresistentes. Estudos têm demonstrado a presença de genes de resistência tanto a antimicrobianos quanto a microbicidas e metais em *Enterococcus*, por exemplo, é comum encontrar o operon *mer* em transposons presentes em plasmídeos e o operon *tcrYAZB* em plasmídeos, juntamente com genes de resistência aos antimicrobianos, como o gene *aadK*, que confere resistência à estreptomicina, o gene *tet(M)*, responsável pela resistência à tetraciclina, o gene *erm(B)*, associado à resistência aos macrolídeos, e o operon *van*, relacionado à resistência à vancomicina, em *E. faecium* e *E. faecalis* (Amachawadi *et al.*, 2013; Belloso Daza *et al.*, 2022; Biggel *et al.*, 2021; Hasman, 2005; Mourão *et al.*, 2016; Rebelo *et al.*, 2021; Wist *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2015). Além disso, o gene *cadA* já foi identificado em amostras multirresistentes de *E. faecium* e *E. faecalis* (Belloso Daza *et al.*, 2022; Wist *et al.*, 2020). Recentemente, também foi descrito a sua presença no recém-descoberto plasmídeo pES-fosB de *E. faecalis*, o qual também carrega o gene *fosB* que confere resistência à fosfomicina (Wang *et al.*, 2021b).

Compreender o contexto da presença de genes de resistência a antimicrobianos em *Enterococcus*, incluindo sua relação com diferentes elementos genéticos móveis, como integrons, transposons e plasmídeos é fundamental para entender os riscos envolvidos na transferência horizontal de genes de resistência e a manutenção de amostras multirresistentes.

1.4 Transferência horizontal de genes em *Enterococcus*

A transferência horizontal de genes (THG) é uma força motriz crucial na adaptação bacteriana, permitindo que as bactérias adquiram rapidamente novas características. A capacidade de incorporar EGMs, como os transportam genes que conferem resistência a antimicrobianos e características da virulência, desempenha um papel significativo no destaque dos enterococos, particularmente *E. faecium* e *E. faecalis*, como um dos principais patógenos hospitalares. O sequenciamento do genoma enterocócico revelou a presença de um amplo genoma acessório, com destaque para *E. faecium* (Leavis *et al.*, 2007; Partridge *et al.*, 2018; Paulsen *et al.*, 2003).

A conjugação representa o principal mecanismo de mobilidade de DNA e aquisição de novas características em enterococos. Em *E. faecalis*, os feromônios sexuais peptídicos secretados por células receptoras desencadeiam funções de acasalamento associadas à conjugação, as quais são determinadas por determinados plasmídeos (Hegstad *et al.*, 2010).

Os enterococos são reconhecidos como proeminentes na aquisição e disseminação de genes de resistência, tendo a capacidade de adquirir determinantes de resistência em transferência por espécies de dentro do gênero e fora dele. Consequente, é preocupante o fato de que podem transferir esses genes para outras bactérias potencialmente patogênicas, como demonstrado em estudos que identificaram a capacidade dos enterococos de transferir genes de resistência para bactérias clinicamente relevantes, incluindo *Clostridium difficile*, *E. coli*, *S. aureus*, *Streptococcus* e *Listeria* spp. (Cartman *et al.*, 2010; Charpentier; Courvalin, 1999; De Niederhäusern *et al.*, 2011; Kurenbach *et al.*, 2003; Noble *et al.*, 1996). Considerando a abundância tanto de compostos antimicrobianos quanto de microorganismos no ambiente hospitalar, esse ambiente pode ser considerado um local perfeito para a transferência de determinantes de resistência e virulência, fazendo com que os enterococos estejam posicionados em um ponto crítico para a transferência genética.

1.5 Plasmídeos e outros EGMs

As espécies *E. faecalis* e *E. faecium* se adaptaram a ambientes nosocomiais devido à sua capacidade de adquirir EGMs por meio da transferência horizontal de genes. Essa transferência facilita a aquisição de características novas, incluindo genes que promovem a virulência e resistência a diversos compostos (Johnson *et al.*, 2021). Em adição, os genes móveis que ampliam a resistência clínica em enterococos são geneticamente similares aos genes encontrados em outros gêneros bacterianos, sugerindo sua ampla distribuição entre patógenos (Hegstad *et al.*, 2010). As amostras clínicas de *E. faecium* têm o dobro de genes associados a EGMs em comparação com as amostras de origem não clínicas, de forma similar, isolados clínicos de *E. faecalis* foram observados compostos por até 25% de EGMs (Johnson *et al.*, 2021).

Os elementos genéticos móveis podem ser geralmente divididos em dois tipos principais: aqueles capazes de se deslocarem de uma célula bacteriana para outra, como plasmídeos e transposons conjugativos, e elementos que podem migrar de uma localização genética para outra na mesma célula (elementos transponíveis), como elementos IS, transposons, cassetes de integron e plasmídeos mobilizáveis. Esses elementos transponíveis

podem ser transferidos para um plasmídeo ou transposon conjugativo, facilitando, assim, sua disseminação entre células bacterianas (Bennett *et al.*, 2008).

Além de proporcionarem vantagens às células hospedeiras, esses EGMs oferecem uma ampla gama de oportunidades em termos de diversidade genética. Os cassetes de transposons e integrons requerem recombinação para serem transferidos entre diferentes locais de DNA. Portanto, quando integrados a um plasmídeo, isso pode resultar em rearranjos no DNA plasmidial, aumentando ainda mais sua diversidade (Hegstad *et al.*, 2010). Frequentemente, quando um gene é transferido para um plasmídeo, o número de cópias desse gene na célula aumentará acima de uma unidade por célula, aumentando assim a taxa geral de mutação para esse gene (Hegstad *et al.*, 2010).

Apesar dos benefícios aos organismos, EGMs podem inicialmente impor custos metabólicos significativos às bactérias, como a síntese adicional de macromoléculas para a manutenção de plasmídeos e a produção de estruturas necessárias para a conjugação. No entanto, ao longo do tempo, esses custos podem ser mitigados pela evolução adaptativa, permitindo que os benefícios dos genes acessórios dos plasmídeos superem suas desvantagens iniciais (Johnson *et al.*, 2021).

Plasmídeos transferíveis (mobilizáveis e conjugativos) desempenham papéis fundamentais na transferência horizontal de genes bacterianos e transposons (Wendt, *et al.*, 1998), impulsionando assim a adaptação bacteriana. Funcionam como um vasto reservatório de variabilidade genética compartilhado entre muitas espécies bacterianas, apresentando uma rica diversidade de formas, funções e utilidades. Esses elementos são definidos como segmentos genéticos extracromossômicos que se replicam de forma independente ao cromossomo bacteriano, embora a maioria das funções de replicação seja fornecida pela célula hospedeira (Garcillán-Barcia; Redondo-Salvo; De La Cruz, 2023; Weaver; Rice; Churchward, 2002).

Geralmente, os plasmídeos são moléculas circulares de DNA de fita dupla, embora em algumas bactérias possam ocorrer plasmídeos lineares. No contexto dos enterococos, os plasmídeos são abundantes e parecem desempenhar um papel significativo na adaptação hospitalar onde antimicrobianos utilizados no combate às infecções por enterococos, como tetraciclina, aminoglicosídeos e eritromicina, foram neutralizados devido a emergência de genes de resistência que foram rapidamente disseminados entre os enterococos via EGMs (Arredondo-Alonso *et al.*, 2020a; Fiore *et al.*, 2019; Kristich *et al.*, 2014). Em adição a esse fato, genes de resistência a outros compostos como metais pesados e outros microbicidas

também vêm sendo encontrados e descritos em plasmídeos (Hasman; Aarestrup, 2002; Pal *et al.*, 2015, 2017; Zhang *et al.*, 2015).

Os plasmídeos eram tradicionalmente divididos em seis famílias com base em seus iniciadores de replicação: Rep_3, Inc18 e RepA_N para theta-replicantes, e Rep_trans, Rep_1 e Rep_2 para plasmídeos replicantes por círculo rolante (RCR). Plasmídeos Inc18 constituem um grande grupo de elementos com um largo espectro de hospedeiros, sendo frequentemente encontrados no gênero *Enterococcus*, especialmente na espécie *E. faecium*. Dois dos plasmídeos tipo Inc18 mais bem caracterizados são o pAMb1 (originalmente identificado em *E. faecalis*), o qual codifica resistência a macrólídeos, lincosamidas e estreptogramina B; e pIP501, o qual codifica, adicionalmente, resistência ao cloranfenicol. Já os principais mediadores da resistência à vancomicina em *E. faecalis* e *E. faecium* são plasmídeos como pHTb, os quais transportam o transposon *Tn1546*, e pMG1. O transposon *Tn1546* está presente num vasto número de plasmídeos (Jensen *et al.*, 2010).

Com o aumento das sequências em bancos de dados públicos, tornou-se evidente que os plasmídeos são estruturas dinâmicas e plásticas, exigindo um sistema de classificação mais eficiente para estudos epidemiológicos sobre sua transmissão e sobretudo entre bactérias inseridas sob as mesmas pressões seletivas ou até mesmos em diferentes ambientes. A técnica de tipagem de plasmídeos, baseada na identificação de regiões de replicação por PCR, emergiu como uma ferramenta essencial para auxiliar a epidemiologia genética e compreensão dos elementos plasmidiais envolvidos na transferência horizontal em enterococos e outras bactérias Gram-positivas. Avanços por meio dessa metodologia possibilitaram classificar os plasmídeos de enterococos e outras bactérias Gram-positivas em mais de 20 famílias de replicons conhecidas como famílias *rep* (Leavis *et al.*, 2007).

Enterococcus possuem uma grande variedade de famílias *rep* de plasmídeos. Na espécie *E. faecalis* já foram identificadas *rep1*, *rep2*, *rep6*, *rep8*, *rep9*, *rep11*, *rep18* e alguns plasmídeos únicos. Já em *E. faecium* foram detectadas as famílias *rep 2*, *rep4*, *rep11*, *rep14*, *rep17* e *rep18*, além de plasmídeos únicos. A família *rep1* contém 11 membros e reúne plasmídeos pertencentes à família Inc18, além de ser caracteristicamente encontrada em espécies com menores conteúdos de % G+C, como em enterococos, estreptococos e *S. aureus*. A família *rep2* é composta por plasmídeos que codificam para toxinas e resistência aos antimicrobianos, sendo identificada com frequência em enterococos (Bennett, 2008; Clewell, 1993; Garcillán-Barcia, *et al.*, 2014; Redondo-Salvo, *et al.*, 2023; Weaver; Rice; Churchward, 2002). A família *rep4* contém pequenos plasmídeos identificados em

Lactobacillus spp e em amostras de *E. faecium* (Jensen, 2010). Já *rep6* inclui plasmídeos presentes em *E. faecalis* e menos frequentemente em *Streptococcus gallolyticus* (Wang, *et al.*, 2021). Dois plasmídeos que utilizam feromônio para a conjugação, pAM373 e pEJ97-1, originalmente encontrados em *E. faecalis* pertencem a família *rep8* (Partridge, *et al.*, 2018), bem como cinco membros pertencentes à família *rep9* que também são feromônio-dependentes, como pCF10. Os plasmídeos pTEFtal1 e pTEF2 que codificam para resistência aos glicopeptídeos em *E. faecalis* são pertencentes a *rep9* (Paulsen, *et al.*, 2010). Na família *rep11* foram encontrados quatro plasmídeos identificados em enterococos, e contém genes para a produção de toxinas (Partridge, *et al.*, 2018), enquanto *rep14* reúne pequenos plasmídeos mobilizáveis, incluindo o pRI1 (García-Solache; Rice, 2016). A família *rep17* inclui o pRUM, que é um plasmídeo conjugativo com características de multirresistência e exibe uma estrutura de mosaico, indicando uma provável recombinação por co-integração e transposição. Resquícios de vários genes *rep* também foram encontrados em pRUM o que sustenta esta hipótese (Garcillán-Barcia; Redondo-Salvo; De La Cruz, 2023). Por outro lado, *rep18* ainda é pouco estudada, porém foram encontrados ORFs de enterococos em ensaios de sequenciamento desses plasmídeos (García-Solache; Rice, 2016).

Análises das sequências de plasmídeos têm revelado que estes elementos não são estruturas estáticas, mas que se recombina de modo a formar derivados com replicação híbrida e funções de manutenção, servindo de um meio de aquisição, por exemplo, de múltiplos genes de resistência aos antimicrobianos. Um exemplo disto é o plasmídeo pRE25 de *E. faecalis* com 50kb, que contém genes de resistência para 12 antimicrobianos, sendo que 30,5kb da sua sequência é derivada do plasmídeo pIP501 e o restante constituem regiões que parecem ter origem em um plasmídeo comum em estafilococos (Kurenbach, *et al.*, 2003). Existe um grupo particular de plasmídeos conjugativos, com um pequeno espectro de hospedeiros, os quais respondem a feromônios. Este tipo de plasmídeo tem sido descrito em *E. faecalis*, sendo raro em outras espécies de enterococos, são eles: pAD1, pAM373 e pCF10 (Hegstad, *et al.*, 2010). Plasmídeos que respondem a feromônios conferem características adicionais a *E. faecalis*, tais como a expressão de bacteriocinas e citolisina, além de resistência à luz ultravioleta e a antimicrobianos. Embora a resistência à vancomicina seja pouco comum neste tipo de plasmídeos, já foi identificada a presença do gene *vanB* num plasmídeo que responde a feromônios, em uma amostra clínica de *E. faecalis* isolada no Japão (Wend, *et al.*, 1998).

De outra forma, os elementos que codificam apenas as funções necessárias para a transposição são conhecidos como elementos de sequência de inserção (IS, do inglês *Insertion Sequence*). Os elementos IS são amplamente distribuídos e mais de 2000 ISs diferentes foram identificados. As ISs são abundantes em enterococos, especialmente em *E. faecium*, onde parecem desempenhar um papel importante na adaptação hospitalar (Leavis *et al.*, 2007).

Os elementos transponíveis que codificam outros genes além dos necessários para transposição como, por exemplo, aqueles relacionados à resistência a antimicrobianos, são chamados de transposons. Um transposon pode ser classificado como transposon composto ou transposon complexo. Quando os elementos IS funcionam em um par para mover o segmento de DNA preso entre eles, o elemento é chamado de transposon composto. Os mecanismos de transposição para transposons compostos geralmente seguem os de seus elementos IS (Gilmore; Lebreton; Van Schaik, 2013; Mahillon; Chandler, 1998). Transposons compostos em enterococos estão principalmente associados à resistência aos aminoglicosídeos, mas alguns carregam resistência a glicopeptídeos (MILLER *et al.*, 2014).

Os transposons complexos têm uma estrutura mais robusta do que outros elementos transponíveis. Possuem uma estrutura composta por regiões terminais repetidas invertidas (IR) para reconhecimento pela transposase e genes que codificam essa enzima. Codifica a enzima transposase, responsável pela excisão e reintegração do transposon em outro local no DNA. Os genes que não possuem funções de transposição são integrados ao corpo do elemento, contendo genes acessórios, como aqueles associados à resistência a antimicrobianos, frequentemente organizados em forma de operons e podendo conter promotores e reguladores associados aos genes acessórios e, garantindo a expressão coordenada desses genes (Bennett *et al.*, 2008). Os transposons complexos variam em tamanho e podem carregar diferentes genes, além dos que codificam a transposição, incluindo transposons compostos e integrons (Bennett *et al.*, 2008). Alguns transposons complexos possuem genes que auxiliam na conjugação bacteriana apresentando capacidade de autotransferência. Os transposons complexos mobilizáveis e conjugativos são amplamente distribuídos em enterococos e frequentemente são importantes contribuintes para a resistência aos antimicrobianos nesse gênero (Arredondo-Alonso *et al.*, 2020a). O transposon complexo mais importante é o *Tn1546*, em grande parte responsável pela emergência da resistência à vancomicina em *E. faecium* (Arias; Murray, 2012).

As ilhas genômicas são regiões distintas dentro do cromossomo, caracterizadas por um conteúdo de Guanina e Citosina (G+C) diferente do genoma central. Essa diferença no

conteúdo G+C sugere uma origem evolutiva distinta, indicando que esses elementos provavelmente foram adquiridos por meio de transferência horizontal de genes. Além disso, as ilhas genômicas têm a capacidade de codificar genes envolvidos em sua própria transferência, apresentando o caráter de conjugação e auto transferência. Um subconjunto dessas ilhas são as ilhas de patogenicidade (PAIs), que frequentemente carregam genes de virulência, além de outros genes, e são mais prevalentes em amostras patogênicas em comparação com amostras menos patogênicas da mesma espécie ou relacionadas. As PAIs são encontradas tanto em *E. faecium* quanto em *E. faecalis* e demonstraram capacidade de transferência tanto intra quanto inter específica (Dobrindt *et al.*, 2004; Manson; Hancock; Gilmore, 2010; Weaver, *et al.*, 2019).

1.6 Estruturas populacionais de *Enterococcus* definidas por MLST

O avanço das técnicas moleculares trouxe ganhos substanciais para a discriminação dos isolados enterocócicos e proporcionou um entendimento mais crítico sobre sua epidemiologia. Ao usar abordagens de tipagem molecular, foi possível demonstrar a aquisição exógena de amostras enterocócicas por contato direto e indireto entre pacientes, rompendo a concepção tradicional de que as infecções enterocócicas eram de natureza endógena. A transmissão intra-hospitalar e a disseminação inter-hospitalar foram amplamente documentadas para enterococos resistentes a antimicrobianos, especialmente VRE (Arias; Murray, 2012; Facklam; Carvalho; Teixeira, 2002; Teixeira *et al.*, 2022; Weaver, 2019). Além das investigações epidemiológicas, algumas das técnicas de tipagem molecular agora são usadas para rastrear a disseminação dos enterococos em diferentes ambientes e hospedeiros, relações filogenéticas e a evolução de amostras multirresistentes, ampliando significativamente nossa compreensão da epidemiologia, estrutura populacional, e disseminação da resistência antimicrobiana e da virulência dos *Enterococcus* (Gilmore; Lebreton; Van Schaik, 2013; Lee *et al.*, 2019; Weaver, *et al.*, 2019).

No contexto de técnicas robustas para a tipagem de enterococos, a tipagem de multilocus por sequenciamento (MLST- *Multilocus sequence typing*) surgiu como uma metodologia que apresenta várias vantagens para análises de diversidade. O MLST é baseado na identificação de alelos após o sequenciamento de fragmentos internos de um número de genes de manutenção celular (*House-keeping*) selecionados, resultando em um perfil alélico numérico. Cada perfil é designado como um tipo de sequência (ST- *Sequence typing*) e

possibilita caracterizar complexos clonais (CCs). Essa técnica tem sido amplamente utilizada para compreender a epidemiologia e a estrutura populacional dos dois principais patógenos enterocócicos, *E. faecium* e *E. faecalis* (Homan *et al.*, 2002; Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2006).

De forma mais recente, a técnica de WGS, também foram incorporados nas pesquisas epidemiológicas, já que o uso dessa técnica propicia a obtenção de resultados bastante acurados e discriminatórios, possibilitando também o acesso a uma quantidade substancial de informações sobre as mais diversas características desses microrganismos apresentando um panorama detalhado de como eles emergiram como patógenos humanos e os desafios que eles apresentam (Homan *et al.*, 2002; Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2006; Weaver, *et al.*, 2019)

1.6.1 *Enterococcus faecium*

Nas últimas duas décadas, *E. faecium* evoluiu como um importante patógeno nosocomial, aumentando sua frequência nas infecções enterocócicas e parcialmente em alguns cenários se equiparando às frequências de *E. faecalis* como causa de IRAS (Top *et al.*, 2007). Estudos de epidemiologia molecular apontaram uma linhagem genética relacionada ao hospital, sugerindo a existência de uma subpopulação específica de *E. faecium* associada a infecções adquiridas no hospital, diferente da observada isoladas na comunidade e de origem animal. Resistência à ampicilina e a proteína Esp foram os primeiros marcadores associados a essa subpopulação. Consequente, a ilha de patogenicidade (PAI) contendo os genes *esp* e *hyl*, IS16 e a resistência a quinolonas também foram relacionadas a essa subpopulação, posteriormente a aquisição resistência à vancomicina. Além disso, genes de virulência em potencial e várias proteínas de superfície são enriquecidas nessa subpopulação associada ao hospital (Coque, 2002; Klare *et al.*, 2005; Rice, 2008).

Com base na tipagem por MLST, a população estrutural dos *E. faecium* foi elucidada e foi revelado existência de um distinto complexo clonal de alto risco, nomeado como complexo clonal-17 (CC17) associado majoritariamente com surtos hospitalares e infecções clínicas nos cinco continentes (Galloway-Peña *et al.*, 2012).

Apesar da clara importância do CC17 como a principal subpopulação genética de *E. faecium* de origem hospitalar, a sua estrutura filogenética precisa permanecia incerta. Inicialmente, ST17 foi presumido como o fundador desse complexo clonal. Diversas publicações reconheceram CC17 como, de longe, o subcluster genético mais prevalente causando infecções adquiridas no hospital. Subsequentemente, foi identificado que o CC17 era composto por subfundadores, incluindo as ramificações dos ST18 e ST78, juntamente

com seus variantes de locus único (SLV, do inglês *single locus variant*) e variantes de duplo locus (DLV, do inglês *double locus variant*), contribuindo para a disseminação de surtos em várias regiões do mundo (Galloway-Peña *et al.*, 2012).

Atualmente, o uso do sequenciamento completo do genoma tem avançado em várias áreas da saúde humana. As análises de pangenoma por WGS, que combinam o genoma central com genes acessórios, têm sido úteis para entender a dinâmica epidemiológica das infecções hospitalares. O WGS também tem sido empregado para desenvolver estratégias de intervenção contra a disseminação de VRE em hospitais. Além disso, estudos filogenéticos revelaram dois grupos principais de *E. faecium*: um associado ao hospital (Clado A) e outro à comunidade (Clado B), com uma subdivisão adicional no clado A, distinguindo amostras clínicas humanas (A1) de amostras animais e esporádicas causadoras de infecção (A2) (Hourigan, *et al.*, 2024). Portanto, o uso do WGS é crucial para compreender os processos evolutivos que tornam os *E. faecium* mais adaptáveis e disseminados nos ambientes hospitalares (Gilmore; Lebreton; Van Schaik, 2013; Lebreton *et al.*, 2013; Palmer; Gilmore, 2010).

1.6.2 *Enterococcus faecalis*

Os dados disponíveis indicam que *E. faecalis* possui uma estrutura populacional heterogênea e maior diversidade das linhagens genéticas dentro e fora do hospital. No ambiente hospitalares algumas linhagens e seus respectivos complexos clonais, CC2, CC9 e CC87, foram considerados de alto risco (HiRECCs, do inglês *High-risk Enterococcal Clonal Complexes*), associados a isolados multirresistentes que causam infecções em pacientes hospitalizados (Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2006; Top *et al.*, 2007). Já foi relatado que tais isolados podem adquirir uma diversidade de determinantes genéticos de resistência a antimicrobianos e determinantes de virulência, como a ilha de patogenicidade de *E. faecalis*, Esp, polissacarídeo capsular, gelatinase, Substância de agregação, citolisina e a proteína Ace (Guzman-Prieto *et al.*, 2016).

O CC2 tem sido amplamente reconhecido como predominante no ambiente hospitalar mundialmente, com vários estudos destacando sua importância em infecções relacionadas à assistência à saúde. O ST6, dentro desse complexo, foi associado a fenótipos de resistência à vancomicina. A análise do genoma completo da amostra de referência V583 de *E. faecalis*, representante do ST6/CC2, revelou a presença de diversos elementos genéticos móveis, genes de virulência e resistência, sugerindo adaptações específicas para ambientes hospitalares

(Freitas *et al.*, 2009; Quinones; Kobayashi; Nagashima, 2009; Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2006; Solheim *et al.*, 2011; Vebø *et al.*, 2010). No Brasil, a prevalência do CC2, que compreende principalmente o ST6 e o ST2, recuperados a partir de pacientes hospitalizados, também tem sido relatada, além do ST524 e ST9 pertencentes ao CC9 (Penas *et al.*, 2010).

Alguns STs de *E. faecalis* encontrados no ambiente hospitalar também estão relacionados com isolados na comunidade, incluindo isolados de animais de fazenda e produtos alimentícios, indicativos de uma especificidade de hospedeiro reduzida. Por sua vez, o CC21 e ST40 compreenderam amostras clínicas e comensais isoladas de humanos, animais e diferentes fontes ambientais (McBride *et al.*, 2007).

A análise da estrutura populacional de *Enterococcus faecalis* por meio WGS tem se mostrado uma ferramenta poderosa para entender a diversidade genética e a dinâmica evolutiva dessa espécie, especialmente no contexto de infecções hospitalares. Estudos recentes baseados em WGS corroboram com os dados de MLST, destacando grande variabilidade genética entre as amostras de *E. faecalis* e uma estrutura populacional caracterizada por uma predominância de certos STs e CCs relacionados a linhagens epidêmicas, frequentemente associadas a surtos nosocomiais (Freitas *et al.*, 2009; Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2006; Solheim *et al.*, 2011).

2. JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas, *E. faecalis* e *E. faecium*, tornaram-se grandes desafios para a saúde pública global devido ao seu papel como patógenos nosocomiais (Arias; Murray, 2012). A principal preocupação com esses microrganismos em Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde está na sua capacidade de adquirir genes de resistência a uma ampla variedade de antimicrobianos, limitando drasticamente as opções de tratamento (Miller *et al.*, 2014).

Embora a resistência a antimicrobianos seja amplamente estudada, investigações sobre a ocorrência de determinantes genéticos relacionados à tolerância a metais pesados e microbicidas e sua influência na resistência cruzada ou co-resistência ainda são limitadas. A presença abundante de EGMs em *Enterococcus* isolados do ambiente hospitalar sugere que esses elementos são cruciais para o sucesso desses microrganismos como agentes de infecções de difícil tratamento e na sua adaptação ao ambiente hospitalar. Estudar a coexistência de genes de resistência a metais e microbicidas com genes de resistência a antimicrobianos e determinantes de virulência nesses EGMs é essencial para entender o papel de outros compostos na co-seleção de amostras MDR e a sua patogenicidade.

Estudos que avaliem a resistência a antimicrobianos, a patogenicidade das principais espécies de *Enterococcus* e a persistência devido ao arsenal de resistências a diversos compostos químicos usados em estratégias de controle de microrganismos nos espaços hospitalares e fora dele são cada vez mais necessários. Essas investigações são vitais para preencher lacunas de conhecimento e promover ações mais eficazes contra a disseminação e persistência da resistência a antimicrobianos, um risco significativo à saúde global.

O conhecimento das bases genéticas da tolerância a metais e outros microbicidas em *Enterococcus* ainda é pouco explorado e avanços nessa área apresentam um potencial significativo para proporcionar *insights* valiosos no monitoramento e controle da resistência a antimicrobianos. Determinar a ocorrência e a diversidade dos genes/operons adquiridos que conferem tolerância a esses compostos, bem como seu contexto genético, é fundamental para avançar no conhecimento sobre a disseminação e coexistência com genes de resistência a antimicrobianos. Análises genômicas comparativas recentes apontam a presença de operons heterogêneos e o aumento da resistência a metais, microbicidas e antimicrobianos ao longo do tempo. Esses achados destacam a importância de *E. faecium* e *E. faecalis* como organismos modelo para futuros projetos de mitigação da resistência antimicrobiana, com os dados de diferentes nichos ecológicos contribuindo significativamente para estratégias de gestão ambiental e saúde pública em âmbito global.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar a ocorrência e diversidade de determinantes genéticos associados à resistência a antimicrobianos, à virulência e à tolerância a metais pesados e outros microbicidas, bem como os elementos genéticos móveis, em genomas de *E. faecalis* e *E. faecium* de amostras isoladas de humanos hospitalizados, visando uma compreensão mais ampla sobre os mecanismos genéticos envolvidos na persistência, patogenicidade e distribuição de linhagens dessas espécies sob diferentes contextos genéticos.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a diversidade e a distribuição de genes associados à resistência antimicrobiana adquirida e intrínseca, à tolerância a metais pesados e a outros microbicidas (resistoma); identificar a ocorrência, diversidade e distribuição de genes determinantes de virulência (viruloma); e investigar a presença, diversidade e distribuição de elementos genéticos móveis (mobiloma), incluindo genes identificadores de famílias de plasmídeos (*rep*), transposons, sequências de inserção e operons.
- Extrair sequências de plasmídeos e avaliar a co-ocorrência de genes de tolerância a metais pesados e outros microbicidas com a resistência aos antimicrobianos e determinantes de virulência em plasmídeos.
- Avaliar a diversidade genética populacional e as relações filogenéticas de *E. faecium* e *E. faecalis*, por meio da determinação dos tipos de sequências (ST) e construção de árvores filogenéticas baseados no core genoma, e traçar aspectos populacionais da circulação da tolerância a metais e outros microbicidas com seleção da resistência a antimicrobianos e determinantes de virulência.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras bacterianas

Este estudo analisou 170 genomas completos de *Enterococcus* provenientes de diferentes fontes clínicas, representando casos tanto infecções quanto colonizações. Dos genomas analisados, 110 (65%) eram de *E. faecium* e 60 (35%) de *E. faecalis*. As amostras foram isoladas de pacientes hospitalizados em instituições do Rio de Janeiro, entre 1994 e 2017, durante estudos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa.

Em relação às fontes de isolamento, 57% (n=63) das amostras de *E. faecium* e 52% (n=31) das de *E. faecalis* foram obtidas de materiais representativos de infecção, incluindo urina (*E. faecium*: 37%, n=41/110; *E. faecalis*: 38%, n=23/60), sangue (*E. faecium*: 18%, n=20/110; *E. faecalis*: 13%, n=8/60), fragmento ósseo (*E. faecium*: 1%, n=1/110) e líquido peritoneal (*E. faecium*: 1%, n=1/110). Além disso, 39% (n=43) das amostras de *E. faecium* e 47% (n=28) das de *E. faecalis* foram isoladas de material fecal (swabs ano-retais e/ou fezes), representando culturas de vigilância e classificadas como indicativas de colonização. A origem do isolamento não foi informada para 4% (n=4) das amostras de *E. faecium* e 2% (n=1) das de *E. faecalis* (**Tabela 1**).

As amostras foram selecionadas por conveniência, abrangendo genomas sequenciados a partir de amostras isoladas de fontes clínicas (humanos hospitalizados), pertencentes as duas principais espécies de *Enterococcus*, e utilizadas em estudos anteriores do nosso grupo até o início deste. Todas as amostras estudadas pertencem à coleção de culturas do Laboratório de Apoio Biotecnológico do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, na Universidade Federal do Rio de Janeiro, e são mantidas congeladas a -20°C ou a -80°C, em solução de leite desnatado a 10% com 10% de glicerol.

A metodologia de MALDI TOF MS (Bruker Microflex LT, Bruker Daltonics®, Bremen, Alemanha) foi utilizada para confirmação da identificação das amostras, e os espectros de massas foram coletados na faixa de 2.000 a 20.000 m/z e analisados com o auxílio do software MALDI Biotyper 2.0 (Bruker Daltonics®). Para a identificação, foram considerados os valores de escores iguais ou superiores a 2.300, referência de confiabilidade para identificação no nível de gênero e espécie, seguindo as recomendações do fabricante.

Tabela 1- Distribuição das amostras de *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* de acordo com as fontes de isolamento.

Fontes de isolamento	Percentual (número) de amostras de acordo com cada espécie		Total
	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	
Urina	37% (41/110)	38% (23/60)	38% (64/170)
Sangue	18% (20/110)	13% (8/60)	16% (28/170)
Fragmento ósseo	1% (1/110)	-	0,6% (1/170)
Líquido peritoneal	1% (1/110)	-	0,6% (1/170)
Swab retal e/ou fezes	39% (43/110)	47% (28/60)	42% (71/170)
Não informado	4% (4/110)	2% (1/60)	3% (5/170)
Total	64,7% (110/170)	35,3% (60/170)	100% (170)

As cores na coluna de Fontes de isolamento representam a classificação das amostras conforme o sítio de isolamento: Cinza escuro representa infecção, cinza claro representa colonização.

4.2 Seleção das amostras para sequenciamento do genoma completo

As amostras selecionadas para o sequenciamento do genoma completo atenderam a critérios como relevância clínica, como amostras de importância epidemiológica, resistência fenotípica a três ou mais classes de antimicrobianos, detecção de múltiplos genes de resistência a antimicrobianos e fatores de virulência, conforme dados obtidos durante estudos prévios de nosso grupo.

A avaliação fenotípica da susceptibilidade a antimicrobianos foi realizada através do teste de disco-difusão em ágar, seguindo as diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2023), e os diâmetros dos halos de inibição foram interpretados conforme os pontos de corte estabelecidos pelo CLSI (2023). Amostras que apresentaram resistência a três ou mais classes de antimicrobianos foram classificadas em resistentes a múltiplas drogas (MDR).

4.3 Sequenciamento do genoma completo e montagem genômica

O sequenciamento do genoma completo foi realizado em colaboração com o Dr. Paul Joseph Planet da University of Pennsylvania, PA, EUA. Em resumo, o DNA de cada amostra foi extraído utilizando o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega, Madison, WI, EUA), conforme as instruções do fabricante. As amostras foram cultivadas em caldo triptona

de soja (TSB - trypticase soy broth; BD Diagnostics) e incubadas a $36\pm 1^\circ\text{C}$ por 18-24 horas. Em seguida, 1 mL do crescimento de cada amostra foi centrifugado (4.000 rpm por 2 minutos), o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 480 μL de EDTA (50 mM) e 120 μL de uma solução aquosa de lisozima (10 mg/mL). Após incubação a $36\pm 1^\circ\text{C}$ por 1 hora, as suspensões foram centrifugadas novamente (4.000 rpm por 10 minutos), o sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em 600 μL de Solução de Lise (Promega) e incubadas a 80°C por 5 minutos.

Em seguida, 3 μL de solução de RNase foram adicionados, e após homogeneização, 200 μL da Solução para Precipitação de Proteínas (Promega). Após incubação por 5 minutos no gelo, os tubos foram centrifugados duas vezes consecutivas: na primeira centrifugação (4.000 rpm por 3 minutos) foram adicionados 600 μL de isopropanol ao sobrenadante; na segunda (4.000 rpm por 2 minutos), 600 μL de etanol 70%. Após a centrifugação final, o sobrenadante foi descartado e o sedimento contendo o DNA foi reidratado com 100 μL de Solução de Reidratação (Promega). Após incubação a 65°C por 1 hora, o DNA foi armazenado a 4°C até o momento de uso.

O DNA genômico extraído foi quantificado utilizando espectrofotômetro NanoDrop e enviado para o serviço de sequenciamento no PennCHOP, Microbiome Program, pertencente a University of Pennsylvania e o Children's Hospital of Philadelphia, com o apoio do Dr. Paul J. Planet. No local, as bibliotecas genômicas foram construídas utilizando-se o kit Illumina Nextera XT DNA (150- bp paired-end reads) e então sequenciadas na plataforma de alto desempenho Illumina Hiseq 2500.

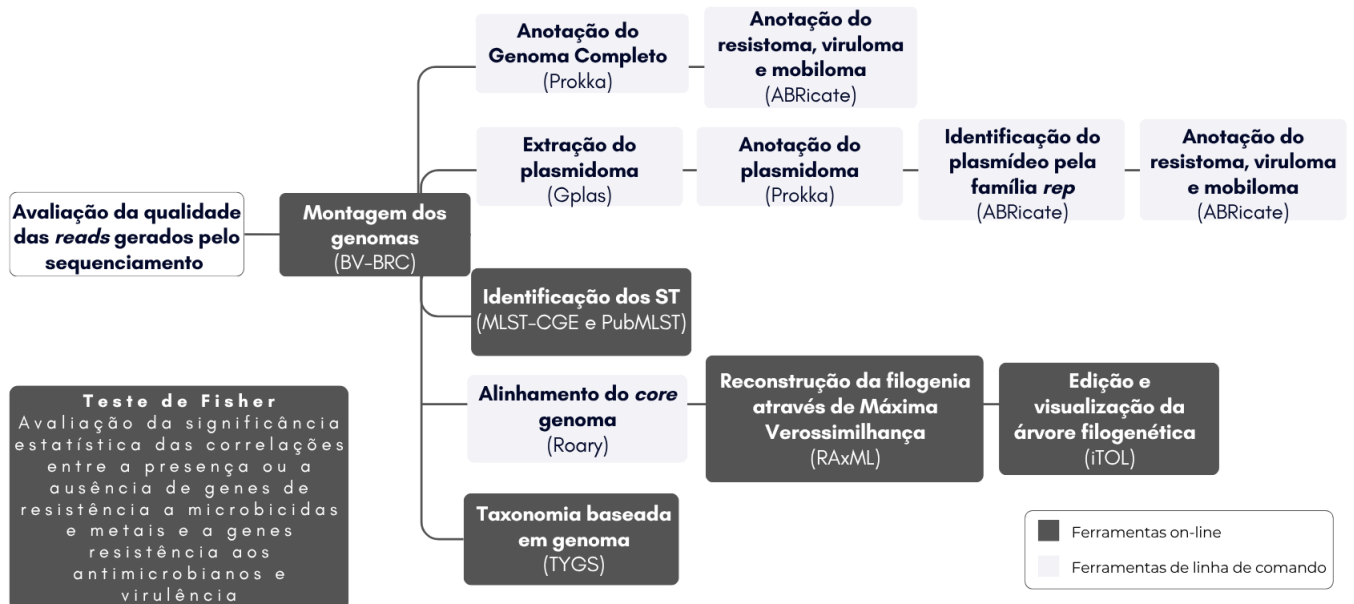
Os arquivos brutos gerados pelo sequenciamento, conhecidos como *reads*, foram submetidas ao processo de montagem "De novo" na plataforma *Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center* (BV-BRC) versão 3.37.14 (Olson *et al.*, 2023) utilizando o modo de montagem "Auto", que utiliza o programa Unicycler v0.4.8 e a triagem das *reads* para retirada de adaptadores de sequenciamento que tenha ficado junto às *reads* e as *reads* de baixa qualidade através do *software* Trim Galore! versão 0.6.2 (Kruger *et al.*, 2015), previamente à montagem.

4.4 Caracterização genômica por análises de bioinformática

Para a análise dos genomas completos, foi desenvolvido um fluxo de trabalho abrangente que utilizou diversas ferramentas computacionais, incluindo programas de linha de

comando e servidores on-line. Tal fluxo foi dividido em etapas, iniciando pela avaliação da qualidade das montagens dos genomas sequenciados utilizando as métricas do tamanho total e percentual de conteúdo G+C de acordo com o esperado para a espécie, com os resultados fora do esperado sugerindo uma possível contaminação da amostra e não utilização dos dados. Em seguida, a utilização de diferentes métodos de análise do conteúdo genético, incluindo anotação do genoma completo e de genes específicos como os associados à resistência a antimicrobianos, tolerância a metais pesados e outros microbicidas (resistoma), a determinantes de virulência (viruloma) e de elementos genéticos móveis (mobiloma), como sequências de inserção (IS), marcadores de família de replicon de plasmídeos (família *rep*) e transposons (Tn), bem como, a extração das sequências de plasmídeos e avaliação de seu conteúdo genético, e a análise da epidemiologia populacional e as relações filogenéticas por MLST e Máxima Verossimilhança, como demonstrado na **Figura 1**.

Figura 1- Fluxo de trabalho realizado para a análise de 110 genomas de *E. faecium* e 60 de *E. faecalis* oriundos de amostras isoladas de pacientes humanos hospitalizados no estado do Rio de Janeiro.



Todos os programas empregados nas etapas do fluxograma de trabalho foram executados no modo padrão.

4.5 Anotação do resistoma, viruloma e mobiloma das sequências do genoma completo

Após a montagem dos 170 genomas incluídos neste estudo, os arquivos *.fasta gerados foram submetidas à anotação do genoma completo através do programa de linha de comando Prokka versão 1.13.17 (Seemann *et al.*, 2014) que baseia-se em bancos de dados de referências integrados (Pfam, TIGRFAMs e Swiss-Prot) e algoritmos de predição de genes. Os resultados gerados incluíram os arquivos *.gff, que continham as informações detalhadas sobre a localização de regiões codificadoras em conjunto com os arquivos da sequência de aminoácidos, determinando funções potenciais das proteínas.

O Prokka foi integrado com o programa de linha de comando ABRicate versão 1.0.1 (Seemann *et al.*, 2018) para anotar genes associados ao resistoma, viruloma e mobiloma nos arquivos *.gbk O ABRicate compara as sequências de entrada com diversos bancos de dados, utilizando algoritmo baseado em BLAST – *basic local alignment search tool* (McGinnis; Madden, 2004) para identificar e anotar genes específicos. Neste estudo, foram empregados os bancos de dados: ResFinder (Florensa *et al.*, 2022) para resistência a antimicrobianos, VFDB (Liu *et al.*, 2019) para determinantes de virulência, BACMET versão 2.0 (Pal *et al.*, 2014) para genes de tolerância a metais pesados e outros microbicidas, MobileElementFinder (Johansson *et al.*, 2021) para EGMs e PlasmidFinder versão 2.1 (Carattoli *et al.*, 2014) para famílias de replicons. Além disso, no presente estudo foi criado um banco de dados personalizado, contendo genes não presentes nos bancos de dados mencionados, e que reuniu sequências de referência para genes de feromônios descritos na literatura (*cob*, *cpd*, *cad*, *ccf* e *eep*). O ABRicate gerou os relatórios detalhados que listam os genes identificados, suas posições no genoma e os níveis de identidade com as sequências de referência.

4.6 Extração do plasmidoma e análise do seu conteúdo gênico

Através dos resultados de anotação do PlasmidFinder, indicando uma grande quantidade de replicons nas montagens genômicas, utilizamos o programa de linha de comando *Graphical Plasmid Analysis System* (Gplas) versão 0.7.0 (Arredondo-Alonso *et al.*, 2020b) para classificar, extrair e agrupar *contigs* que podem representar fragmentos de plasmídeos em sequências de genoma completo. Essa análise foi aplicada às 170 sequências montadas dos genomas de *Enterococcus* deste estudo. A ferramenta empregou dois classificadores distintos, dependendo da espécie analisada: o Plasflow versão 1.1 (Krawczyk; Lipinski; Dziembowski,

2018) para *E. faecalis* e o MLplasmids versão 1.0.0 (Arredondo-Alonso *et al.*, 2018) para *E. faecium*.

Após o processamento dos dados da montagem do sequenciamento e a previsão dos *contigs* que representavam fragmentos de plasmídeos, o *Gplas* realizou uma análise em grafo dos plasmídeos. Para isso, o software construiu um grafo com dois elementos principais: *Nodes*, representando as sequências nucleotídicas que formam os *contigs* plasmidiais, e *Edges*, que indicam os valores de cobertura entre os *Nodes*, ou seja, as conexões entre os *contigs* com base em sobreposição de extremidades de leituras (*reads*).

Em seguida, foi aplicado o algoritmo de agrupamento hierárquico *Plasmid Binning*, que analisou o grafo gerado e separou os *contigs* plasmidiais (*Nodes*) possivelmente referentes a um mesmo plasmídeo em grupos denominados *bins*. Assim, *contigs* com profundidade de sequenciamento similares foram agrupados no mesmo *bin*, enquanto *bins* distintos representaram potenciais plasmídeos diferentes.

Além disso, o *Gplas* gerou um arquivo de imagem que permite a visualização da rede do plasmidoma a partir do grafo. Na imagem resultante, os *Nodes* (*contigs* plasmidiais) foram representados como círculos, e as *Edges* (profundidade entre *contigs*) como linhas conectando os *Nodes*, com base no nível de similaridade entre as sequências. Essa representação gráfica facilitou a compreensão das relações estruturais entre os *contigs* e a reconstrução dos plasmídeos. Logo, esse processo envolveu: a extração dos dados de *Nodes* e *Edges* em um grafo e o agrupamento em *bins* por *Plasmid Binning*, onde os *Nodes* com coberturas similares são agrupados em um *bin* e os diferentes *bins* representando potenciais plasmídeos distintos, gerando um arquivo de saída dos *bins* em formato *.fasta.

O arquivo *.fasta dos *bins* possibilitou as análises posteriores desses arquivos, a anotação do seu conteúdo gênico. A partir dos *bins* gerados também foi possível criar uma rede de plasmidoma, que facilitou a visualização e análise das inter-relações entre diferentes plasmídeos presentes no genoma. Através do *Plasmid Binning*, o *Gplas* permitiu identificar múltiplos plasmídeos em um único genoma, proporcionando uma visão detalhada da diversidade plasmidial em cada genoma.

Todos os arquivos *.fasta identificados como componentes de plasmídeos, foram submetidos ao PlasmidFinder para identificação de seus replicons. Isso foi realizado para

avaliar os replicons encontrados nas sequências completas relacionadas aos *bins* de plasmídeos extraídos e a validação dos plasmídeos. Após, o fluxo de trabalho previamente utilizado na anotação do genoma completo foi reproduzido para todos os arquivos *.fasta identificados como componentes de plasmídeos. Esse fluxo de trabalho envolveu o uso do programa ProKka associado ao ABRicate e dos bancos de dados ResFinder, VFDB, BACMET, MobileElementFinder e o banco de dados personalizado, para caracterizar a diversidade de genes presente nesses elementos genéticos móveis e identificar a co-ocorrência de genes de tolerância a metais e outros microbicidas, com genes de resistência a antimicrobianos e fatores de virulência, bem como outros elementos genéticos móveis, *Tn* e IS, dentro desses elementos genéticos transferíveis ou mobilizáveis.

4.7 Epidemiologia molecular por análise de MLST

Na análise da diversidade populacional por MLST, os genomas sequenciados foram identificados quanto ao respectivo tipo de sequência (do inglês: *Sequence Type*, ST) através de um painel de múltiplos loci, conforme o painel proposto por Homan e colaboradores para *E. faecium* (Homan *et al.*, 2002) e Ruiz-Garbajosa e colaboradores para *E. faecalis* (Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2006). As análises envolveram os sete genes de manutenção celular de *E. faecium*: *adk* (adenilato quinase), *atpA* (subunidade α da ATP sintetase), *ddl* (D-alanina-D-alanina ligase), *gdh* (glicose 6-fosfato desidrogenase), *gyd* (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase), *pstS* (proteína transportadora de cassete de ligação de ATP fosfato) e *purK* (fosforribosilaminoimidazol carboxilase). Para *E. faecalis*, os setes genes analisados foram: *gdh* (glicose 6-fosfato desidrogenase), *gyd* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), *yqiL* (acetil-Coa acetiltransferase), *pstS* (proteína transportadora de cassete de ligação de ATP fosfato), *gki* (glucocinase), *aroE* (carbamoil fosfato sintetase pequena subunidade) e *xpt* (xantina fosforribosiltransferase).

As análises foram realizadas por meio da ferramenta de tipificação por MLST versão 2.0.9 (Larsen *et al.*, 2012), hospedada na plataforma on-line do servidor do *Center for Genomic Epidemiology* (CGE). Essa ferramenta conta com bancos de dados que contém os alelos dos esquemas de MLST de 66 espécies bacterianas, incluído *E. faecium* e *E. faecalis*. Para a análise, os arquivos de montagem no formato *.fasta foram usados como arquivo de entrada para identificar os alelos dos painéis em múltiplos loci pré-estabelecidos para cada espécie desse estudo, através do método de identificação de alelos baseado em BLAST. Os alelos identificados para cada gene do painel em múltiplo loci dos respectivos esquemas de

MLST foram então combinados para determinar a ST do genoma, apresentadas nos arquivos de saídas de dados, representadas em uma tabela de dados de alelos e nas respectivas sequências nucleotídicas correspondentes a cada alelo e seu grau de confiabilidade.

Os respectivos ST de cada genoma foram confirmados através da plataforma on-line *Public Databases for Molecular Typing and Microbial Genome Diversity* (PubMLST) (Jolley *et al.*, 2018) utilizando o arquivo de montagem no formato *fasta. Para compreender a relação epidemiológica em nível de STs de *E. faecium* e *E. faecalis*, representada pelos genomas da coleção local, foi construída uma árvore geradora mínima (MST, do inglês *Minimum Spanning Tree*). Para a análise foi empregado o software BioNumerics v7.6.2. Como dados de entrada, foram utilizadas as combinações dos números de alelos dos STs atribuídos a cada genoma, de acordo com o banco de dados do PubMLST.

4.8 Análises filogenéticas dos genes conservados por Máxima Verossimilhança

Para avaliar as relações filogenéticas entre os genomas e minimizar os efeitos da variabilidade genética decorrente da transferência horizontal de genes que afetam o genoma acessório, a análise filogenética foi baseada em *core genes*, ou seja, genes presentes em mais de 99% dos genomas analisados. Para essa análise, utilizamos o programa de linha de comando Roary versão 3.11.2 (Page *et al.*, 2015) para gerar o pangenoma, que representa o conjunto completo de genes presentes em um ou mais genomas.

O Roary foi utilizado para agrupar os genomas com base nos genes presentes em cada um deles, utilizando os arquivos de entrada no formato *.gff gerados pelo software Prokka versão 1.13.17 (Page *et al.*, 2015), e o MAFFT com a opção "--mafft" para produzir um alinhamento multi-FASTA dos genes e criar uma matriz de presença/ausência. Os genes foram classificados nas categorias "core" (presentes em 99% ou mais dos genomas), "shell" (presentes em 10-98% dos genomas) e "cloud" (presentes em menos de 10% dos genomas).

A análise da reconstrução filogenética do genoma central de cada espécie foi realizada por Máxima Verossimilhança, empregando a ferramenta RAxML versão 8.2.4 (Stamatakis *et al.*, 2014), hospedada na plataforma on-line do servidor *CIPRES Science Gateway* versão 3.1 (Miller *et al.*, 2010), com o parâmetro de bootstrapping rápido ativado e enraizamento pelo ponto médio (no inglês: *midpoint rooting*) na construção das árvores. Após, as respectivas árvores filogenéticas do genoma central foram visualizadas na plataforma on-line iTOL versão 5 (Letunic; Bork *et al.*, 2021) permitindo uma análise em conjunto com os resultados da anotação gênica e plasmidial, bem como da epidemiologia molecular por MLST.

4.9 Taxonomia baseada em genoma

Com base no interesse investigativo de casos específicos que serão contextualizados na seção de resultados, utilizamos a plataforma *Type (Strain) Genome Server* (TYGS) (Meier-Kolthoff; Göker, 2019) para validação taxonômica. O TYGS identifica as 10 unidades taxonômicas mais próximas de cada amostra investigada com base na similaridade entre suas sequências de rDNA 16S e as cepas tipo depositadas em seu banco de dados. Na sequência o algoritmo promove uma comparação pareada de todas contra todas através do método *Genome BLAST distance phylogeny* (GBDP) (Auch *et al.*, 2006), que fornece índices de similaridade entre as amostras, utilizados para estimar os valores de Hibridização DNA-DNA Digital (dDDH) (Riesco; Trujillo, 2024) e reconstruções filogenéticas. São agrupados na mesma espécie taxonômica indivíduos que possuam dDDH maior que 70% tendo como referência a cepa tipo da espécie.

4.10 Testes estatísticos

A significância estatística das relações entre a presença de genes de tolerância a metais pesados e outros microbicidas, genes de resistência a antimicrobianos e fatores de virulência, foi realizada empregando o Teste Exato de Fisher através dessa ferramenta disponível na plataforma on-line GraphPad®.

O Teste Exato de Fisher foi empregado para identificar dependência entre duas variáveis nominais, ou seja, nas variáveis que representam categorias distintas do estudo, e devido a ser o recomendado para amostragens pequenas, pois os testes tradicionais de qui-quadrado podem não ser apropriados ou precisos em tais situações.

A hipótese nula estabelecida é que as proporções encontradas para uma variável são iguais às proporções encontradas para a outra, ou seja, não há associação entre duas variáveis, e a distribuição de uma categoria em uma variável é independente da distribuição na outra. No contexto desse estudo, isso implica que a frequência de um determinado gene avaliado entre os genomas positivos para genes de tolerância a metais e outros microbicidas pode ser igual a frequência entre os genomas negativos para tais genes.

O teste foi realizado na modalidade *two-tailed*, que avalia a possibilidade de relação entre as variáveis em ambas as direções. Foram criadas tabelas de contingência 2x2 com base nas frequências dos determinantes genéticos na presença ou ausência de genes de resistência a microbicidas e metais. As correlações foram consideradas estatisticamente significativas quando o *p-valor* foi igual ou menor que 0,05.

5. RESULTADOS

5.1 Características gerais das sequências genômicas

As características gerais dos genomas de *E. faecium* e *E. faecalis* sequenciados neste estudo estão apresentadas na **Tabela 2**. Outras métricas relacionadas ao sequenciamento, como cobertura, valor de N50 e o número de acesso SRA dos genomas depositados no repositório do NCBI, entre outras informações específicas dos 170 genomas analisados, estão disponíveis no **Apêndice**.

Tabela 2 - Características gerais dos genomas de amostras de *E. faecium* e *E. faecalis* isoladas de pacientes humanos hospitalizados no Rio de Janeiro.

Métricas Genômicas	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
Média de <i>contigs</i> por genoma	188	112
Menor número de <i>contigs</i>	41	25
Maior número de <i>contigs</i>	181	351
Tamanho médio do genoma (Mb)	3,03	2,67
Conteúdo médio de G+C (%)	37,75	37,26
Número total de genomas analisados	110	60

5.2 Determinantes genéticos de resistência a antimicrobianos, virulência e tolerância a metais pesados e outros microbicidas

O resistoma dos 170 genomas analisados incluiu 23 genes relacionados à resistência a antimicrobianos, dos quais 21 estão associados à resistência adquirida a diferentes classes de antimicrobianos e 2 à resistência intrínseca. Esses genes e suas respectivas frequências por espécie estão destacados na **Figura 2**. Entre eles, destacaram-se o operon *vanHAX*, composto pelos genes *vanH*, *vanA* e *vanX*, associado à resistência aos glicopeptídeos; seis genes relacionados à resistência adquirida a níveis elevados de aminoglicosídeos: *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *ant(6')-Ia*, *ant(9')-Ia*, *aph(3')-IIIa*, *aph(2'')-Id* e *sat4*; um gene associado à resistência intrínseca a baixos níveis de aminoglicosídeos: *aac(6')-Ii*; quatro genes associados à resistência adquirida a macrolídeos, estreptograminas e lincosamidas: *erm(B)*, *ermA*, *lnuB*, *lnuG*, *lsaA* e *lsaE*, e um gene associado à resistência intrínseca: *msrC*; três genes associados à resistência adquirida a tetraciclinas: *tet(L)*, *tet(M)* e *tet(S)*; dois genes associados à resistência

adquirida ao trimetoprim: *dfrG* e *dfrF*; um gene relacionado à resistência adquirida a oxazolidinonas: *cfr(B)*; e um gene associado à resistência ao cloranfenicol: *cat* (**Figura 2**).

Amostras de *E. faecium* apresentaram vinte e um genes, enquanto as de *E. faecalis* continham treze genes, com uma média de $\bar{x} = 7,5$ genes por genoma para ambas as espécies. Observou-se que 85% (n=94/110) dos genomas de *E. faecium* e 82% (n=49/60) de *E. faecalis* apresentaram seis ou mais genes. O número mínimo de genes de resistência a antimicrobianos detectado entre os genomas de *E. faecium* foi um, enquanto o número máximo foi doze. Já em *E. faecalis*, o número mínimo também foi um, com um máximo de oito genes (**Figura 2**).

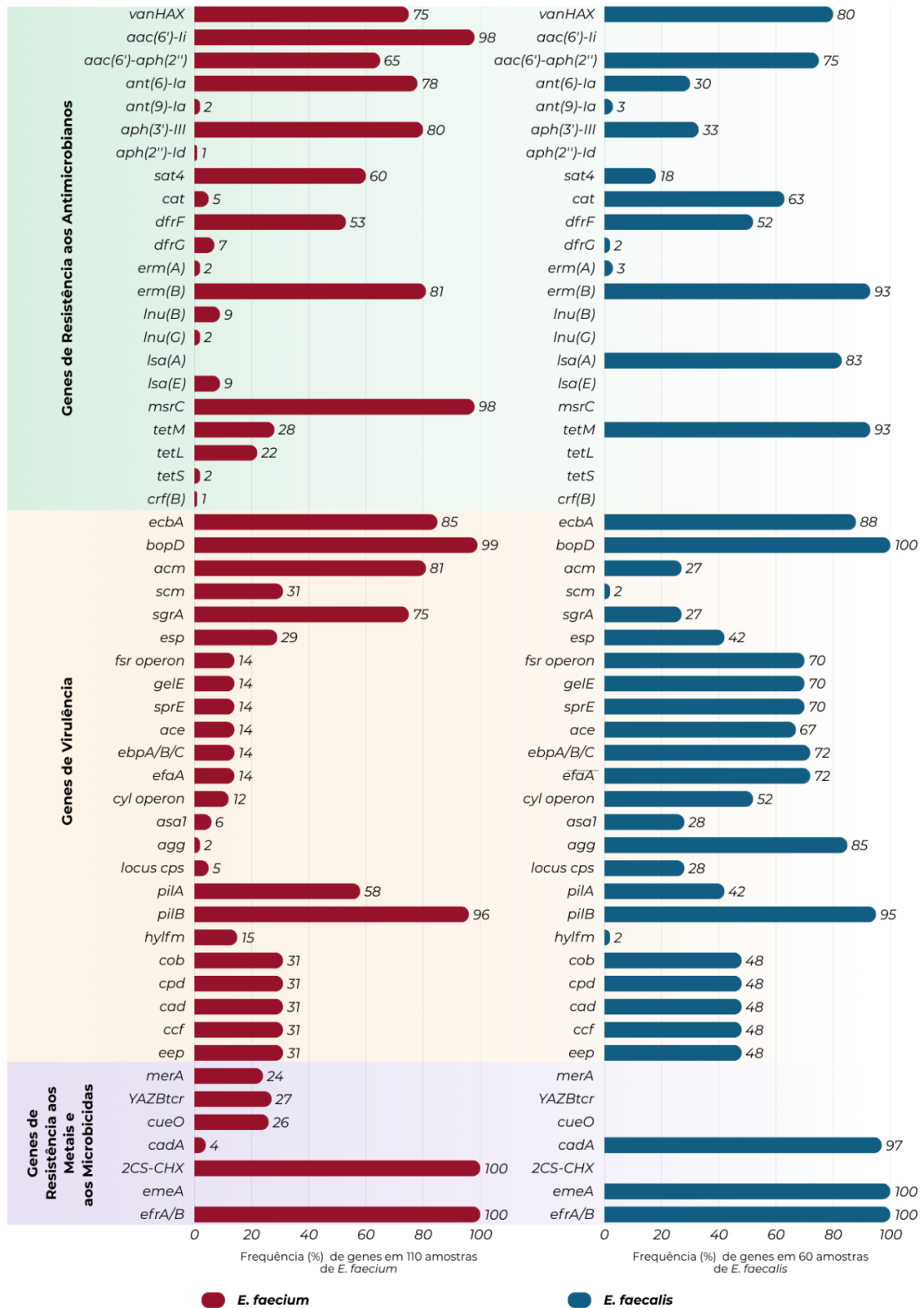
Dentre os genes de relevância clínica, destaca-se o operon *vanHAX* (associado ao fenótipo VRE), detectado em 80% (n=48/60) dos genomas de *E. faecalis* e 75% (n=82/110) dos de *E. faecium* (**Figura 2**). Dos genomas de amostras oriundas de infecção, 71% (n=24/34) de *E. faecalis* apresentaram *vanHAX*, e 55% (n=30/55) de *E. faecium*. Entre aquelas oriundas de colonização, todas (n=22/24) as pertencentes a *E. faecalis*, apresentaram *vanHAX*, enquanto em *E. faecium* foi detectado em 98% (n=48/49).

Outra resistência de relevância clínica está relacionada aos aminoglicosídeos, destacando-se o gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, que codifica uma enzima bifuncional capaz de inativar todos os outros aminoglicosídeos, exceto a estreptomicina, por acetilação. Esse gene foi observado em 75% (n=45/60) dos genomas de *E. faecalis* e em 65% (n=72/110) dos de *E. faecium* (**Figura 2**).

Quanto aos demais genes de resistência aos aminoglicosídeos, em *E. faecium*, os genes *ant(6')-Ia* (78%; n=86/110), *aph(3')-IIIa* (80%; n=88/110) e *sat4* (60%; n=66/110) também apresentaram elevada frequência. Já os genes *ant(9)-Ia* e *aph(2)-Id* foram encontrados em baixa ocorrência, sendo detectados em dois e um genoma, respectivamente (**Figura 2**).

Em *E. faecalis*, os genes *ant(6')-Ia* (30%; n=18/60), *aph(3')-IIIa* (33%; n=20/60) e *sat4* (18%; n=11/60) também apresentaram percentuais elevados, enquanto o gene *ant(9)-Ia* foi identificado em baixa ocorrência, em dois genomas (**Figura 2**).

Figura 2 - Frequência de genes associados a resistência a antimicrobianos, a virulência, e a tolerância a metais pesados e outros microbicidas em genomas de amostras de *E. faecalis* e *E. faecium* isoladas de pacientes humanos hospitalizados no Rio de Janeiro.



*Os valores apresentados foram arredondados para o número inteiro mais próximo.

Em relação aos genótipos de resistência a macrolídeos, estreptograminas e lincosamidas, o gene *erm(B)* esteve presente em 93% (n=56/60) dos genomas de *E. faecalis*. O gene de resistência a macrolídeos e estreptograminas *lsaA* foi encontrado em 83% (n=50/60). Já o gene *erm(A)* foi identificado em 3% (n=2/60) (**Figura 2**). Em *E. faecium*, os genes de resistência *erm(B)* e *msrC* foram detectados em 81% (n=89/110) e 98% (n=108/110) dos genomas, respectivamente. O gene *erm(A)* foi encontrado em apenas 2% (n=2/110). Além disso, os genes *lnu(G)*, *lnu(B)* e *lsa(E)* foram identificados exclusivamente nos genomas de *E. faecium*, com frequências de 2% (n=2/110) para *lnu(G)* e 9% (n=10/110) para *lnu(B)* e *lsa(E)* (**Figura 2**).

Em relação aos genes de resistência às tetraciclinas, *E. faecium* apresentou três variantes: *tet(M)*, que foi detectado em 28% (n=31/110) dos genomas, *tet(L)* em 22% (n=24/110) e *tet(S)* em apenas 2% (n=2/110). Por outro lado, *E. faecalis* apresentou exclusivamente o gene *tet(M)*, identificado em 93% (n=56/60) destes genomas (**Figura 2**). Em relação à resistência ao cloranfenicol, o gene *cat* foi identificado em ambas as espécies. Em *E. faecalis*, esteve presente em 63% (n=38/60) dos genomas, enquanto em *E. faecium* foi detectado em apenas 5% (n=6/110) (**Figura 2**).

Os genes relacionados à resistência à trimetoprim, *dfrG* e *dfrF*, foram detectados em genomas de ambas as espécies, com maior frequência para o gene *dfrF*. Em *E. faecium*, *dfrF* esteve presente em 53% (n=58/110) dos genomas, enquanto em *E. faecalis*, foi encontrado em 52% (n=31/60). O gene *dfrG* foi identificado em 2% (n=1/60) dos genomas de *E. faecalis* e em 7% (n=8/110) de *E. faecium* (**Figura 2**).

A partir dos resultados da anotação dos genes de resistência a antimicrobianos, observou-se que o principal perfil de resistência detectado em *E. faecium* foi composto por nove genes: *vanHAX*, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(3')-IIIa*, *ant(6')-Ia*, *sat4*, *aac(6')-Ii*, *ermB* e *drfF*, e *msrC*. Esse perfil corresponde ao grupo 1 da árvore de similaridade e foi identificado em 21% (n=23/110) dos genomas de *E. faecium*. O segundo perfil de resistência mais frequente nessa espécie foi composto por *vanHAX*, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(3')-IIIa*, *ant(6')-Ia*, *sat4*, *ermB*, *aac(6')-Ii* e *msrC*, ausente apenas o gene *drfF*, sendo detectado em 15% (n=16/110) dos genomas (**Figura 3**).

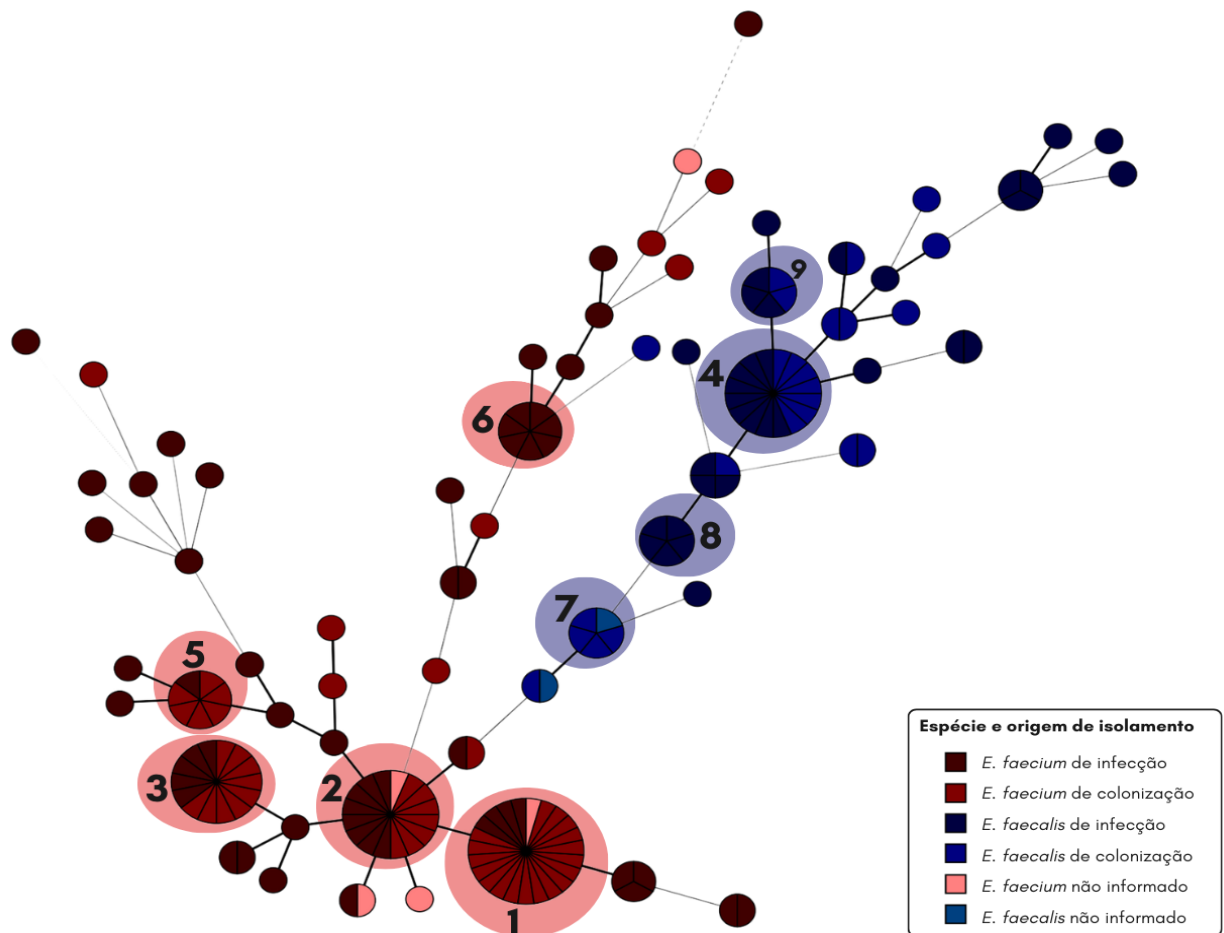
Em *E. faecalis*, o perfil genotípico de resistência mais frequente foi composto por sete genes: *vanHAX*, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *ermB*, *lsaA*, *tet(M)*, *cat* e *drfF*, representando o grupo 4 da árvore e presente em 27% (n=16/60) das sequências analisadas (**Figura 3**).

Em *E. faecium*, observou-se maior homogeneidade nos perfis, com três principais combinações genéticas representando mais de 50% das amostras. Esses três perfis diferiam entre si pela presença ou ausência de um único gene. Oito dos principais perfis continham o operon *vanHAX* e genes de resistência a aminoglicosídeos, especialmente o gene que codifica cional (*aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*) nos perfis 1 e 2. O perfil 2 era idêntico ao perfil 1, exceto pela ausência do gene *dfrF*, enquanto o perfil 3 continha todos os genes do perfil 1, menos a bifuncional (**Figura 3**).

Já *E. faecalis* apresentou maior heterogeneidade nos perfis de resistência, com seu principal perfil compartilhado entre menos de 27% dos genomas e com outros perfis menores com no máximo cinco genomas e sem muita correlação entre si. Apesar disso, esse perfil mais frequente também incluía a enzima bifuncional *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* e o operon *vanHAX*. (**Figura 3**).

Além disso, não foi observada separação clara entre os sítios de isolamento (infecção ou colonização), indicando que os perfis genéticos de resistência não se correlacionaram diretamente com a origem clínica dos isolados (**Figura 3**).

Figura 3 - Perfil de genes de resistência a antimicrobianos* em genomas de amostras de *E. faecalis* e *E. faecium* isoladas de pacientes humanos hospitalizados no Rio de Janeiro.



Perfil de genes de resistência aos antimicrobianos

1. *vanHAX, aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia, aph(3')-IIIa, ant(6')-Ia, sat4, ermB, drfF, aac(6')-Ii* e *msrC*.
2. *vanHAX, aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia, aph(3')-IIIa, ant(6')-Ia, sat4, ermB, aac(6')-Ii* e *msrC*.
3. *vanHAX, aph(3')-IIIa, ant(6')-Ia, sat4, ermB, drfF, aac(6')-Ii* e *msrC*.
4. *vanHAX, aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia, ermB, IsaA, tet(M), cat* e *drfF*
5. *vanHAX, aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia, aph(3')-IIIa, ant(6')-Ia, sat4, ermB, drfF, aac(6')-Ii, msrC, tet(L)* e *tet(M)*
6. *aac(6')-Ii* e *msrC*.
7. *vanHAX, aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia, cat, drfF, ermB* e *msrC*
8. *vanHAX, aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia, ermB, IsaA, tet(M), cat, drfF* e *ant(6')-Ia*
9. *vanHAX, aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia, ermB, IsaA, tet(M)* e *cat*

*Árvore de similaridade dos perfis genotípicos de resistência aos antimicrobianos em *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, construída com auxílio do *software* BioNumerics v7.6 com base em dados binários (1 = presença; 0 = ausência dos genes de resistência), utilizando o método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). Grupos formados por cinco ou mais amostras foram destacados, com descrição dos genes presentes em cada agrupamento.

O viruloma foi composto por dezenove genes distintos e quatro operons associados a variadas estratégias de virulência. Dentre estes, estão relacionados à adesão os genes: *acm*, *scm* e *ace* (MSCRAMM de ligação de colágeno); o operon *ebpA/B/C* e os genes *pilB* e *pilA* (pili); *ecbA* (proteína de ancoragem de parede celular); *efaA* (antígeno de endocardite A); *sgrA* (adesina de ligação ao fibrinogênio); *esp* (proteína de superfície de enterococos); *asaI* e *agg* (substância agregativa). À invasão: *hyl* (glicosil hidrolase); *gelE* (gelatinase); *sprE* (serina protease); *fsrA/B/C* (sistema de quorum sensing) e o operon *cyl* (citolisina). Além desses, também foram identificados o locus *cps*, composto por onze genes associados à produção de uma cápsula antifagocitária, o gene *bopD*, envolvido na formação de biofilme, e os genes *eep*, *cad*, *cpd* e *cob*, responsáveis pela produção de feromônios.

Todos os genomas continham pelo menos um gene relacionado a determinantes de virulência. *E. faecium* apresentou uma média de $\bar{x} = 8,3$ genes por genoma, e *E. faecalis* uma média de $\bar{x} = 13,5$. As duas espécies apresentaram composição gênica sem diferenças qualitativas, ou seja, não foram observados genes associados exclusivamente a uma delas, mas as frequências gênicas variaram consideravelmente entre as espécies.

Dos dezenove genes e quatro operons que compuseram o viruloma das espécies, *E. faecalis* apresentou frequência superior a 65% em nove: *gelE*, *sprE*, *fsrA/B/C*, *efaA*, *ace*, *ecbA*, *pilB*, *bopD* e *ebpA/B/C*. Também foi observado em alta frequência o operon *cyl*, em 52% (n=31/60) desses genomas. Enquanto, *E. faecium* apresentou frequência superior a 80% em seis genes: *ecbA*, *sgrA*, *acm*, *pilB*, locus *cps* e *bopD* (**Figura 2**).

O gene *esp*, que codifica uma proteína de superfície importante na virulência e epidemiologia, foi observado em 29% (n=32/110) dos genomas de *E. faecium* e em 42% (n=25/60) dos genomas de *E. faecalis*. O gene *pilA* foi detectado em 58% (n=64/110) dos genomas de *E. faecium* e em 42% (n=25/60) de *E. faecalis* (**Figura 2**).

Os determinantes de feromônio *cad*, *cpd*, *cob* e *ccf*, responsáveis pela secreção dos feromônios *cADI*, *cPDI*, *cOBI* e *cCF10*, respectivamente, foram detectados em 48% (n=29/60) dos genomas de *E. faecalis* e em 31% (n=34/110) dos genomas de *E. faecium*. O gene *eep* (Enhanced Expression of Pheromone), que regula a expressão dos feromônios, esteve presente em 31% (n=34/110) dos genomas de *E. faecium* e em 48% (n=29/60) de *E. faecalis* (**Figura 2**). Outros genes foram identificados em menor frequência nos genomas de *E. faecalis*, como o locus *cps* e o gene *asaI*, presentes em 28% (n=17/60), os genes *acm* e *sgrA*, detectados em 27% (n=16/60), e os genes *hyl* e *scm*, presentes em apenas 2% (n=1/60) (**Figura 2**).

Em *E. faecium*, os genes com menor frequência foram o gene *hyl*, encontrado em 15% (n=16/110), os genes do sistema *gelE-sprE-fsrABC* e o gene *efaA*, em 14% (n=15/110), o operon *cyl*, detectado em 13% (n=12/110), o gene *asaI*, em 6% (n=7/110), o locus *cps*, em 5% (n=5/110), e o gene *agg*, em apenas 2 genomas de *E. faecium* (**Figura 2**).

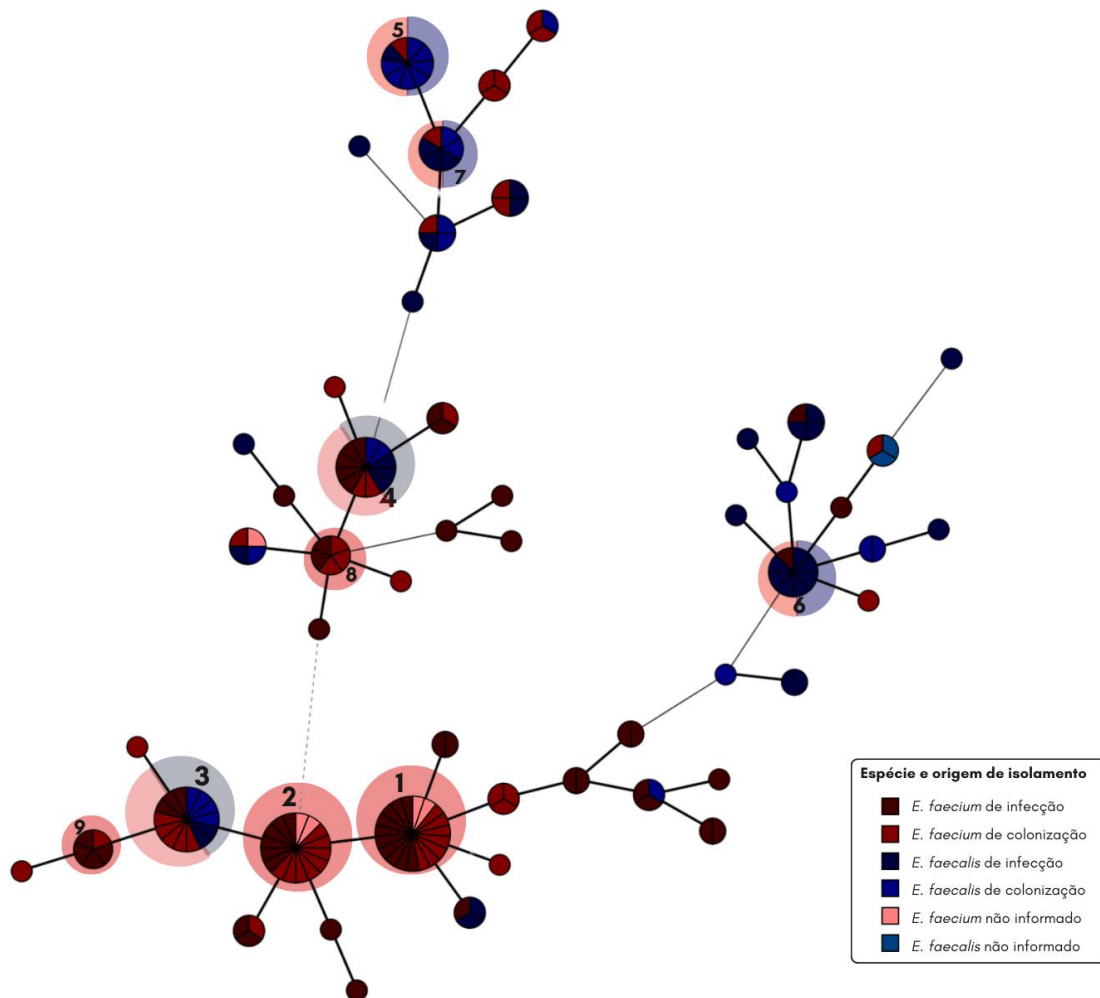
Entre os genomas de *E. faecium*, dois perfis principais foram identificados. O mais frequente, presente em 18% (n=20/110), incluía os genes *ecbA*, *pilB*, *sgrA*, *acm*, *scm*, locus *cps* e *bopD*. O segundo perfil, encontrado em 17% (n=19/110), continha os mesmos genes, exceto *scm*. Em *E. faecalis*, não foi observado um perfil predominante, evidenciando uma distribuição heterogênea dos genes. Assim como para os perfis de resistência, não foi observada separação clara entre os sítios de isolamento (infecção ou colonização), indicando que os perfis de virulência também não se correlacionaram diretamente com a origem clínica dos isolados (**Figura 4**).

Foram identificados genes e operons associados à tolerância a metais e outros microbicidas, incluindo cobre, cádmio, mercúrio, e desinfetantes como triclosan, clorexidina e cloreto de benzalcônio, além de antissépticos como acriflavina. Ao todo, foram detectados quatro genes e três operons, com destaque para os operons *efrA/B*, *2CS-CHX* e o gene *emeA* que codificam bombas de efluxo, conferindo resistência a múltiplos compostos.

Em *E. faecium*, os genótipos de tolerância a metais foram mais frequentes, especialmente para o cobre, com a presença do operon *YAZBtcr* (27%, n=30/110) e do gene *cueO* (26%, n=29/110). Para o mercúrio, o gene *merA* foi identificado em 24% (n=26/110), enquanto o gene *cadA*, associado à tolerância ao cádmio, em 4% (n=4/110) (**Figura 2**). Notavelmente, o gene *cueO* foi detectado em 97% (n=29/30) dos genomas que continham o operon *YAZBtcr*. Em *E. faecalis*, apenas o gene *cadA*, relacionado a tolerância ao cádmio, foi identificado, estando presente em 97% (n=58/60) desses genomas (**Figura 2**).

Quanto aos genótipos de tolerância a outros microbicidas, o operon *2CS-CHX* foi identificado em 100% (n=110/110) dos genomas de *E. faecium*, mas não foi detectado em *E. faecalis*. Por outro lado, o gene *emeA* foi observado em 100% (n=60/60) dos genomas de *E. faecalis*, mas estava ausente em genomas de *E. faecium*. Já os genes *efrA/B*, que codificam a bomba de efluxo EfrAB, estavam presentes em 100% dos genomas de ambas as espécies (**Figura 2**).

Figura 4 - Perfil de determinantes de virulência em genomas de amostras de *E. faecalis* e *E. faecium* isoladas de pacientes humanos hospitalizados no Rio de Janeiro.



Perfil de genes de virulência

- 1. *ecbA*, *pilB*, *sgrA*, *acm*, *scm*, e *bopD*
- 2. *ecbA*, *pilB*, *sgrA*, *acm*, e *bopD*
- 3. *ecbA*, *pilB*, *sgrA*, *acm*, *esp*, e *bopD*
- 4. *ecbA*, *pilB*, *sgrA*, *acm*, *esp*, *bopD*, *cad*, *cpd*, *cob*, *ccf* e *eep*
- 5. *ecbA*, *gelE*, *efaA*, *operon cyl*, *agg*, *locus cps*, *cad*, *cpd*, *cob*, *ccf* e *eep*
- 6. *ecbA*, *gelE*, *efaA*, *operon cyl*, *agg* e *pilA*
- 7. *ecbA*, *gelE*, *efaA*, *operon cyl*, *agg*, *cad*, *cpd*, *cob*, *ccf* e *eep*
- 8. *ecbA*, *pilB*, *sgrA*, *acm*, *bopD*, *cad*, *cpd*, *cob*, *ccf* e *eep*
- 9. *ecbA*, *pilB*, *sgrA* e *acm*

*Árvore de similaridade dos perfis genotípicos de virulência em *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, construída com auxílio do *software* BioNumerics v7.6 com base em dados binários (1 = presença; 0 = ausência dos genes de resistência), utilizando o método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). Grupos formados por cinco ou mais amostras foram destacados, com descrição dos genes presentes em cada agrupamento.

Foram inferidas correlações estatísticas entre genes de tolerância a metais e outros microbicidas com genes de resistência antimicrobiana e determinantes de virulência em ambas as espécies, conforme ilustrado pelas células vermelhas nas **Tabelas 3 e 4**. Entre os achados, destacaram-se as correlações observadas nos genomas de *E. faecium* entre o gene *merA* e o operon de resistência a glicopeptídeos *vanHAX* ($p = 0,0171$), bem como com os genes de resistência a aminoglicosídeos *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* ($p = 0,0198$) e *aph(3')-III* ($p = 0,0281$), além do gene *cat* ($p = 0,025$), relacionado à resistência ao cloranfenicol. Adicionalmente, *merA* também apresentou correlações com genes de virulência, como *pilA* (formação de pili, $p = 0,0324$) e *sgrA* (aderência, $p = 0,0152$). O operon *YAZBtcr*, associado à tolerância ao cobre, também demonstrou correlações estatísticas em genomas de *E. faecium*, sendo relacionado ao operon *vanHAX* ($p = 0,0117$) e aos genes *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* ($p = 0,0009$) e *aph(3')-III* ($p = 0,0281$).

Além disso, co-ocorrências importantes de genes de resistência a antimicrobianos, determinantes de virulência e à tolerância a metais e outros microbicidas foi identificada em ambas as espécies, *E. faecium* e *E. faecalis*, embora com frequências e associações de genótipos distintos. Essas associações podem ser visualizadas nas **Tabelas 3 e 4**.

Nos genomas de *E. faecium* que continham os operons *YAZBtcr* e *2CS-CHX*, e os genes *cueO* e *merA*, foram observados a presença de determinantes de virulência e genes de resistência a antimicrobianos (incluindo os de maior importância clínica) em, no mínimo, 60% dos casos. Em *E. faecalis*, os genomas que continham os genes *cadA* e *emeA* também estavam presentes determinantes de virulência e genes de resistência a antimicrobianos.

Entre os eventos de co-circulação observados nos genomas de *E. faecium*, a presença concomitante dos genes *merA* (observado em 26 dos 110 genomas de *E. faecium*) e o operon *vanHAX* foi observada em 22% ($n=24/110$). Outras relações com frequências consideráveis foram aquelas com os genes que conferem resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(3')-IIIa*, *sat4* e genes de resistência aos macrolídeos, estreptograminas e lincosamidas, *ermB* e *msrC*, encontrados em mais de 21% dos genomas de *E. faecium* (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Co-ocorrência de genes de tolerância a metais e outros microbicidas com genes associados a resistência a antimicrobianos em 60 genomas de *E. faecalis* e 110 de *E. faecium* isolados de pacientes humanos hospitalizados no Rio de Janeiro.

Genes de Resistência a Antimicrobianos	Genes de Tolerância Metais Pesados e outros Microbicidas								
	<i>E. faecalis</i> (n=60)			<i>E. faecium</i> (n=110)					
	<i>cadA</i> (n=58)	<i>emeA</i> (n=60)	<i>efrA/B</i> (n=60)	<i>merA</i> (n=26)	<i>YAZBtcr</i> (n=30)	<i>cueO</i> (n=29)	<i>cada</i> (n=4)	2CS-CHX (n=110)	<i>efrA/B</i> (n=110)
<i>vanHAX</i>	75% (n=49)	80% (n=48)	80% (n=48)	22% (n=24)	24% (n=26)	22% (n=24)	2% (n=2)	75% (n=82)	75% (n=82)
<i>aac(6')-Ii</i>	-	-	-	23% (n=25)	26% (n=29)	25% (n=28)	4% (n=4)	98% (n=109)	98% (n=109)
<i>aac(6')-aph(2'')</i>	72% (n=43)	75% (n=43)	75% (n=43)	21% (n=23)	25% (n=27)	21% (n=23)	3% (n=3)	65% (n=72)	65% (n=72)
<i>ant(6)-Ia</i>	30% (n=18)	30% (n=18)	30% (n=18)	19% (n=21)	22% (n=24)	20% (n=22)	3% (n=3)	78% (n=86)	78% (n=86)
<i>ant(9)-Ia</i>	3% (n=2)	3% (n=2)	3% (n=2)	-	1% (n=1)	-	-	2% (n=2)	2% (n=2)
<i>aph(3')-III</i>	33% (n=20)	33% (n=20)	33% (n=20)	22% (n=24)	24% (n=26)	23% (n=25)	3% (n=3)	80% (n=88)	80% (n=88)
<i>aph(2'')-Id</i>	-	-	-	-	-	1% (n=1)	-	1% (n=1)	1% (n=1)
<i>sat4</i>	18% (n=11)	18% (n=11)	18% (n=11)	21% (n=23)	23% (n=25)	22% (n=24)	3% (n=3)	60% (n=86)	60% (n=86)
<i>cat</i>	60% (n=36)	63% (n=38)	63% (n=38)	2% (n=2)	1% (n=1)	3% (n=3)	-	5% (n=6)	5% (n=6)
<i>dfrF</i>	48% (n=29)	52% (n=31)	52% (n=31)	-	5% (n=5)	1% (n=1)	3% (n=3)	53% (n=58)	53% (n=58)
<i>dfrG</i>	2% (n=1)	2% (n=1)	2% (n=1)	2% (n=2)	4% (n=4)	3% (n=3)	-	7% (n=8)	7% (n=8)
<i>erm(A)</i>	3% (n=2)	3% (n=2)	3% (n=2)	-	1% (n=1)	-	-	2% (n=2)	2% (n=2)
<i>erm(B)</i>	90% (n=54)	93% (n=56)	93% (n=56)	21% (n=23)	24% (n=26)	21% (n=23)	3% (n=3)	81% (n=70)	81% (n=70)
<i>lnuB</i>	-	-	-	2% (n=2)	2% (n=2)	4% (n=4)	1% (n=1)	10% (n=89)	10% (n=89)
<i>lnuG</i>	-	-	-	-	-	-	-	2% (n=2)	2% (n=2)
<i>lsa(A)</i>	82% (n=49)	83% (n=50)	83% (n=50)	-	-	-	-	-	-
<i>lsa(E)</i>	-	-	-	2% (n=2)	2% (n=2)	4% (n=4)	1% (n=1)	9% (n=10)	9% (n=10)
<i>msrC</i>	-	-	-	22% (n=24)	26% (n=29)	25% (n=28)	4% (n=4)	98% (n=108)	98% (n=108)
<i>tetM</i>	90% (n=54)	93% (n=56)	93% (n=56)	4% (n=4)	3% (n=3)	5% (n=6)	1% (n=1)	28% (n=31)	28% (n=31)
<i>tetL</i>	-	-	-	5% (n=5)	4% (n=4)	5% (n=6)	1% (n=1)	22% (n=24)	22% (n=24)

Genes de Resistência a Antimicrobianos	Genes de Tolerância Metais Pesados e outros Microbicidas								
	<i>E. faecalis</i> (n=60)				<i>E. faecium</i> (n=110)				
	<i>cadA</i> (n=58)	<i>emeA</i> (n=60)	<i>efrA/B</i> (n=60)	<i>merA</i> (n=26)	<i>YAZBtcr</i> (n=30)	<i>cueO</i> (n=29)	<i>cada</i> (n=4)	2CS-CHX (n=110)	<i>efrA/B</i> (n=110)
<i>tetS</i>	-	-	-	-	-	-	-	2% (n=2)	2% (n=2)
<i>crf(B)</i>	-	-	-	-	-	-	-	1% (n=1)	1% (n=1)

As correlações estatisticamente significativas estão destacadas em células vermelhas. Observa-se que o gene *emeA* não estava presente em *E. faecium*, enquanto os genes *merA*, *cueO* e os operons *YAZBtcr* e *2CS-CHX* não foram detectados em *E. faecalis*. Além disso, os genes *emeA* estavam presentes em 100% (n=60/60) dos genomas de *E. faecalis*, o operon *2CS-CHX* em 100% (n=110/110) dos genomas de *E. faecium* e os genes *efrA/B* em 100% dos genomas de ambas as espécies (n=170/170). *Os valores apresentados foram arredondados para o número inteiro mais próximo.

Adicionalmente, a co-circulação do gene *merA* com o gene a níveis elevados de aminoglicosídeos *ant(6')-Ia* ocorreu em 19% (n=21/110). Notavelmente, os genes *acm* e *sgrA*, foram detectados em todos os vinte e seis genomas que continham o gene de tolerância ao mercúrio, observados em concomitância em 24% (n=26/110) dos genomas de *E. faecium*. Frequências maiores que 20% foram observadas também para os determinantes de virulência *ecbA*, *bopD* e *pilB*. A combinação dos genes *pilA* e *merA* foi registrada em 16% (n=18/110) (**Tabela 4**).

O operon *YAZBtcr*, observado apenas em *E. faecium* (presente em 30 genomas dos 110 de *E. faecium*), também apresentou co-ocorrência com os genes de resistência adquirida a antimicrobianos: glicopeptídeos - *vanHAX* (24%, n=26/110); aminoglicosídeos - *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* (24%, n=27/110), *sat4* (23%, n=25/110), *aph(3')-IIIa* (24%, n=26/110) e *ant(6')-Ia* (22%, n=24/110); macrolídeos, estreptograminas e lincosamidas - *ermB* (24%, n=26/110) e *msrC* (26%, n=29/110); além dos determinantes de virulência *pilB*, *scm*, *bopD*, *acm*, *sgrA* e *ecbA* em mais de 23% dos genomas. A combinação do operon *pilA* e *YAZBtcr* foi observada em 16% (n=18/110) (**Tabela 4**).

Em *E. faecalis*, as co-ocorrências que mais se destacaram foi a presença concomitante dos genes de resistência a cádmio *cadA* (presente em 58 dos 60 genomas de *E. faecalis*) e o operon *vanHAX* (77%, n=46/60), *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* (72%, n=43/60), *erm(B)* 90%, n=54/60), *lsa(A)* (82%, n=49/60), *cat* (60%, n=36/60), *dfrF* (48%, n=29/60), *tetM* (90%, n=54/60), *aph(3')-IIIa* (33%, n=20/60), *ant(6')-Ia* (30%, n=18/60) e *sat4* (18%, n=11/60) (**Tabela 3**). Em relação a co-circulação de determinantes de virulência em conjunto com genes *cadA*, foi observado frequência maiores que 20% para os genes *ecb*, *bopD*, *esp*, operon *fsr*, *gelE*, *sprE*, *ace*, operon *ebpA/B/C*, *efaA*, operon *cyl*, *asa1*, *agg*, operon *cps*, *pilA*,

pilB, determinantes de feromônios (*cob*, *cpd*, *cad* e *ccf*) e da expressão dos feromônios (*eep*) (Tabela 4).

Das quatro sequências de *E. faecium* que continham o gene *cadA*, representando 4% (n=4/110), metade também possuía o gene *vanHAX* (2%, n=2/110). Três desses genomas apresentaram os genes *aac(6')-Ie-aph(2'')*-Ia, *ant(6')-Ia*, *aph(3')-III*, *sat4*, *dfrF* e *emrB* (3%, n=3/110). Em relação aos determinantes de virulência, todas as sequências continham os genes *ecbA*, *bopD*, *acm*, *pilA* e *pilB* (Tabela 4).

Tabela 4 - Co-ocorrência de genes de tolerância a metais e outros microbicidas com genes associados a determinantes de virulência em 60 genomas de *E. faecalis* e 110 de *E. faecium* isolados de pacientes humanos hospitalizados no Rio de Janeiro

Genes Relacionados a Determinantes de Virulência	Genes de Tolerância a Metais Pesados e outros Microbicidas								
	<i>E. faecalis</i> (n=60)					<i>E. faecium</i> (n=110)			
	<i>cadA</i> (n=58)	<i>emeA</i> (n=60)	<i>efrA/B</i> (n=60)	<i>merA</i> (n=26)	<i>YAZBtcr</i> (n=30)	<i>cueO</i> (n=29)	<i>cada</i> (n=4)	2CS-CHX (n=110)	<i>efrA/B</i> (n=110)
<i>ecbA</i>	85% (n=51)	88% (n=53)	88% (n=53)	20% (n=22)	24% (n=26)	21% (n=23)	3% (n=3)	85% (n=94)	83% (n=91)
<i>bopD</i>	97% (n=58)	100% (n=60)	100% (n=60)	24% (n=26)	27% (n=30)	26% (n=29)	4% (n=4)	100% (n=110)	100% (n=110)
<i>scm</i>	2% (n=1)	2% (n=1)	2% (n=1)	15% (n=14)	26% (n=29)	26% (n=29)	1% (n=1)	78% (n=86)	31% (n=34)
<i>sgrA</i>	25% (n=15)	27% (n=16)	27% (n=16)	24% (n=26)	25% (n=28)	25% (n=27)	2% (n=2)	71% (n=78)	75% (n=82)
<i>esp</i>	40% (n=24)	42% (n=25)	42% (n=25)	1% (n=1)	3% (n=3)	2% (n=2)	2% (n=2)	25% (n=28)	29% (n=32)
<i>fsr operon</i>	65% (n=39)	70% (n=42)	70% (n=42)	-	-	-	1% (n=1)	1% (n=1)	14% (n=15)
<i>gelE</i>	65% (n=39)	70% (n=42)	70% (n=42)	-	-	-	1% (n=1)	14% (n=15)	14% (n=15)
<i>sprE</i>	65% (n=39)	70% (n=42)	70% (n=42)	-	-	-	1% (n=1)	14% (n=15)	14% (n=15)
<i>ace</i>	63% (n=38)	67% (n=40)	67% (n=40)	-	-	-	1% (n=1)	14% (n=15)	14% (n=15)
<i>ebpA/B/C</i>	68% (n=41)	72% (n=43)	72% (n=43)	-	-	-	1% (n=1)	14% (n=15)	14% (n=15)
<i>efaA</i>	68% (n=41)	72% (n=43)	72% (n=43)	-	-	-	1% (n=1)	14% (n=15)	14% (n=15)
<i>cyl operon</i>	48% (n=29)	52% (n=31)	52% (n=31)	-	-	-	1% (n=1)	12% (n=13)	12% (n=13)
<i>asaI</i>	27% (n=16)	28% (n=17)	28% (n=17)	-	-	-	1% (n=1)	6% (n=7)	6% (n=7)
<i>agg</i>	83% (n=50)	85% (n=51)	85% (n=51)	2% (n=2)	5% (n=5)	2% (n=2)	-	2% (n=2)	2% (n=2)

		Genes de Tolerância a Metais Pesados e outros Microbicidas							
Genes Relacionados a Determinantes de Virulência	<i>E. faecalis</i> (n=60)			<i>E. faecium</i> (n=110)					
	<i>cadA</i> (n=58)	<i>emeA</i> (n=60)	<i>efrA/B</i> (n=60)	<i>merA</i> (n=26)	<i>YAZBtcr</i> (n=30)	<i>cueO</i> (n=29)	<i>cada</i> (n=4)	2CS-CHX (n=110)	<i>efrA/B</i> (n=110)
<i>acm</i>	27% (n=16)	27% (n=16)	27% (n=16)	24% (n=26)	27% (n=30)	26% (n=29)	3% (n=3)	81% (n=89)	81% (n=89)
<i>locus cps</i>	28% (n=17)	28% (n=17)	28% (n=17)	-	-	-	1% (n=1)	5% (n=5)	5% (n=5)
<i>pilA</i>	40% (n=24)	42% (n=25)	42% (n=25)	16% (n=18)	16% (n=18)	15% (n=17)	4% (n=4)	58% (n=64)	58% (n=64)
<i>pilB</i>	92% (n=55)	95% (n=57)	95% (n=57)	22% (n=24)	26% (n=29)	24% (n=26)	4% (n=4)	96% (n=106)	96% (n=106)
<i>hylfm</i>	2% (n=1)	2% (n=1)	2% (n=1)	-	2% (n=2)	1% (n=1)	1% (n=1)	15% (n=16)	15% (n=16)
<i>cob</i>	47% (n=28)	48% (n=29)	48% (n=29)	2% (n=2)	5% (n=5)	2% (n=2)	-	31% (n=34)	31% (n=34)
<i>cpd</i>	47% (n=28)	48% (n=29)	48% (n=29)	2% (n=2)	5% (n=5)	2% (n=2)	-	31% (n=34)	31% (n=34)
<i>cad</i>	47% (n=28)	48% (n=29)	48% (n=29)	2% (n=2)	5% (n=5)	2% (n=2)	-	31% (n=34)	31% (n=34)
<i>ccf</i>	47% (n=28)	48% (n=29)	48% (n=29)	2% (n=2)	5% (n=5)	2% (n=2)	-	31% (n=34)	31% (n=34)
<i>eep</i>	47% (n=28)	48% (n=29)	48% (n=29)	2% (n=2)	5% (n=5)	2% (n=2)	-	31% (n=34)	31% (n=34)

As correlações estatisticamente significativas estão destacadas em células vermelhas. Observa-se que o gene *emeA* não estava presente em *E. faecium*, enquanto os genes *merA*, *cueO* e os operons *YAZBtcr* e *2CS-CHX* não foram detectados em *E. faecalis*. Além disso, os genes *emeA* estavam presentes em 100% (n=60/60) dos genomas de *E. faecalis*, o operon *2CS-CHX* em 100% (n=110/110) dos genomas de *E. faecium* e os genes *efrA/B* em 100% dos genomas de ambas as espécies (n=170/170). *Os valores apresentados foram arredondados para o número inteiro mais próximo.

Os genes *efrA/B*, que codificam a bomba de efluxo EfrAB, presentes em todos dos genomas de ambas as espécies, o operon *2CS-CHX*, detectado em todos (n=110/110) os genomas de *E. faecium*, e o gene *emeA*, responsável pela codificação da bomba de efluxo EmeA, identificado em todos de *E. faecalis* (n=60/60), apresentaram alta correlação com genes de resistência a antimicrobianos e determinantes de virulência (**Tabelas 3 e 4**).

Adicionalmente, destacou-se a co-ocorrência de genes de tolerância a metais, especialmente em *E. faecium*. O operon *YAZBtcr* e os genes *merA* e *cueO* foram identificados concomitantemente em 20% (n = 22/110) desses genomas.

5.3 Elementos genéticos móveis

O mobiloma de *E. faecium* e *E. faecalis* foi composto por sequências de inserção (IS), transposons (*Tn*) e genes associados à replicação de plasmídeos (famílias *rep*). Todos os elementos encontrados e suas respectivas frequências por espécie estão demonstrados na **Figura 5**. Os genomas de *E. faecium* apresentaram uma extensa diversidade de famílias de replicons (*rep*), encontradas dezenove famílias *rep* diferentes, sendo os tipos mais frequentes o *repUS15* e o *rep17a*, presentes em 83% (n=91/110) e 75% (n=83/110) dos genomas, respectivamente, ambas pertencentes à grande família de plasmídeos denominada RepA_N. O *repUS43* foi encontrado em 33% (n=36/110). Outros replicons estavam presentes em menor frequência, no intervalo de 24 a 9%, incluindo *rep11a*, *rep14a*, *rep18a*, *rep1*, *rep29*, *rep2*, *rep7a*, *rep9* e *rep8*. As famílias *repUS1*, *rep22*, *repUS57*, *repUS58*, *repUS47*, *repUS12* e *rep6a* foram observadas em menos de 5% dos genomas de *E. faecium* (**Figura 5**).

Em *E. faecalis*, foram identificados doze tipos de famílias *rep*. Os replicons mais prevalentes foram, em sua maioria, famílias *rep* previamente descritas em plasmídeos sensíveis a feromônios, como *repUS43* (*DOP1*) presente em 87% (n=52/60), *rep9* (*pADI*) em 77% (n=46/60) e *rep7a* (*pRE25*) em 62% (n=37/60). Outros replicons estavam presentes em menor frequência: *rep2* em 37% (n=22/60), *rep14a* em 23% (n=14/60), *rep11a* em 13% (n=8/60), *rep6* em 11% (n=7/60), *rep29* em 10% (n=6/60), *rep18a* em 8% (n=5/60), *repUS15* em 3% (n=2/60) e *rep1* e *rep17a*, cada um em 3% (n=2/60) (**Figura 5**).

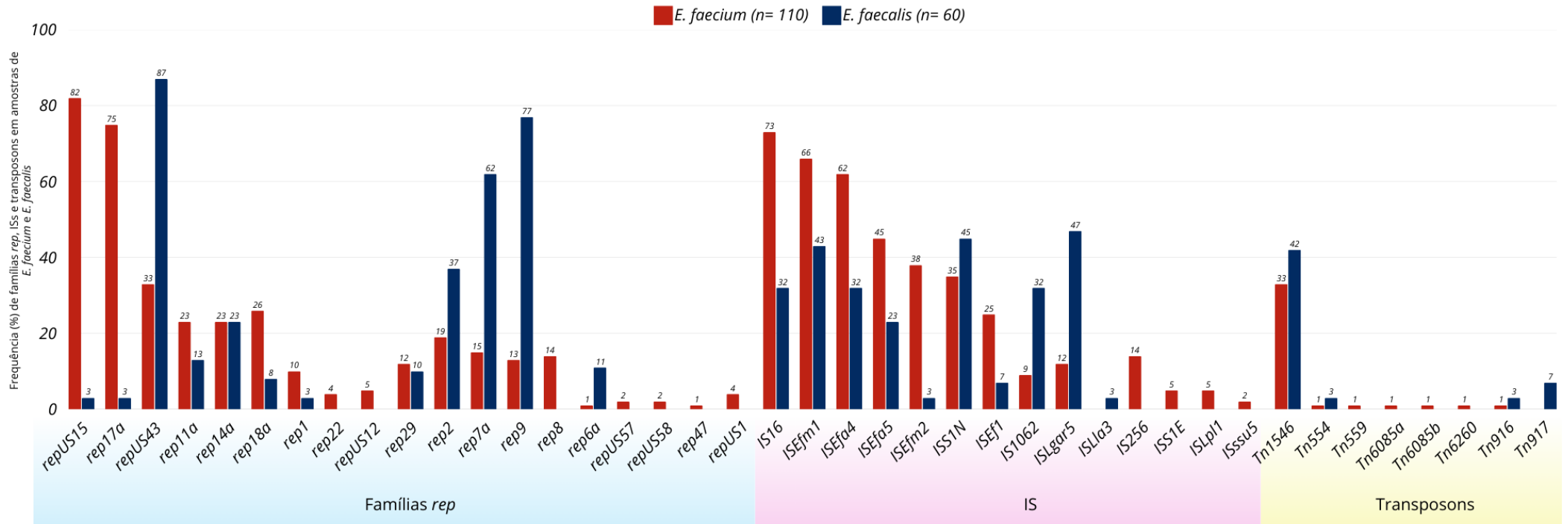
Em relação às sequências de inserção identificadas, *E. faecium* apresentou treze tipos distintos, enquanto *E. faecalis* apresentou dez. Em *E. faecium*, as ISs mais frequentes foram *IS16*, presente em 73% (n=80/110), seguida por *ISEfm1* em 66% (n=73/110), *ISEfa4* em 62% (n=68/110), *ISEfa5* em 45% (n=49/110) e *ISEfm2* em 38% (n=2/110). Outras IS identificadas incluíram *ISSIN*, observada em 35% (n=39/110), *ISEf1* em 25% (n=28/110), *IS256* em 14% (n=16/110), *ISLgar5* em 12% (n=13/110), *IS1062* em 9% (n=10/110), *ISSIE* em 5% (n=6/110) e *ISLpl1* em 5% (n=5/110) (**Figura 5**).

Em *E. faecalis*, as inserções mais frequentes foram a *ISLgar5*, identificada em 47% (n=28/60), seguida por *ISSIN* em 45% (n=27/60), *ISEfm1* em 43% (n=26/60) e *IS1062*, *IS16* e *ISEfa4*, cada uma em 32% (n=19/60). Outras IS observadas em *E. faecalis* incluíram *ISEfa5* em 23% (n=14/60), *ISEf1* em 7% (n=4/60) e *ISEfm2* e *ISLla3*, cada uma em 3% (n=2/60) (**Figura 5**).

A maioria das IS anotadas em *E. faecium* e *E. faecalis* foi identificada como descritas dentro da própria espécie ou a outros membros do gênero *Enterococcus* (*IS16*, *ISEfm1*, *ISEfa4*, *ISEfa5*, *ISEfm2*, *ISEf1* e *IS256*) Entretanto, também foram encontradas quatro IS identificadas em *Lactococcus lactis*: *ISS1N*, *ISS1E*, *ISLgar5* e *ISLla3*. Além disso, uma IS foi associada a *Staphylococcus aureus* (*IS1062*), e uma a *Lactobacillus plantarum* (*ISLp11*) **(Figura 5)**.

Em relação aos transposons identificados, *E. faecium* apresentou sete tipos distintos, enquanto *E. faecalis* apresentou quatro. O *Tn1546* foi o mais frequente em ambas as espécies, identificado em 33% (n=36/110) dos genomas de *E. faecium* e em 42% (n=25/60) de *E. faecalis*. Além deste, *E. faecium* apresentou também os transposons *Tn554*, *Tn559*, *Tn6085a*, *Tn6085b*, *Tn6260* e *Tn916*, cada um identificado em 1% (n=1/110) dos genomas dessa espécie. Já em *E. faecalis*, os transposons *Tn917*, *Tn916* e *Tn554* foram identificados em 7% (n=5/60), 3% (n=2/60) e 3% (n=2/60), respectivamente **(Figura 5)**.

Figura 5 - Frequência de EGMs (Famílias *rep*, IS e Transposons) em 110 genomas de *E. faecium* e 60 de *E. faecalis* oriundos de amostras isoladas de pacientes humanos hospitalizados no Rio de Janeiro.



Famílias de replicons de plasmídeos (*rep*) - barra azul na horizontal; Sequências de inserção (IS), *ISEfm* (Sequências de inserção de *E. faecium*) e *ISEfa* (Sequências de inserção de *E. faecalis*), *ISLgar* (Sequência de inserção de *Lactococcus lactis*), *ISLla* (Sequência de inserção de *Lactococcus lactis*), *ISLp1* (Sequência de inserção de *Lactobacillus plantarum*) - barra rosa na horizontal; Transposons (*Tn*) - barra amarela na horizontal. O número sobre as barras verticais representa a quantidade de genomas onde aquele tipo de elemento genético móvel foi encontrado. *Os valores apresentados foram arredondados para o número inteiro mais próximo.

5.4 Análise do plasmidoma

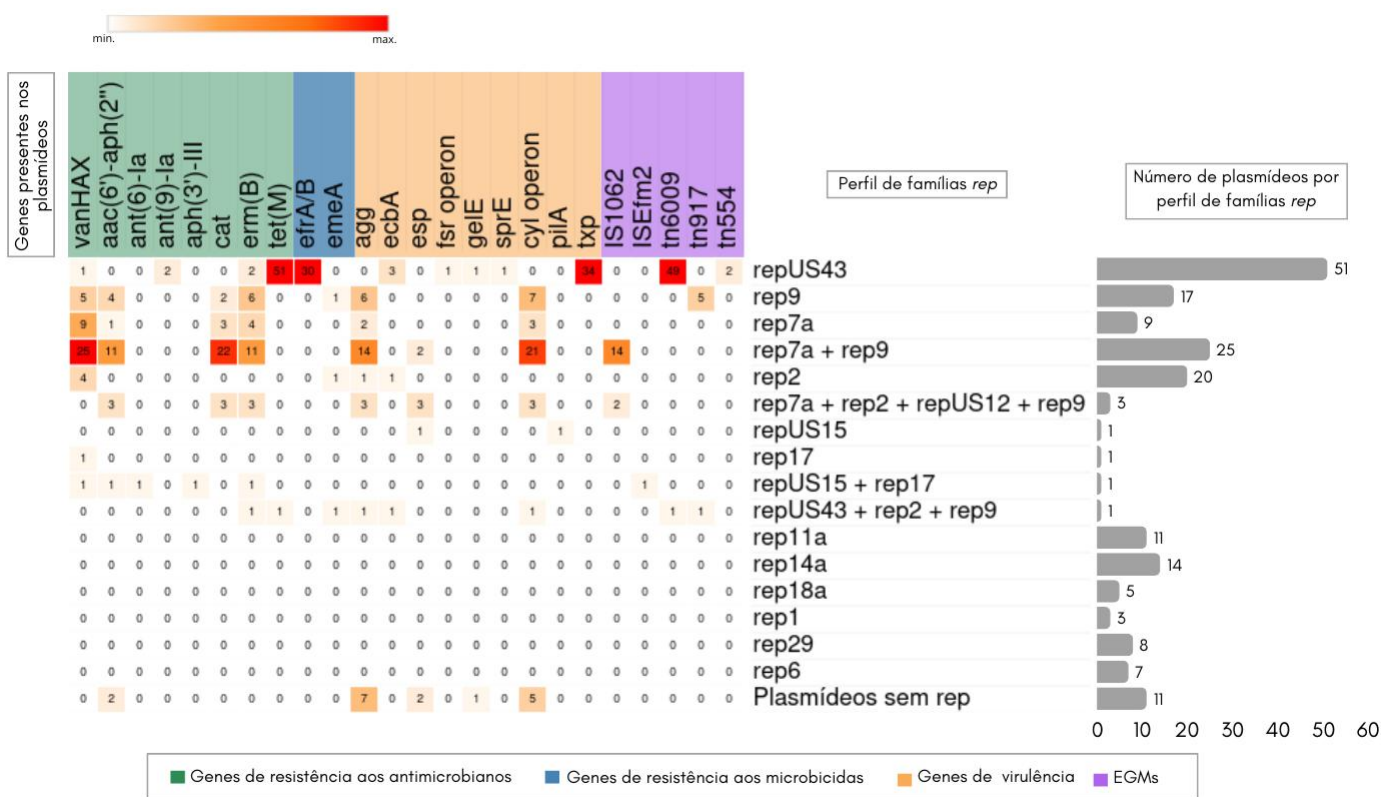
O plasmidoma extraído pelo Gplas revelou uma variedade de plasmídeos nos genomas, com destaque para *E. faecium*. Todos os genomas continham pelo menos um plasmídeo, porém o número médio de plasmídeos por genoma variou entre as espécies. Em *E. faecium*, foi observada a média de 3,8 plasmídeos por genoma, enquanto em *E. faecalis*, a média foi de 2,3 plasmídeos. O tamanho dos plasmídeos identificados variou amplamente, desde menos de 3 kb até mais de 326 kb, com uma diversidade de tamanhos também presente dentro de cada grupo de plasmídeos. Entretanto, a variação de tamanho dentro dos grupos foi menor em comparação com a diversidade observada na população total de plasmídeos.

Foi observado uma grande representatividade das famílias *rep* nas sequências de plasmídeos que foram identificadas pelo Gplas, observando as famílias *rep* mais frequentes por genomas das espécies associadas às sequências de plasmídeos. No entanto, nem todas as sequências classificadas como plasmídeos apresentavam famílias *rep* e uma grande diversidade apresentavam apenas a família *rep*, sem os demais genes de interesse do estudo. Alguns plasmídeos continham mais de uma família *rep*, sendo classificados como multi-replicons. Esses plasmídeos apresentaram, em média, um tamanho maior em comparação com suas versões que possuíam apenas uma família de replicação. Além disso, exibiam um perfil de genes mesclado em relação aos plasmídeos com uma única família *rep*, sugerindo a possível presença de co-integrados de plasmídeos (**Figuras 6 e 7**).

As análises indicaram que cada espécie apresentou uma população de plasmídeos com padrões distintos, com diferenças na diversidade de tipos de famílias *rep*, sendo que *E. faecium* apresentou maior diversidade, até na frequência dos plasmídeos observados nas duas espécies, onde as famílias *rep* de maior frequência em *E. faecium* não foram as mesmas observadas em maior frequência em *E. faecalis*. Além disso, embora ambas as espécies compartilhassem dos mesmos genes transportados em plasmídeos, a circulação destes genes foi encontrada em plasmídeos com tipos de famílias *rep* diferentes, dependendo da espécie em questão (**Figuras 6 e 7**).

operon de resistência à vancomicina: *vanHAX*, três genes associados a resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos: *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *ant(6')-Ia* e *aph(3')-IIIa*, um gene associado à resistência a macrolídeos: *erm(B)* e o gene *pilA* associado à formação de pili. É importante destacar a presença das sequências de inserção *ISEfa4* e *ISEfm2* em 58% (n=26/45) e 29% (n=13/45) dos plasmídeos multi-replicon *repUS15/rep17* (Figura 6).

Figura 7 - Distribuição de genes associados a resistência a antimicrobianos, a virulência e a tolerância a metais pesados e outros microbicidas, de acordo com o perfil de plasmídeos em 60 genomas oriundos de amostras de *E. faecalis* isoladas de pacientes hospitalizados no Rio de Janeiro.



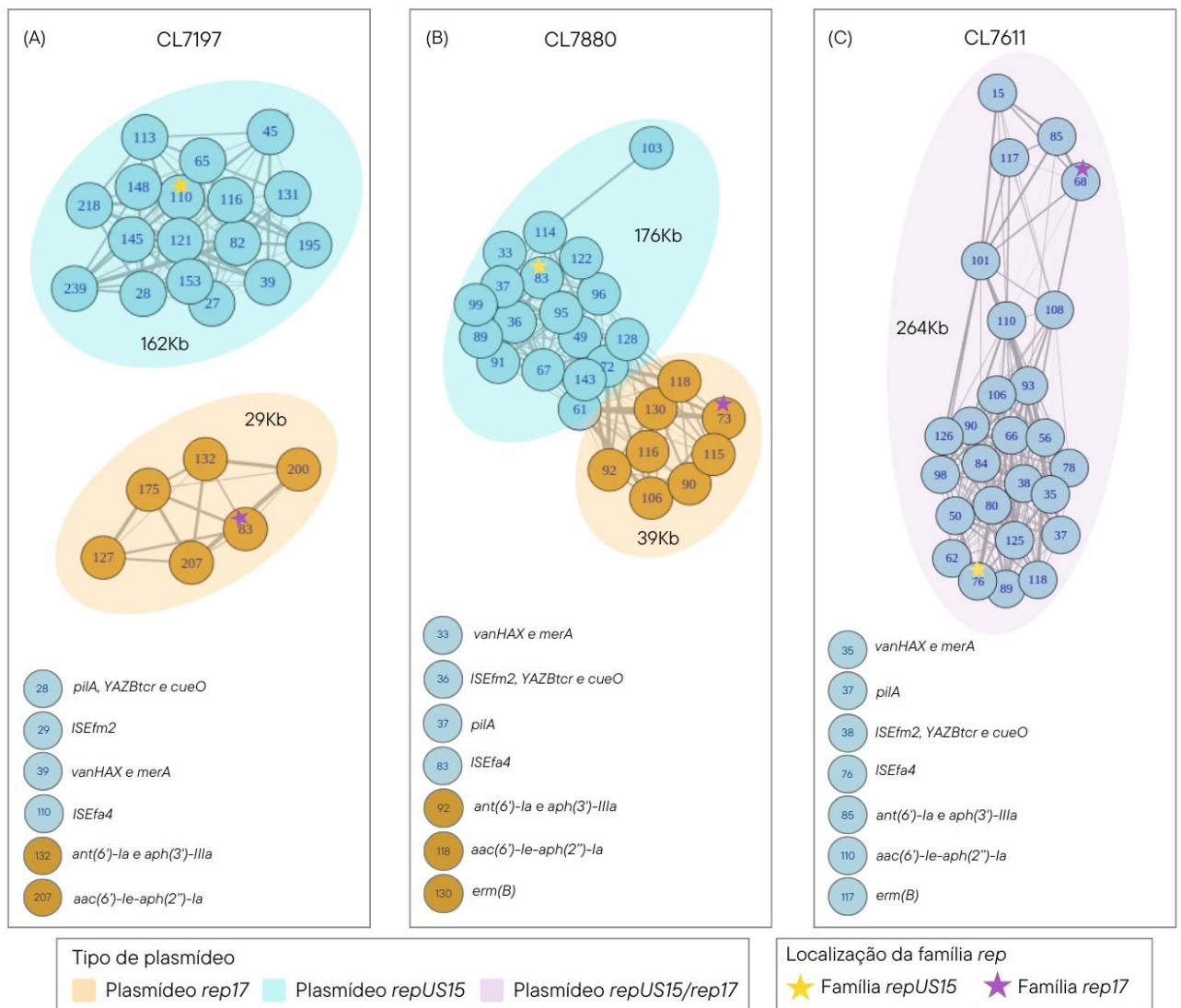
A variação das cores/intensidade na tabela numérica representa a frequência por quantidade do gene em plasmídeos caracterizados por famílias *rep*, do branco (ausência do gene) ao vermelho intenso (maior quantidade observada para o gene).

Além da configuração em multi-replicon, os plasmídeos das famílias *repUS15* e *rep17* também foram observados circulando desintegrados e frequentes em *E. faecium*, sendo encontrados em 27% (n=30/110) dos genomas cada, respectivamente. Os plasmídeos *rep17* apresentaram tamanhos variando entre 9 e 155 kb, enquanto os *repUS15* demonstraram maior variabilidade, com tamanhos entre 21 e 204 kb.

A análise individual desses plasmídeos revelou que determinados genes estavam mais frequentemente associados a um tipo específico de plasmídeo, sugerindo que os plasmídeos

repUS15 e *rep17* podem ter passado por eventos de recombinação, resultando na formação de co-integrados. Os plasmídeos da família *rep17* apresentaram genes relacionados à resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos, incluindo *ant(6')-Ia* e *aph(3')-IIIa*, além do gene *erm(B)*, associado à resistência a macrolídeos (**Figuras 6 e 8**).

Figura 8 - Grafo representando a organização dos principais plasmídeos (*repUS15*, *rep17* e *repUS15/rep17*) relacionados a co-circulação de genes associados a resistência a antimicrobianos, a virulência e tolerância a metais pesados e outros microbicidas em genomas oriundos de amostras de *E. faecium* isoladas de pacientes hospitalizados no Rio de Janeiro.



Os grafos representam a configuração dos plasmídeos *repUS15*, *rep17* e *repUS15/rep17* em três genomas distintos de *E. faecium*. Os círculos no grafo correspondem aos *Nodes*, que representam os *contigs* plasmidiais, enquanto as linhas que conectam os *Nodes* são as *Edges*, indicando as conexões baseadas na similaridade entre os *contigs*. Os números dentro dos círculos correspondem ao número do *contig* definido durante a montagem do genoma, e os genes presentes em cada *contig* estão descritos ao lado do círculo que os representa. Na imagem, a área azul contorna o plasmídeo *repUS15*, a área laranja representa o plasmídeo *rep17*, e a área roxa indica o plasmídeo multi-replicon *repUS15/rep17*. Os *Nodes* demarcados com o símbolo de estrela são onde foi localizada a sequência identificadora da família de plasmídeo: estrela amarela identifica a família *repUS15* e estrela roxa a família *rep17*.

Por outro lado, os plasmídeos *repUS15* continham genes relacionados à tolerância a metais, como *cueO*, *merA* e o operon *YAZBtcr*, além do gene *pilA*. Tanto o operon *vanHAX*, associado à resistência à vancomicina, quanto o gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, relacionado à resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos, foram identificados em ambos os tipos de plasmídeos. Especificamente, no caso dos plasmídeos *rep17*, o operon *vanHAX* e o gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* foram detectados em doze e onze desse plasmídeo, respectivamente. Já nos plasmídeos *repUS15*, ambos os genes foram encontrados em nove desse plasmídeo cada (**Figuras 6 e 8**).

Os genomas CL7197, CL7880 e CL7611 ilustram bem as diferentes configurações dos plasmídeos *repUS15*, *rep17* e sua versão multi-replicon *repUS15/rep17*. Essas configurações foram analisadas com base na rede do plasmidoma representada pelo grafo gerado pelo *Gplas*, no qual os *contigs* (*Nodes*) e a similaridade entre eles (*Edges*) são visualizados.

O genoma CL7197 apresentou os plasmídeos *repUS15* e *rep17* totalmente separados. O plasmídeo *repUS15* carrega os genes *cueO*, *merA* e o operon *YAZBtcr*, além de *pilA* e do operon *vanHAX*. Esse plasmídeo também inclui as sequências de inserção *ISEfm2* e *ISEfa4*. Por sua vez, o plasmídeo *rep17* contém os genes *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *ant(6')-Ia* e *aph(3')-IIIa*. No grafo gerado pelo *Gplas*, os *Nodes* desses plasmídeos aparecem completamente desconectados, sem *Edges* que estabeleçam uma relação entre eles. Além disso, os dois plasmídeos apresentam tamanhos distintos entre si onde o plasmídeo *repUS15* apresenta maior tamanho (**Figura 8A**).

O genoma CL7880 apresentou os plasmídeos *repUS15* e *rep17* como unidades distintas. Apesar disso, algumas similaridades entre seus *contigs* são suficientes para gerar *Edges* conectando parcialmente os *Nodes* de ambos os plasmídeos no grafo. Mesmo com essas conexões, seus perfis gênicos permanecem idênticos aos observados quando estão completamente separados, e seus tamanhos continuam diferentes entre si (**Figura 8B**).

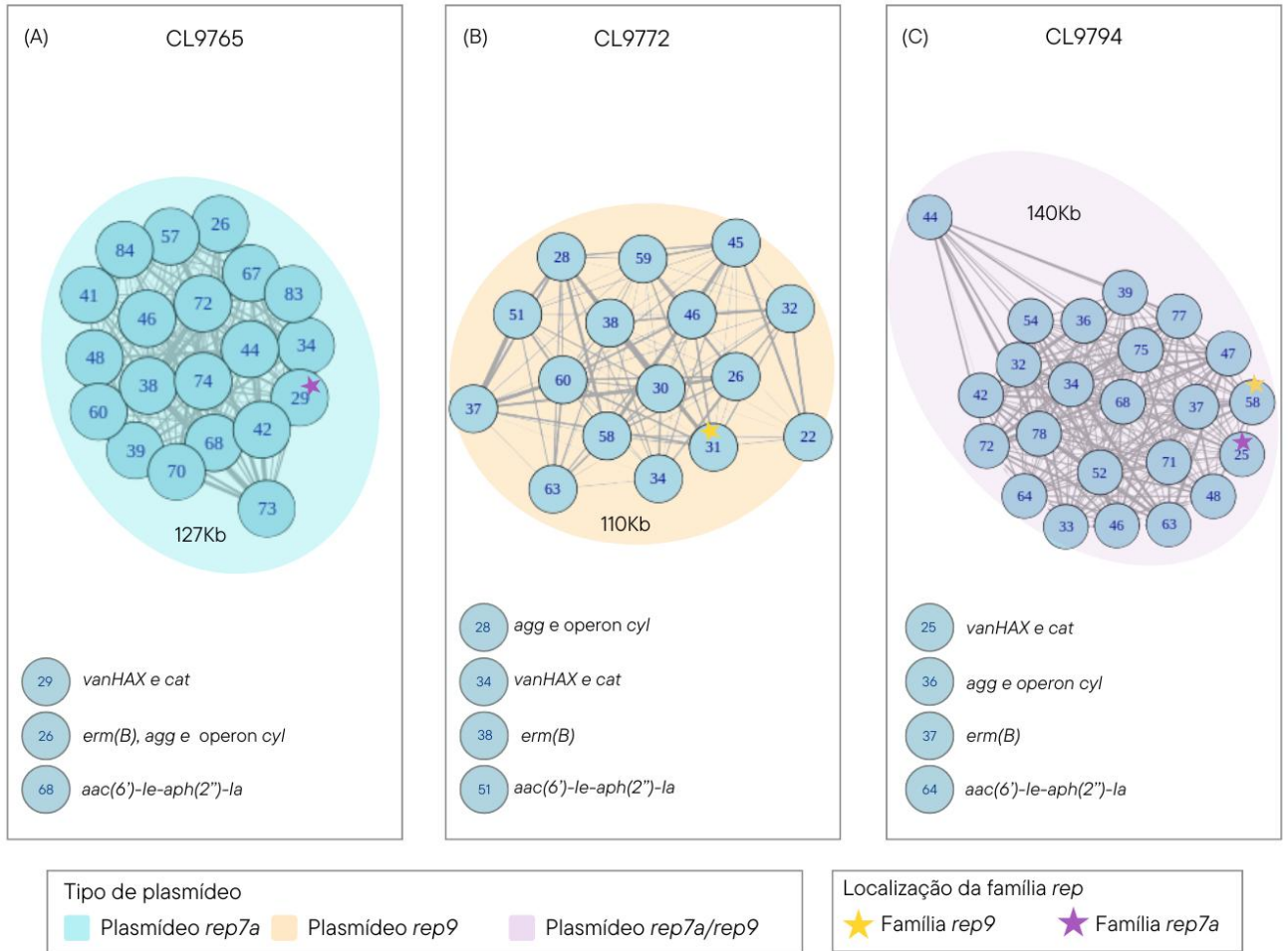
Por outro lado, o genoma CL7611 exibiu uma configuração integrada, representada pelo plasmídeo multi-replicon *repUS15/rep17*. Nesse caso, os genes de ambos os plasmídeos estão compartilhados em uma única estrutura contínua, formando um plasmídeo único. Essa configuração integrada resultou em um plasmídeo maior do que a soma dos tamanhos individuais observados quando os plasmídeos estão separados (**Figura 8C**).

Outros plasmídeos multi-replicons em *E. faecium* que também se destacaram por conter genes de importância clínica humana juntamente com genes de resistência a metais foram os cointegrados de família *rep*: *repUS15* e *rep1*, associados aos genes *aph(2'')*-*Id*, *lnu(B)*, *lsa(E)*, *pilA* e *cueO*, além das sequências de inserção *ISS1N* e *IS256*. O *rep17*, *repUS15*, *repUS47* e *rep2*, contendo uma diversidade de genes, como *aac(6')*-*aph(2'')*, *aph(3')*-*III*, *cat*, *lnu(B)*, *lsa(E)*, *VanHAX*, *YAZBtcr*, *cueO*, *pilA* e *merA*, além das sequências de inserção *ISEfm2*, *ISEf4*. O *repUS43*, *repUS12*, *repUS15* e *rep2* também associados aos genes *cueO*, *merA*, *YAZBtcr*, *ant(6)*-*Ia*, *vanHAX*, *tet(L)*, *tet(M)*, *pilA* e à sequência de inserção *ISEf4* (**Figura 6**).

Todos os genes de resistência a metais detectados em *E. faecium* estavam localizados em sequências classificadas como plasmídeos pelo Gplas. No entanto, em cinco casos, o operon *YAZBtcr* foi encontrado em sequências descritas como plasmídeos, mas sem a presença de famílias *rep*. Outro ponto, alguns replicons foram observados restritos à circulação de genes de resistência e/ou determinantes de virulência quando observados individualizados, em estruturas de não multi-replicon, o *rep17a*, *rep2*, *rep12*, *repUS43*, com os multi-replicons apresentando um destaque na co-circulação de genes de resistência/determinantes de virulência e tolerância a metais pesados e outros microbicidas (**Figura 6**).

Os plasmídeos de *E. faecalis*, diferentemente dos de *E. faecium*, não apresentaram relação com genes de tolerância a metais pesados, e os genes de tolerância a outros microbicidas combinados em um mesmo plasmídeo com uma menor diversidade de genes de resistência antimicrobiana e/ou a determinantes de virulência. A maioria dos plasmídeos de *E. faecalis* continha famílias *rep* relacionados a plasmídeos sensíveis a feromônios, como *repUS43*, *rep9* e *rep7a*, com destaque para o *repUS43*, identificado como plasmídeo sem estar integrado a outras famílias *rep* em 85% (n=51/60) desses genomas. Esse plasmídeo se revelou particularmente relevante ao apresentar os genes *efrA/B*, que codificam a bomba de efluxo EfrA/B, um achado inédito em plasmídeos, presente em trinta dos cinquenta e um plasmídeos da família *repUS43* dos genomas de *E. faecalis*. Além disso, os genes *tet(M)*, associados à resistência a tetraciclina, e *tpx*, que codifica uma enzima protetora contra o estresse oxidativo. Também foi identificado o transposon *Tn6009*, presente em quarenta e nove dos cinquenta e um. Adicionalmente, dois plasmídeos *repUS43* se destacaram por conter, além do perfil genético descrito, o transposon *Tn554*, que inclui os genes *erm(B)* e *ant(9)*-*Ia*, e um outro contendo o operon *vanHAX* não associado a genes de resistência a microbicidas (**Figura 9**).

Figura 9 - Grafo representando a organização dos plasmídeos *rep7a*, *rep9* e *rep7a/rep9* em três genomas oriundos de amostras de *E. faecalis* isoladas de pacientes hospitalizados no Rio de Janeiro



Os grafos representam a configuração dos plasmídeos *rep7a*, *rep9* e *rep7a/rep9* em três genomas distintos de *E. faecalis*. Os círculos no grafo correspondem aos *Nodes*, que representam os *contigs* plasmidiais, enquanto as linhas que conectam os *Nodes* são as *Edges*, indicando as conexões baseadas na similaridade entre os *contigs*. Os números dentro dos círculos correspondem ao número do *contig* definido durante a montagem do genoma, e os genes presentes em cada *contig* estão descritos ao lado do círculo que os representa. Na imagem, a área azul contorna o plasmídeo *rep7a*, a área laranja representa o plasmídeo *rep9*, e a área roxa indica o plasmídeo multi-replicon *rep7a/rep9*. Os *Nodes* demarcados com o símbolo de estrela são onde foi localizada a sequência identificadora da família de plasmídeo (*rep*): estrela amarela identifica a família *rep9* e estrela roxa a família *rep7a*.

Em *E. faecalis*, o segundo tipo mais frequente de plasmídeo foi um multi-replicon, composto pelas famílias *rep7a* e *rep9*. Esse plasmídeo foi identificado em 42% (n=25/60) desses genomas e frequentemente portava os genes *vanHAX*, *aac(6')-aph(2'')*, *cat*, *erm(B)*, *agg* e o operon *cyl*, além da sequência de inserção *IS1062*. Diferentemente do principal plasmídeo multi-replicon de *E. faecium*, esse plasmídeo não apresentou variação na distribuição dos genes quando suas formas integradas e desintegradas foram comparadas, exibindo frequências semelhantes para os genes mencionados e tamanhos equivalentes

(Figuras 7 e 9). Além disso, observou-se que os plasmídeos desintegrados não ocorriam simultaneamente no mesmo genoma, sendo cada genoma portador de apenas uma das configurações.

Embora não tenha sido identificado com frequência um mesmo plasmídeo carregando genes de tolerância a microbicidas, resistência aos antimicrobianos e/ou a determinantes de virulência, os operons *vanHAX* e *cyl*, assim como o gene *aac(6')-aph(2'')*, estavam presentes em genomas que apresentavam também o plasmídeo *repUS43*, com genes de tolerância a microbicidas, em respectivas frequências: 43% (n=22/51), 39% (n=20/51) e 25% (n=13/51), conferindo a também a co-resistência.

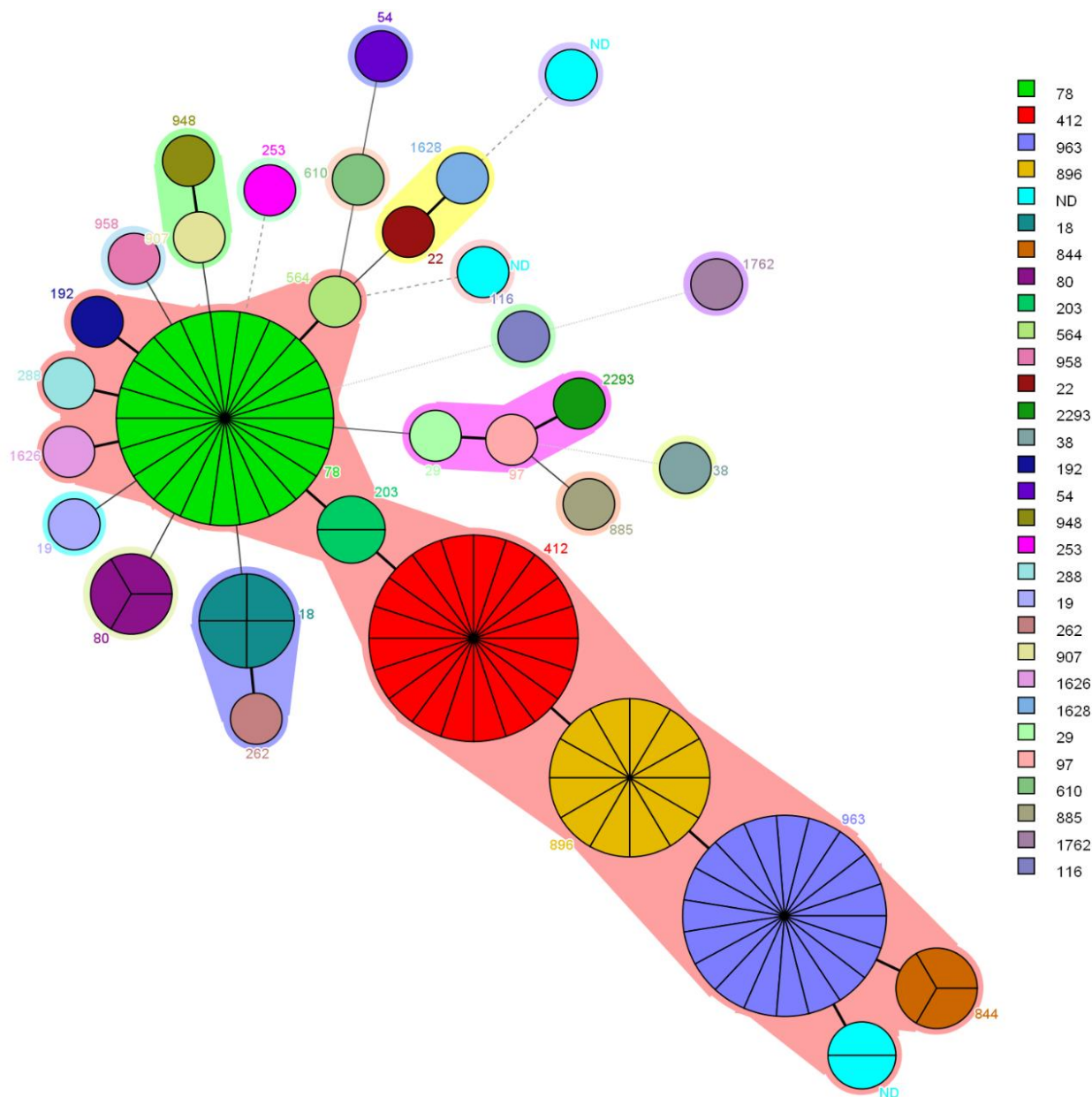
Três outros genomas chamaram a atenção por conterem plasmídeos associados ao gene *emeA*, que codifica uma bomba de efluxo homônima, em conjunto com genes de resistência e/ou determinantes de virulência. O genoma CL8191 apresentava um plasmídeo multi-replicon (*repUS43/rep9/rep2*) contendo os genes *vanHAX*, o operon *cyl* e *agg*, em concomitância com o gene *emeA*. O genoma CL8540 continha um plasmídeo *rep2* associado aos genes *emeA*, *agg* e *ecbA*. Já o genoma CL8682 possuía um plasmídeo *rep9* com os genes *vanHAX*, o operon *cyl* e *agg*, também em concomitância com o gene *emeA* (Figura 7).

5.5 Estrutura populacional, diversidade genética e reconstrução filogenética de *E. faecium* e *E. faecalis*

Foram identificados vinte e nove tipos distintos de STs em *E. faecium* (Figura 10). Dentre eles, quatro STs foram predominantes e representaram juntos 66% (n=73/110) da amostragem. O ST78 foi identificado em 20% (n=22/110), seguido pelos ST412 em 18% (n=20/110), ST963 presente em 17% (n=19/110), e pelo ST896, que correspondeu a 11% (n=12/110) desses genomas. Em quatro genomas não foi possível determinar o ST devido a uma identidade inferior a 100% do alelo em um dos setes genes do loci MLST.

A análise nos bancos de dados do PubMLST de *E. faecium* mostrou que 60% (n=66/110) dos genomas apresentavam classificações de linhagens categorizadas como associadas a hospitais, o antigo complexo clonal 17 e denominadas Clado A1 nas análises filogenéticas: ST18, ST19, ST22, ST78, ST80, ST192, ST203, ST262, ST288, ST564, ST844, ST907, ST948, ST958, ST1626 e ST1628. Também foi possível observar STs associados aos STs pertencentes ao antigo CC17, o ST963 e ST896 a linhagem do ST78, assim como o ST97 e ST2293 ao ST29 (Figura 10).

Figura 10 - Árvore Geradora Mínima de MLST de 110 genomas oriundos de amostras de *E. faecium* isoladas de pacientes humanos hospitalizados no Rio de Janeiro.



Cada cor no círculo colorido indica um tipo específico de sequência de MLST (ST) e as fatias indicam o número de genomas correspondentes. As linhas representam as distâncias dos STs de acordo com a variação de alelos nos loci de MLST: linhas íntegras, em tons escuros e de maior espessura representam as conexões entre variantes com menor número de variações e as linhas finas e/ou pontilhadas e em tons claros as com maior número de variações. As linhas íntegras, espessa e pretas que conectam os círculos indicam uma variante alélica (SLV, do inglês *Single Locus Variant*); linhas íntegras e cinza escuro para duas variantes alélicas (DLV, do inglês *Double Locus Variant*) e as linhas íntegras cinza claro ou pontilhadas três ou mais variantes alélicas. As Cores para cada ST estão indicadas na legenda. O ND é decorrente da não definição do tipo de ST por conter alelo indeterminado em um dos genes do painel MLST. STs em cor diferente compartilhando a mesma região sombreada formaram complexos clonais pelo agrupamento de SLVs. Região sombreada em vermelho são linhagens do ST78, roxo do ST18, amarelo do ST22, verde claro do ST907 e rosa do ST29.

Nesse estudo, o ST78 apresentou-se como a linhagem mais dispersa em genomas de amostras de *E. faecium* isoladas de pacientes hospitalizados, formando o maior complexo

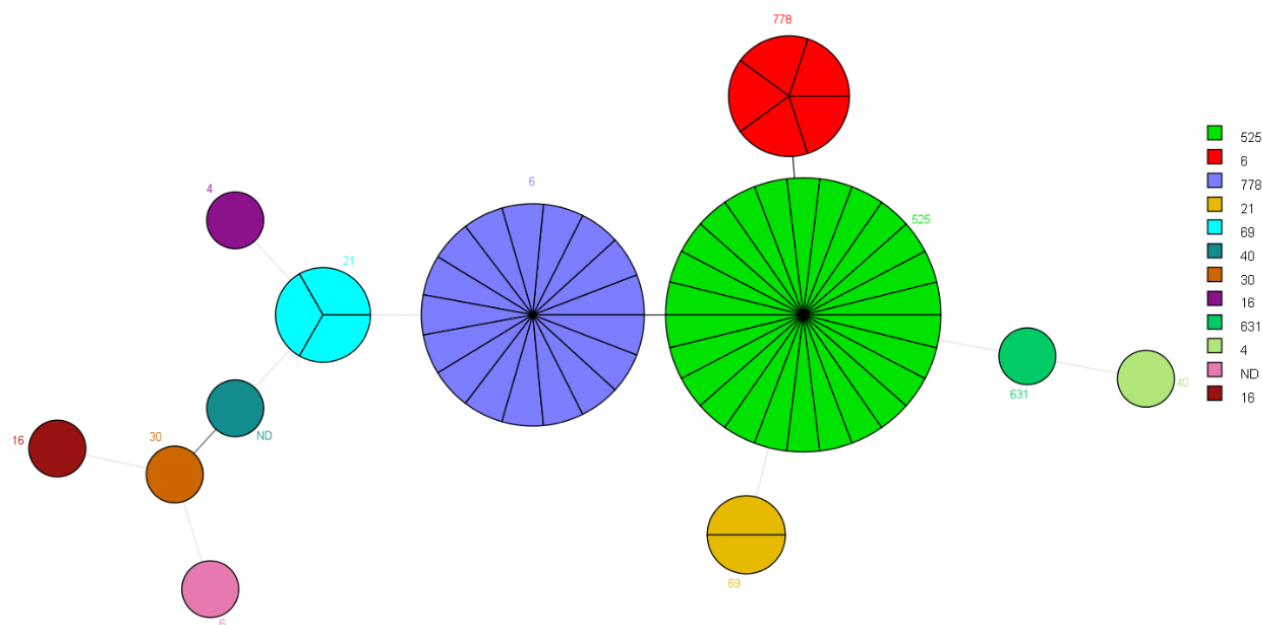
clonal (região sombreada em vermelho na figura 10). Além destas, linhagens do ST18 (região roxa), ST29 (região sombreada rosa), ST22 (região sombreada amarela) e ST907 (região sombreada verde clara) também foram observadas. Os demais STs foram observados isolados.

A **Figura 11** apresenta a distribuição dos STs e a correlação com os genes de resistência a antimicrobianos, determinantes de virulência, tolerância a metais pesados e outros microbicidas observados nos 110 genomas de *E. faecium*. O ST78 apresentou maior frequência para os genes de tolerância a metais em associação a genes de resistência a antimicrobianos e tolerância a metais e outros microbicidas e, em menor diversidade para os determinantes de virulência em comparação aos demais STs prevalentes, mas com circulação principalmente de: *scm* e os genes *ecbA*, *bopD*, *acm*, *sgrA*, *pilA* e *pilB* frequentes também nos demais STs prevalentes. Os ST412, ST963 e ST896 apresentaram baixa circulação de genes de tolerância a metais pesados, contudo frequências maiores para maior diversidade de genes de virulência em associação a genes de tolerância a outros microbicidas e resistência aos antimicrobianos. No ST412 destacou também a frequência do gene de virulência *esp* e *scm*, e os relacionados a feromônios (*cob*, *cpd*, *cad* e *ccf*). O ST963 e ST896 destacou a frequência dos genes *esp*, *gelE*, *sprE*, o operon *fsr*, *ace*, *ebpA/B*, *efaA*, operon *cylA*, *hyl*, e os relacionados a feromônios e sua expressão.

Quanto aos genes de resistência aos antimicrobianos as principais diferenças foram para frequência ao gene *dfpF* (à resistência ao trimetoprim) não observado em genomas do ST78 e frequente nos demais prevalentes, e os genes de resistência a tetraciclinas *tetL* e *tetM* com maior frequência no ST896. Os STs que apresentaram maior frequência foram os que apresentaram maior diversidade de genes associados à resistência aos antimicrobianos, determinantes de virulência e tolerância a metais e outros microbicidas. Outro ponto importante é que todos os STs observados na amostragem dos 110 genomas de *E. faecium* apresentaram ao menos um mecanismo de tolerância aos microbicidas.

Em *E. faecalis*, foram identificados onze STs distintos (**Figura 12**). Dentre eles, três STs se destacaram, representando juntos 82% (n=49/60) da amostragem. O ST525 foi o mais frequente, presente em 43% (n=26/60) desses genomas, seguido pelo ST6, identificado em 30% (n=18/60), e o ST778, presente em 8% (n=5/60). Os STs não foram observados em associação de complexos clonais.

Figura 12 - Árvore Geradora Mínima de MLST de 60 genomas oriundos de amostras de *E. faecalis* isoladas de pacientes humanos hospitalizados no Rio de Janeiro

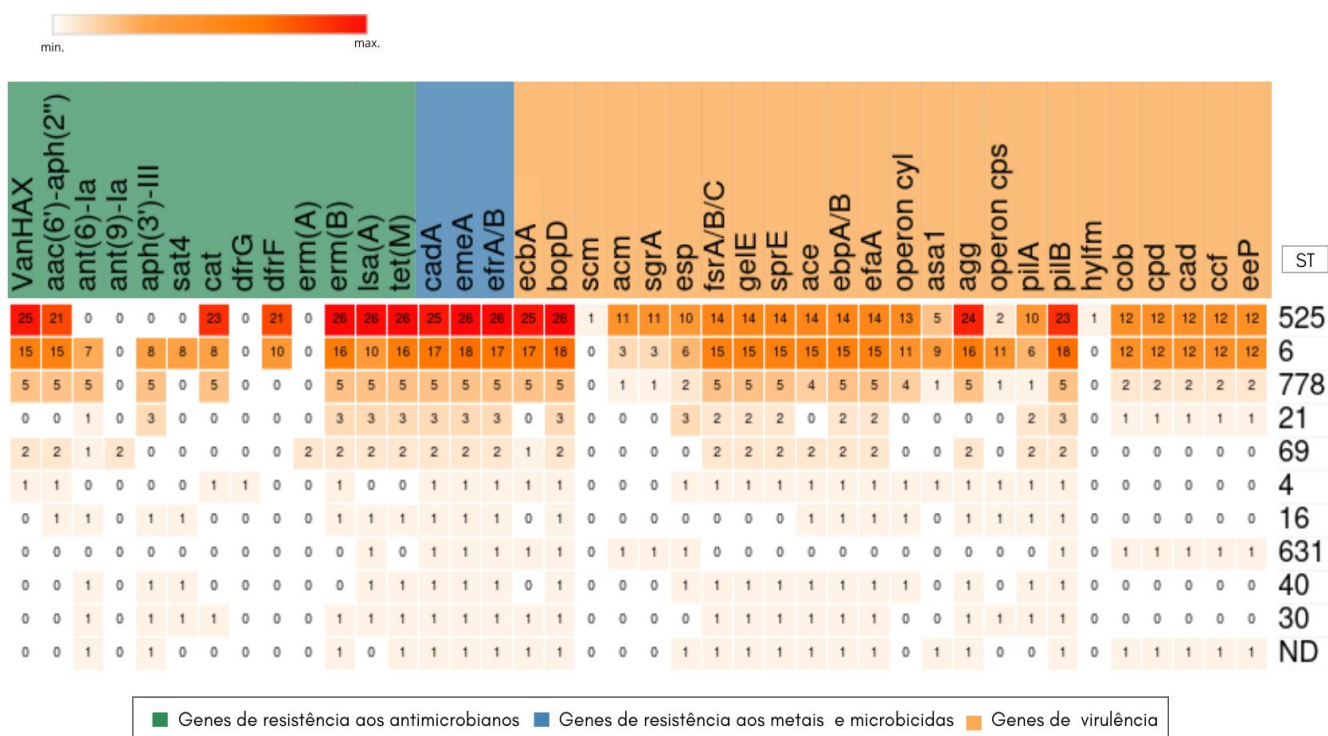


Cada cor no círculo colorido indica um tipo específico de sequência de MLST (ST) e as fatias indicam o número de genomas correspondentes. As linhas representam as distâncias dos STs de acordo com a variação de alelos nos loci de MLST: linhas íntegras e em tons mais escuros mostram conexões entre variantes com menor número de variações e as linhas em tom claro de maior número de variações. As Cores para cada ST estão indicadas na legenda. As linhas cinza escuro representam duas variantes alélicas (DLV, do inglês *Double Locus Variant*) e as linhas cinza claro três ou mais variantes alélicas. O ND é decorrente da não definição do tipo de ST por conter alelo indeterminado em um dos genes do painel MLST.

A **Figura 13** apresenta a distribuição dos STs e a correlação com os genes de resistência a antimicrobianos, determinantes de virulência, tolerância a metais pesados e outros microbicidas observados nos 60 genomas de *E. faecalis*. Os STs que apresentaram maior frequência foram os que apresentaram maior diversidade de genes associados à resistência aos antimicrobianos e determinantes de virulência. Entre os STs prevalentes em *E. faecalis*, quanto as diferenças observadas, o ST525 apresentou frequências maiores para os determinantes de virulência *acm* e *sgrA*, enquanto o ST6 o gene de resistência a

antimicrobianos *sat4* e os determinantes de virulência *asal* e operon *cps*. O gene de resistência a antimicrobianos *drfF* esteve circulante em maiores frequências nos ST525 e ST6 e *aph(3')-III* e *ant(6')-Ia* nos ST6 e ST778. Um outro ponto que se destacou foi que entre os STs circulantes, todos tinham ao menos um mecanismo de tolerância aos microbicidas presente.

Figura 13 - Distribuição de genes associados a resistência a antimicrobianos, a virulência e a tolerância a metais pesados e outros microbicidas, de acordo com os diferentes STs, em 60 genomas oriundos de amostras de *E. faecalis* isoladas de pacientes humanos hospitalizados no Rio de Janeiro.



A variação das cores/intensidade na tabela numérica representa a frequência por quantidade do gene nos STs, do branco (ausência do gene) ao vermelho intenso (maior quantidade observada para o gene).

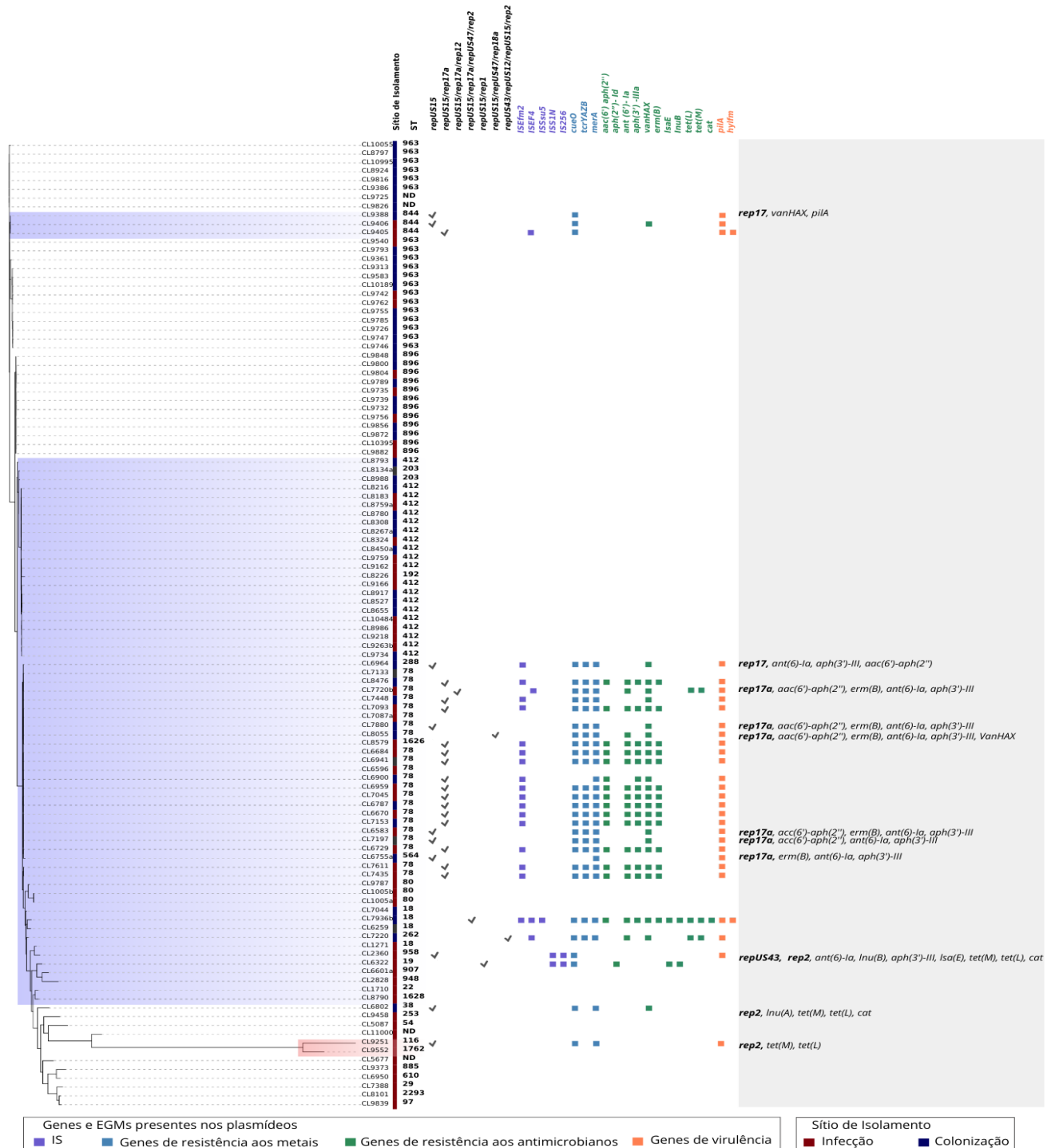
Para avaliar a diversidade genética populacional e as relações filogenéticas dos genomas de *E. faecium* e *E. faecalis*, e traçar aspectos da circulação da tolerância a metais e outros microbicidas com seleção da resistência a antimicrobianos e determinantes de virulência, foi gerada uma árvore de filogenética de máxima verossimilhança a partir do alinhamento do core genoma pelo programa Roary de ambas as espécies. A análise foi associada exclusivamente aos plasmídeos que continham, simultaneamente, genes de resistência a metais e/ou outros microbicidas e genes de resistência a antimicrobianos e/ou determinantes de virulência.

A árvore filogenética inferida a partir dos 1.394 *core genes* dos 110 genomas de *E. faecium*, representada na **Figura 14**, revela as relações evolutivas entre os genomas analisados. A proximidade filogenética entre os genomas, independentemente do ST ou do sítio de isolamento, é evidenciada pelos ramos curtos que os conectam, sugerindo um ancestral comum recente para a maioria dos genomas.

Essa proximidade é observada tanto entre genomas pertencentes ao antigo CC17 (clados destacados em azul na árvore filogenética) quanto entre aqueles que não foram alocados nesse complexo clonal pelo PubMLST. Um exemplo disso é o agrupamento dos três genomas do ST844 (CC17), que compartilham um ancestral comum recente com os genomas do ST963, seu *single-locus variant* (SLV) no MLST, não classificado como antigo CC17. Os genomas do ST963 e os do ST896, não classificados como CC17, apresentam proximidade filogenética com outros genomas desse complexo clonal, como observado também nas análises populacionais por MLST.

Na análise filogenética, genomas de diferentes STs classificados como o antigo complexo clonal CC17 agruparam-se em clados muito próximos. Os dois genomas do ST203 e o único genoma do ST192 foram agrupados no mesmo clado do ST412, sendo que ambos são *double-locus variants* (DLVs) do ST412 na análise de MLST. Da mesma forma, os genomas dos ST564 e ST1626 foram posicionados dentro do clado do ST78, ambos classificados como SLVs do ST78 na análise de MLST. Esses agrupamentos refletem a proximidade evolutiva entre os genomas analisados dentro do antigo CC17.

Figura 14 - Árvore filogenética de máxima verossimilhança baseada no core-genoma de 110 genomas oriundos de amostras de *Enterococcus faecium* isoladas de pacientes hospitalizados no Rio de Janeiro, destacando plasmídeos portadores de genes de tolerância a metais pesados e outros microbicidas, resistência a antimicrobianos e determinantes de virulência, além de informações sobre outros plasmídeos presentes nos mesmos genomas.



Na árvore filogenética, os clados correspondentes aos genomas do antigo CC17 estão destacados em azul, enquanto os genomas do CC94 estão destacados em vermelho. Clados sem destaque indicam genomas que não pertencem a nenhum complexo clonal.

Os dois genomas (CL9251 e CL9552) previamente descritos como provenientes de infecção, com perfis alélicos de MLST do Clado B (CC94), formaram um cluster monofilético, como podemos observar pelo cluster demarcado em vermelho na nossa árvore filogenética, evidenciando um parentesco evolutivo mais distante em relação aos demais genomas analisados. Esse distanciamento ficou claro pelo longo comprimento do ramo que os separa do ancestral comum mais recente. Esses dois genomas apresentaram uma relação mais próxima entre si, porém ainda distante em relação a genomas não pertencentes ao antigo CC17, os quais formaram clados mais definidos na extremidade da árvore filogenética.

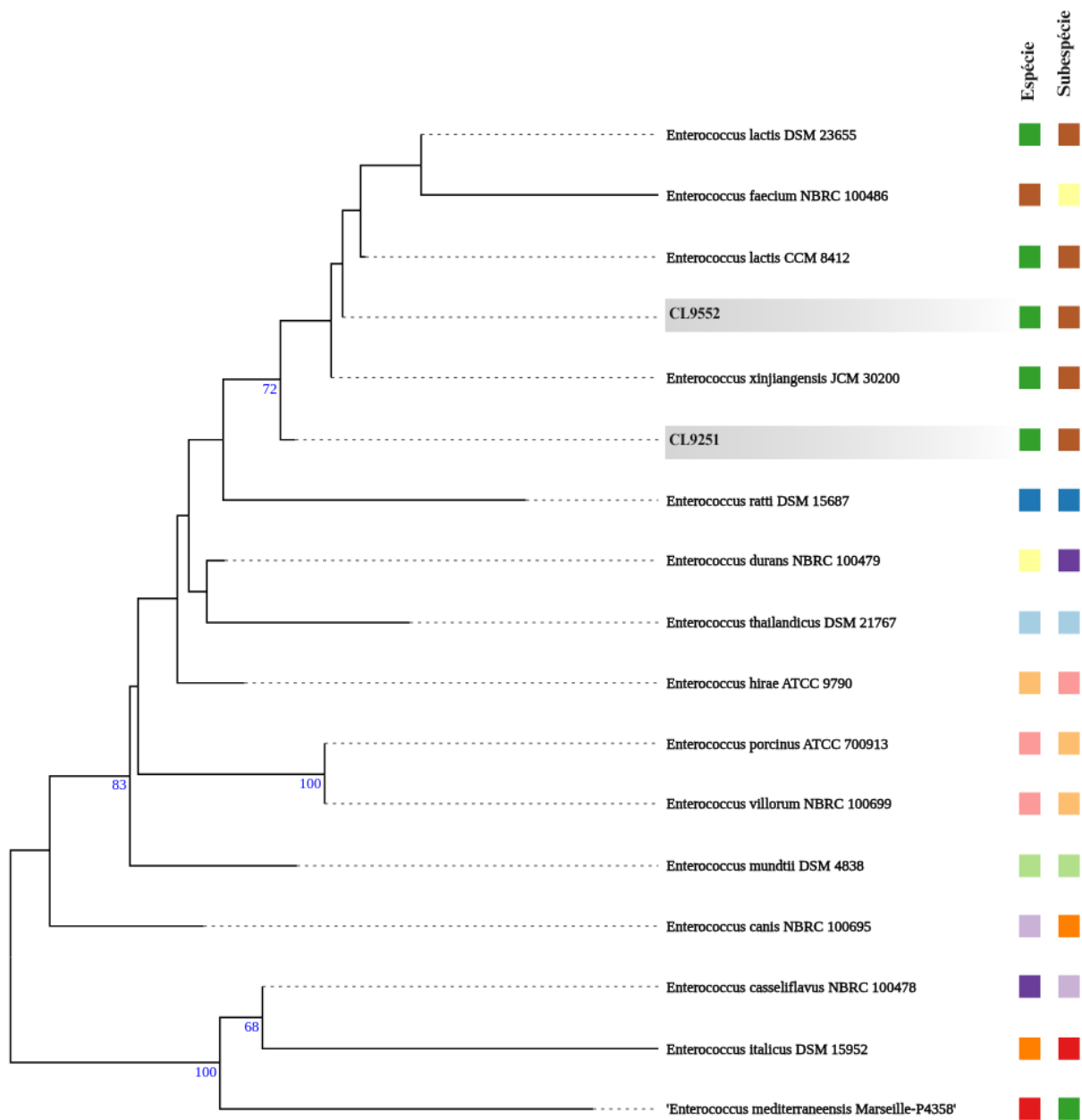
Diante disso, os genomas CL9251 (ST116) e CL9552 (ST1762) foram submetidos ao TYGS para uma análise taxonômica por hibridização DNA-DNA digital. Os resultados, apresentados na árvore da **Figura 15**, mostraram que o genoma CL9251 se aproxima mais da cepa-tipo *Enterococcus lactis* CCM8412, enquanto o genoma CL9552 está mais relacionado à cepa-tipo *Enterococcus xinjiangensis* JCM 30200, um sinônimo heterotípico de *E. lactis*.

Observou-se uma maior concentração de plasmídeos com um amplo perfil de resistência a antimicrobianos, tolerância a metais e determinantes de virulência nos genomas pertencentes ao antigo CC17, especialmente no ST78, mas também em genomas dos STs 288, 1626, 564, 18, 262, 958 e 19. A distribuição desses plasmídeos não apresentou uma associação clara com subclados específicos ou com os sítios de isolamento, sendo detectados tanto em genomas provenientes de infecção quanto de colonização.

Além de plasmídeos que carregam em conjunto genes de tolerância a metais, resistência a antimicrobianos e/ou determinantes de virulência, esses elementos estavam presentes no mesmo genoma juntamente com outros plasmídeos que continham genes de relevância clínica, como *aac(6')-aph(2'')*, *ant(6)-Ia*, *aph(3')-III*, *vanHAX* e *cat*.

Além disso, entre os genomas não pertencentes ao CC17, apenas dois apresentaram esses plasmídeos. O genoma CL9251, classificado como pertencente ao Clado B, continha um plasmídeo da família *repUS15*, que abrigava os genes *cueO* e *merA*, associados à tolerância a metais, e o gene *pilA*, relacionado à virulência. Esse genoma também carregava um plasmídeo *rep1*, contendo os genes *tet(L)* e *tet(M)*, envolvidos na resistência a tetraciclinas. Já o genoma CL6802 apresentava um plasmídeo *repUS15*, que continha os genes *cueO* e *merA*, além do operon *vanHAX*, e um plasmídeo *rep2*, portando os genes *lnu(A)*, *tet(M)*, *tet(L)* e *cat*.

Figura 15 - Análise taxonômica dos genomas CL9251 e CL9552 por Hibridização DNA-DNA Digital (dDDH)



Árvore filogenética gerada no TYGS para a análise taxonômica dos genomas CL9251 e CL9552 de *Enterococcus faecium* (sombreada em cinza). O genoma CL9251 se aproximou da cepa-tipo *Enterococcus lactis* CCM8412, enquanto o genoma CL9552 apresentou maior similaridade com a cepa-tipo *Enterococcus xinjiangensis* JCM 30200 (sinônimo heterotípico de *E. lactis*). Na árvore, a utilização de cores idênticas para espécie (verde) e subespécie (marrom) indica a identidade taxonômica dos grupos, demonstrando que os genomas CL9251, *E. lactis* CCM8412, CL9552 e *E. xinjiangensis* JCM 30200 pertencem à mesma espécie e subespécie.

A análise filogenética dos genomas de *E. faecalis*, baseada em 1.771 *core genes* é representada na **Figura 16**, revelou a formação de dois clados distintos, separados por longos

ramos na árvore filogenética, além de sub-clados bem definidos. O Clado 1 foi composto por oito genomas, e 5 sub-clados, enquanto o Clado 2 reuniu cinquenta e dois genomas.

O Clado 1 abrangeu os STs 4, 16, 40 e 21, os quais, em geral, não são associados a infecções e são mais frequentemente detectados em ambientes externos ao hospital. No entanto, entre os genomas analisados, seis dos oito pertencentes a esse clado foram isolados de casos de infecção.

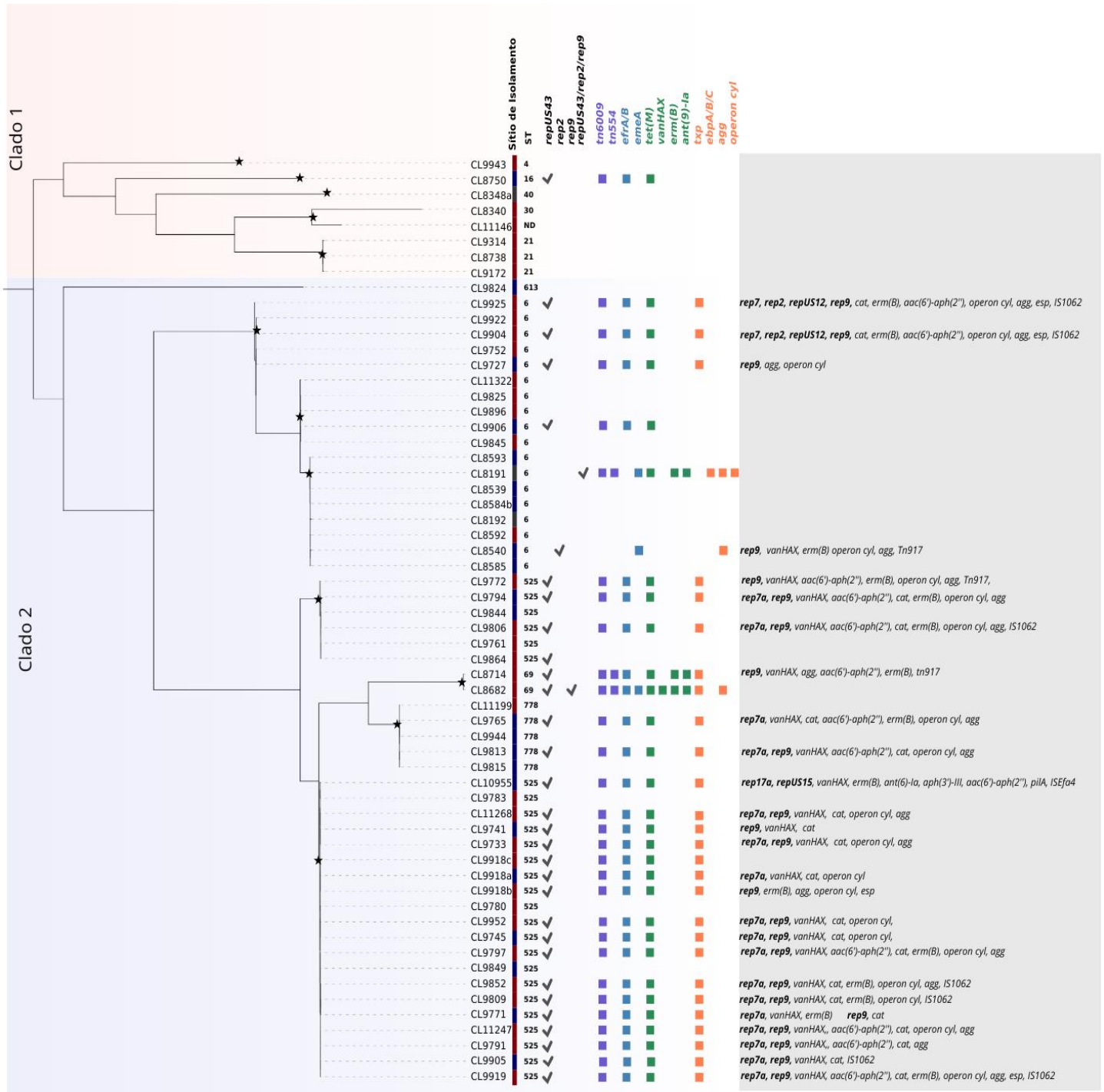
Em contraste, o Clado 2 foi predominantemente composto por STs fortemente associados a infecções hospitalares, sendo quase exclusivamente identificados em ambientes hospitalares. Esse clado apresentou três ramificações distintas: a primeira, contendo um único genoma do ST613; a segunda, reunindo todos os genomas do ST6, os quais, por sua vez, se agruparam em três sub-clados distintos; e a terceira, composta pelos genomas dos STs 525, 69 e 778.

Os genomas do ST778 compartilharam um ancestral comum com aqueles do ST69. Já os genomas do ST525 foram subdivididos em dois sub-clados geneticamente distintos: o primeiro, formado por seis genomas provenientes tanto de infecções quanto de colonizações e proximidade filogenética com um dos sub-clados de ST6 e o outro sub-clado do ST525; e o segundo composto por 20 genomas, também associados a infecções e colonizações. Esse segundo subclado demonstrou uma maior proximidade filogenética entre os genomas do primeiro clado de STs 525 e o ST69 e ST778.

O plasmídeo *repUS43*, que abriga genes de tolerância a microbicidas em associação com genes de resistência a antimicrobianos e/ou determinantes de virulência, bem como os plasmídeos *rep9*, *rep2* e o multi-replicon *repUS43/rep9/rep2*, foram majoritariamente detectados em genomas do Clado 2, sem predileção por um subclado específico. Além disso, os genomas que continham esses plasmídeos frequentemente também apresentavam outros plasmídeos de relevância clínica, como o plasmídeo multi-replicon *rep7a/rep9*, que codificava genes associados à resistência a antimicrobianos e determinantes de virulência, incluindo *vanHAX*, *aac(6')-aph(2'')*, *cat*, *erm(B)*, *operon cyl* e *agg*.

Apesar da menor representatividade do Clado 1, foi detectada a presença do plasmídeo *repUS43*, contendo genes de tolerância a microbicidas e resistência a antimicrobianos, indicando a circulação desse elemento genético mesmo entre linhagens menos associadas ao ambiente hospitalar.

Figura 16 - Árvore filogenética de máxima verossimilhança baseada no core-genoma de 60 genomas oriundos de amostras de *Enterococcus faecalis* isoladas de pacientes hospitalizados no Rio de Janeiro, destacando plasmídeos portadores de genes de tolerância a metais pesados e outros microbicidas, resistência a antimicrobianos e determinantes de virulência.



Genes e EGMs presentes nos plasmídeos
 ■ Transposons ■ Genes de resistência aos microbicidas ■ Genes de resistência aos antimicrobianos ■ Genes de virulência

Sítio de Isolamento
 ■ Infecção ■ Colonização

Os sub-clados na árvore filogenética estão realçados com estrelas.

6. DISCUSSÃO

As espécies *E. faecium* e *E. faecalis* são membros da microbiota gastrointestinal humana que, nas últimas décadas, se destacaram como importantes agentes de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS). Embora *E. faecalis* seja a principal causa de infecções enterocócicas, *E. faecium* vem apresentando um aumento significativo como causa de infecções nosocomiais, impulsionado por sua frequente associação a resistência a múltiplas drogas (Fiore *et al.*, 2019).

A transição dessas bactérias de comensais a patógenos altamente adaptados ao ambiente hospitalar reflete um processo evolutivo dinâmico, sustentado por sua notável plasticidade genômica. Essa característica permitiu a aquisição progressiva de múltiplos mecanismos de resistência a antimicrobianos e a outros compostos e de determinantes de virulência, contribuindo para sua persistência e disseminação em ambientes clínicos (Hourigan *et al.*, 2024).

O ambiente é cada vez mais reconhecido como um ponto crítico para a co-seleção e disseminação de bactérias resistentes a antimicrobianos e seus genes de resistência, impulsionadas tanto por pressão seletiva por antibióticos quanto por agentes não antibióticos, como metais e microbicidas (Murray *et al.*, 2024). O amplo uso desses compostos na medicina, agricultura, aquicultura e produtos de consumo, cria diversas oportunidades para a seleção de amostras resistentes. A capacidade dos enterococos de adquirir e manter mecanismos de sobrevivência em diferentes ambientes lhes confere uma vantagem adaptativa, especialmente no ambiente hospitalar. Em *E. faecalis* e *E. faecium*, a tolerância ao estresse e a patogenicidade estão fortemente interligadas, contribuindo para sua persistência e capacidade de causar infecções (Gaca; Lemos, 2019; Pal *et al.*, 2015, 2017).

A co-seleção refere-se à seleção simultânea de resistência a múltiplos agentes e é um fator crucial na persistência da resistência antimicrobiana, pois pode manter e promover essa característica mesmo na ausência dos compostos seletivos. Esse processo ocorre principalmente por dois mecanismos: resistência cruzada e co-resistência (Baker-Austin *et al.*, 2006; Chapman, 2003). A resistência cruzada acontece quando um único mecanismo, como uma bomba de efluxo, confere resistência simultânea a diferentes agentes antimicrobianos. Já a co-resistência ocorre quando genes de resistência distintos estão fisicamente vinculados no mesmo elemento genético móvel, como um plasmídeo, ou quando diferentes genes de

resistência estão presentes na mesma bactéria, conferindo proteção contra compostos distintos (Gaca; Lemos, 2019; Pal *et al.*, 2015, 2017).

Compreender a organização genética dos genes de resistência aos antimicrobianos, metais e microbicidas, incluindo sua associação com elementos genéticos móveis, como plasmídeos, é essencial para elucidar os mecanismos de manutenção e transferência desses genes entre microrganismos. Além disso, estudos epidemiológicos que investigam essas interações ajudam a entender o sucesso de determinadas espécies bacterianas no estabelecimento em ambientes com diferentes condições físicas, químicas e biológicas, contribuindo para estratégias mais eficazes de controle da disseminação da resistência.

O WGS é uma tecnologia versátil que pode ser aplicada em diversas áreas da microbiologia, desde a tipificação até a construção de filogenias de microrganismos. Seu uso tem ampliado a compreensão da trajetória evolutiva das espécies de enterococos. Assim, a aplicação dessa técnica em estudos epidemiológicos permite a obtenção de resultados precisos e discriminatórios, além de proporcionar acesso a um vasto conjunto de informações sobre as características biológicas desses microrganismos.

Visto isso, este estudo teve como objetivo investigar, sob uma perspectiva genômica, o "landscape genômico" de genomas de *E. faecium* e *E. faecalis* provenientes de pacientes atendidos em hospitais do estado do Rio de Janeiro. Para isso, foram utilizados genomas e ferramentas de biologia computacional, com foco na localização e concentração de genes específicos relacionados à resistência a antimicrobianos, microbicidas e metais, bem como na identificação dos elementos genéticos móveis, e na estrutura populacional dessas duas espécies de maior importância clínica humana.

As características gerais dos genomas estudados revelaram um tamanho médio de 3,03 Mbp para *E. faecium* e 2,67 Mbp para *E. faecalis*, com um conteúdo médio de G+C de 37% em ambas as espécies. Esses valores estão em consonância com estudos anteriores, que demonstraram que o gênero *Enterococcus* possui um conteúdo de G+C entre 34% e 45% e tamanhos genômicos que variam de 2,31 Mbp a 5,5 Mbp (Lebreton *et al.*, 2017; Zhong *et al.*, 2017). Em particular, os genomas de *E. faecium* do clado A1 se destacam por serem maiores, atingindo até 3,72 Mbp, devido à presença de um número mais elevado de genes de resistência antimicrobiana e EMGs (Wei *et al.*, 2024). Por sua vez, o genoma de *E. faecalis* de origem hospitalar possui, em média, 3,22 Mbp, com até 25% dos seus genes adquiridos por meio de plasmídeos (McBride *et al.*, 2007; Solheim *et al.*, 2011). Isso se reflete na quantidade

de plasmídeos e outros EGMs detectados nos genomas de *E. faecium* e *E. faecalis* de origem hospitalar, por nós estudados.

O estudo da composição do conteúdo genético teve como principal objetivo avaliar a co-ocorrência de genes associados à resistência a antimicrobianos e determinantes de virulência, principalmente aqueles envolvendo características importantes e que impliquem na sua persistência no cenário hospitalar, e genes associados a tolerância a metais pesados e outros microbicidas, hipotetizando o possível papel desses outros compostos como agentes de co-seleção devido aos processos de co-resistência ou resistência cruzada.

A análise dos 170 genomas revelou uma alta frequência de genes associados à resistência a antimicrobianos, metais e microbicidas, além de determinantes de virulência, destacam-se, sobretudo, genes relacionados a características essenciais para a persistência desses microrganismos no ambiente hospitalar, tanto no cromossomo quanto em plasmídeos.

A co-seleção por co-resistência observada em *E. faecium* e *E. faecalis* reflete a complexidade das interações genéticas que favorecem a persistência e disseminação de genes de resistência e virulência. A alta frequência de co-ocorrência entre genes de resistência a antimicrobianos e determinantes de virulência com genes de tolerância a metais pesados e outros microbicidas em ambas as espécies sugere que esses elementos podem estar localizados em plasmídeos ou ilhas genômicas compartilhadas, promovendo sua transmissibilidade por meio de mecanismos de mobilização gênica. Destaca-se a correlação entre o operon *YAZBtcr* e o gene *merA*, associados à tolerância a metais, e genes de resistência a antimicrobianos de relevância clínica, como *vanHAX* e *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, reforçando a hipótese de que a exposição a metais pode contribuir para a manutenção e seleção de bactérias resistentes.

Em *E. faecalis*, a associação do gene *cadA*, que confere resistência ao cádmio, com genes de resistência a antimicrobianos e fatores de virulência também sugere um papel significativo da pressão seletiva ambiental na disseminação desses determinantes. A co-ocorrência entre os genes *cadA* e *vanHAX* em 77% dos genomas de *E. faecalis*, juntamente com altas frequências de genes de resistência a aminoglicosídeos, macrolídeos e tetraciclina, bem como determinantes de virulência, evidencia a coexistência de diferentes mecanismos genéticos na célula bacteriana que favorece a manutenção indireta de características. O gene *cadA* já foi descrito em associação com genes clinicamente relevantes, como *vanHAX* e *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, tanto em *E. faecium* quanto em *E. faecalis* (Belloso Daza *et al.*, 2022; Çardak; Toğay; Ay, 2023; Farias *et al.*, 2023; Oger; Mahillon; Petit, 2003; Yan *et al.*, 2015),

além de sua presença em plasmídeos, evidenciando seu potencial para transmissão horizontal (Nucifora *et al.*, 1989; Wang *et al.*, 2021b).

As bombas de efluxo EfrA/B, codificadas pelos genes *efrA* e *efrB*, e EmeA, codificada pelo gene *emeA*, são amplamente detectadas em *E. faecium* e *E. faecalis*, conforme demonstrado em diversos estudos (Abbood; Hijazi; Gould, 2023; Esfahani *et al.*, 2020; Lavilla Lerma *et al.*, 2014; Sobhanipoor *et al.*, 2021, 2022). Em *E. faecalis*, a coexistência dos genes *cadA*, *emeA* e *efrA/B* e genes de resistência a antimicrobianos e determinantes de virulência dentro da mesma célula, mas distribuídos entre o cromossomo e plasmídeos, favorece um cenário de co-resistência e persistência desses determinantes genéticos. A coexistência do gene *cadA*, associado à resistência ao cádmio, frequentemente localizado em cromossomo, bem como *emeA*, e também presente majoritariamente no cromossomo dos genomas desse estudo, e os genes de resistência a antimicrobianos e determinantes de virulência em sua grande maioria associados a EGM, pode ter implicações importantes para a sobrevivência e adaptação bacteriana em ambientes hostis. Dessa forma, essa combinação de fatores na mesma célula aumenta a eficácia do processo biológico, como se manter em ambientes com diferentes pressões seletivas, resultando em um efeito maior do que se atuassem de forma isolada.

As populações de *E. faecium* do Clado A1, predominantemente compostas por isolados clínicos, apresentam o operon 2CS-CHX, recentemente descoberto e implicado na resistência à clorexidina (Duarte *et al.*, 2019; Pereira *et al.*, 2022, 2024; Skive *et al.*, 2022). A associação desse operon com a bomba de efluxo cromossômica *efrA/B* potencializa a capacidade da bactéria de resistir a compostos tóxicos e, indiretamente, favorece a manutenção de genes de resistência a antibióticos. Essa distribuição heterogênea dos determinantes genéticos permite que pressões seletivas diversas – decorrentes da exposição a metais pesados, microbicidas e antibióticos – atuem de forma combinada na disseminação desses elementos, contribuindo para a persistência de *E. faecium* e *E. faecalis* em ambientes hospitalares e gerando desafios terapêuticos relevantes. Ademais, as correlações estatisticamente significativas entre genes de tolerância a metais e microbicidas e genes de resistência antimicrobiana e determinantes de virulência reforçam a hipótese de que compostos utilizados tanto em contextos hospitalares quanto externos colaboram indiretamente para a manutenção desses genes.

Os plasmídeos desempenham um papel fundamental na biologia dos enterococos, atuando como uma vasta reserva de variabilidade genética e facilitando a troca de material genético entre bactérias (Norman *et al.*, 2009). Em nossa análise, foi detectada uma presença

recorrente de plasmídeos, sobretudo em *E. faecium*. Todos os genomas dessa espécie apresentaram pelo menos um plasmídeo, com uma média de 3,8 por genoma, enquanto *E. faecalis* exibiu uma média de 2,3 plasmídeos. O tamanho desses elementos variou amplamente, de menos de 3 kb a mais de 326 kb. Esses resultados reforçam o papel dos *Enterococcus* como vetores âncora para elementos genéticos móveis, que podem representar até 25% do DNA enterocócico devido à aquisição de material exógeno (Clewell *et al.*, 2014). Além disso, a maior quantidade e o tamanho dos plasmídeos encontrados em isolados de pacientes hospitalizados, em comparação com outras fontes, indicam sua contribuição significativa para a adaptação e evolução bacteriana, sendo os isolados desprovidos de plasmídeos raramente identificados (Clewell *et al.*, 2014; Hourigan *et al.*, 2024).

Nossos resultados demonstraram que cada espécie apresenta uma população de plasmídeos com padrões distintos, evidenciados pelas diferenças na diversidade dos tipos de famílias *rep*. Em particular, *E. faecium* exibiu uma maior diversidade e uma frequência de plasmídeos diferenciada em relação a *E. faecalis*, sendo que as famílias *rep* predominantes em *E. faecium* não coincidem com aquelas mais frequentes em *E. faecalis*. Além disso, embora ambas as espécies compartilhem genes transportados por plasmídeos, a circulação desses genes ocorre em plasmídeos distintos, dependendo da espécie. Esses achados sugerem que, apesar da proximidade filogenética e da coexistência no mesmo nicho ecológico, a organização plasmidial é específica para cada grupo, o que pode refletir adaptações genéticas particulares e influenciar a disseminação de características relevantes, tais como resistência a antimicrobianos e determinantes de virulência.

Ambas as espécies analisadas apresentaram plasmídeos classificados como multi-replicons, contendo mais de uma família *rep*. Esses plasmídeos destacaram-se por seu maior tamanho médio em comparação com plasmídeos que possuem apenas uma única família de replicação. Além disso, exibiram perfis genéticos mais diversificados, sugerindo a presença de plasmídeos co-integrados, além de apenas plasmídeos com duas ou mais famílias *rep*. A modularidade observada reforça a hipótese de que eventos de recombinação e rearranjos genéticos desempenham um papel central na formação de estruturas mosaicas (Pesesky *et al.*, 2019). Essa característica é consistente com o descrito para membros de famílias plasmidiais amplamente disseminadas no gênero *Enterococcus*, como Inc18 e RepA_N, que apresentam alta capacidade de dissociabilidade modular e propensão à variação e embaralhamento independentes. Essas propriedades frequentemente resultam na formação de plasmídeos contendo múltiplos replicons e estruturas mosaicas. A variabilidade de sequência, a presença

de estruturas mosaico em plasmídeos que combinam módulos de diferentes origens e a existência de plasmídeos quiméricos indicam uma alta diversidade genética dos plasmídeos enterocócicos (Arredondo-Alonso *et al.*, 2020a; Freitas *et al.*, 2013; Lanza *et al.*, 2015; Mikalsen *et al.*, 2015; Weaver *et al.*, 2009).

Em nossa análise, o plasmídeo mais frequente em *E. faecium* foi do tipo multi-replicon, composto pelas famílias *repUS15* e *rep17*, identificado em 41% dos genomas, com tamanho médio de 240 kb. Dentre esses, 31% (n=14/45) apresentaram um perfil genético comum, portando genes de tolerância a metais pesados, resistência a antimicrobianos e determinantes de virulência. Esse perfil incluiu o operon *YAZBtcr*, o gene *cueO* (resistência a cobre), o gene *merA* (resistência a mercúrio), o operon de resistência à vancomicina *vanHAX*, três genes associados à resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos (*aac(6')-Ie-aph(2'')*-*Ia*, *ant(6')-Ia* e *aph(3')-IIIa*), o gene *erm(B)* (resistência a macrolídeos) e o gene *pilA*, relacionado à formação de pili. Além disso, as sequências de inserção *ISEfa4* e *ISEfm2* foram detectadas em 58% (n = 26/45) e 29% (n = 13/45) dos plasmídeos multi-replicon, respectivamente. O que explica a correlação com significância estatística entre o gene *merA* e os genes *vanHAX*, *aac(6')-Ie-aph(2'')*-*Ia*, *aph(3')-III* e *pilA* e o operon *YAZBtcr* e os genes *vanHAX*, *aac(6')-Ie-aph(2'')*-*Ia* e *aph(3')-III*.

A análise individual desses plasmídeos sugeriu que os replicons *repUS15* e *rep17* podem ter sofrido eventos de recombinação, originando co-integrados com perfis genéticos diferenciados. Assim, os plasmídeos *rep17* tendem a carregar genes de alta resistência a aminoglicosídeos (como *ant(6')-Ia* e *aph(3')-IIIa*) e o gene *erm(B)*, enquanto os plasmídeos *repUS15* frequentemente contêm genes de resistência a metais, como *cueO*, *merA* e o operon *YAZBtcr*, além de *pilA*. Vale ressaltar que ambos os tipos abrigaram o operon *vanHAX* e o gene *aac(6')-Ie-aph(2'')*-*Ia*.

Esses plasmídeos pertencem à família RepA_N, amplamente distribuída entre bactérias Gram-positivas, embora seus membros individuais possuam um espectro de hospedeiros restrito, e podem ser tanto conjugativos quanto não conjugativos, com tamanhos que variam de 3,3 a 281 kb (Weaver, 2019; Weaver *et al.*, 2009). Nos genomas investigados no presente estudo, os replicons *repUS15* apresentaram mais de 80% de identidade com o replicon do plasmídeo pNB2354_1 (NC_020208), enquanto os *rep17* foram comparáveis ao replicon do plasmídeo pRUM (NP_863172.1).

Em particular, os plasmídeos *rep17* (tipo pRUM) são descritos como mosaicos, incorporando diversos elementos genéticos de origens distintas e desempenhando um papel

crucial na disseminação da resistência a glicopeptídeos em isolados do Clado A1 de *E. faecium*, por meio do transporte dos genes *vanA* e *vanB* (Freitas *et al.*, 2013; Islam *et al.*, 2023; Lanza *et al.*, 2015; Rosvoll *et al.*, 2010). Recentemente, esses plasmídeos foram associados à disseminação dos genes de resistência *ant(6)-Ia*, *aph(3')-III*, *vanA* e *ermB*, conferindo resistência a aminoglicosídeos, vancomicina e eritromicina, e identificados como principais vetores da resistência à vancomicina em Dallas, Texas (Islam *et al.*, 2023). Além disso, plasmídeos *rep17* foram identificados como portadores de sistemas toxina-antitoxina (TA) (Freitas *et al.*, 2013; Halvorsen *et al.*, 2011; Rosvoll *et al.*, 2010).

Originalmente descobertos em plasmídeos, esses sistemas atuam como mecanismos de manutenção, garantindo a sua perpetuação (Ogura; Hiraga, 1983). Em células que contém o plasmídeo, os genes da toxina e da antitoxina são expressos simultaneamente. A antitoxina se liga à toxina, neutralizando seu efeito deletério. No entanto, durante a divisão celular pode ocorrer a formação de um segregante desprovido do plasmídeo. Nesse cenário, a produção contínua de antitoxina é interrompida; por ser instável, a antitoxina é rapidamente degradada, enquanto a toxina, mais estável, permanece ativa e induz a morte da célula plasmídeo-negativa, caracterizando o fenômeno conhecido como morte pós-segregacional. Assim, os sistemas TA, tornam a célula dependente da presença do plasmídeo para neutralizar a toxina, assegurando que somente células que mantêm o plasmídeo sobrevivam e se multipliquem (Hayes, 2003).

Plasmídeos com mais de 150 kb são amplamente distribuídos entre isolados de *E. faecium* de diversas origens e são conhecidos como "megaplasmídeos" (Hall *et al.*, 2023). Esses plasmídeos costumam carregar genes envolvidos no metabolismo, na resistência a antibióticos e a metais (Arias *et al.*, 2009; Freitas *et al.*, 2011, 2013; Gomez *et al.*, 2011; Lanza *et al.*, 2015; Rosvoll *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2011). O plasmídeo *repUS15* já foi descrito como um megaplasmídeo (165–168 kb) portador do operon *YAZBtcr*, do gene *cueO* e do gene *vanA* de genomas de isolados de ambientes aquáticos (Biggel *et al.*, 2021) e, portanto, o operon *YAZBtcr* e o gene *vanA* em genomas de isolados de porcos (Arredondo-Alonso *et al.*, 2020a). Considerando que o cobre é comumente utilizado na criação de suínos como suplemento na ração e que a resistência ao cobre é considerada uma adaptação ao ambiente suínico (Gouliouris *et al.*, 2018) esses achados sugerem que tais plasmídeos conseguem se manter em ambientes diversos, preservando seus genes de resistência a antimicrobianos mesmo sob pressões seletivas de outros compostos, como os metais. Em *E. faecalis*, o segundo tipo mais frequente de plasmídeo foi o multi-replicon *rep7a/rep9*.

Os elementos de replicação da família *rep9* demonstraram homologia com a família *rep* do plasmídeo pAD1, pertencente à família Inc18 e ao grupo RepA_N de plasmídeos conjugativos que respondem aos feromônios do tipo cAD1, que esteve presente em 48% (n= 29/60) dos *E. faecalis*, possuem sistemas TA e são comumente encontrados em isolados clínicos (Clewell, 2007; Weaver *et al.*, 1996). Esse plasmídeo tem sido frequentemente associado a fatores de virulência, como o operon *cyl*, responsável pela produção de citolisina, à presença de substâncias agregativas (Clewell, 2007; Gilmore *et al.*, 1994) e, em alguns casos, ao gene *vanA* (Tomita, *et al.*, 2023).

Por sua vez, a família *rep7a* mostrou maior homologia com a família *rep* do plasmídeo conjugativo pRE25, classificado como pertencente à família Inc18. Essa família é caracterizada por um amplo espectro de hospedeiros, alta modularidade e propensão para variações e reorganizações independentes, podendo conter múltiplos replicons (Clewell *et al.*, 2014; Lanza *et al.*, 2015; Schwarz, *et al.*, 2001). Esse plasmídeo também foi descrito como portador de genes de resistência antimicrobiana, como *cat*, *ermB*, *aph(3')-III*, *vanA* e da sequência de inserção *IS1062* (Schwarz, *et al.*, 2001).

Embora esse plasmídeo multi-replicon não contenha genes de resistência a microbicidas ou metais, sua importância destaca-se pela portabilidade de genes de resistência antimicrobiana de relevância clínica em conjunto com genes de virulência (*vanHAX*, *aac(6')-aph(2'')*, *cat*, *ermB*, *agg* e o operon *cyl*). Ao contrário do principal plasmídeo multi-replicon de *E. faecium*, este plasmídeo apresentou uma distribuição estável dos genes ao comparar suas formas integradas e desintegradas, exibindo frequências e tamanhos equivalentes. Ademais, os plasmídeos desintegrados não coexistiram no mesmo genoma, sendo cada genoma portador de apenas uma das configurações.

Essa observação pode ser explicada pelo fato de que ambos os tipos de plasmídeos pertencem a família Inc18, cuja classificação é baseada na baixa ocorrência de plasmídeos com o mesmo mecanismo de replicação coexistindo na mesma célula, um fenômeno chamado de “incompatibilidade” (Inc). Uma explicação possível é que dois plasmídeos Inc18 podem se fundir por eventos de recombinação homóloga ou transposons, formando um único plasmídeo maior com múltiplas origens de replicação e garantir maior estabilidade do plasmídeo dentro da célula bacteriana, reduzindo o risco de perda durante a divisão celular. Plasmídeos multi-replicon podem conter genes de mobilização e conjugação, aumentando a taxa de transferência entre diferentes bactérias (Kohler *et al.*, 2018). Essa combinação de fatores — a fusão de plasmídeos, a presença de múltiplas origens de replicação e a mobilização genômica

— garante a estabilidade e a disseminação de genes de interesse, como resistência a antimicrobianos, dentro das populações bacterianas. Isso pode ser um fator importante na evolução e na adaptação de patógenos bacterianos, especialmente em ambientes nosocomiais, onde a pressão seletiva é alta devido ao uso de antibióticos e outros agentes microbicidas.

Plasmídeos mosaicos, definidos como plasmídeos compostos por elementos genéticos provenientes de fontes distintas, estão fortemente associados à disseminação de genes de resistência a antimicrobianos (Pesesky *et al.*, 2019). Um exemplo notável é observado nos plasmídeos do filo Firmicutes, do qual os *Enterococcus* fazem parte, caracterizados por uma modularidade impulsionada pela recombinação. Esses plasmídeos apresentam um alto grau de mosaicismos, frequentemente incorporando múltiplas origens de replicação em um mesmo ‘backbone’ plasmidial (Lanza *et al.*, 2015). Estudos, como o realizado por Pesesky e colaboradores em 2019, demonstraram que mais de 40% dos plasmídeos depositados no banco de dados de Sequências de Referência (RefSeq) do NCBI (do inglês *National Center for Biotechnology Information*) são plasmídeos mosaicos que carregam fragmentos de outros plasmídeos (Pesesky *et al.*, 2019).

Uma possível explicação para o alto grau de mosaicismos observado nos plasmídeos é o elevado número de sequências repetidas, especialmente aquelas associadas a elementos transponíveis, como ISs e transposons (Rodríguez-Beltrán *et al.*, 2021). Esses elementos atuam como pontos de recombinação, facilitando tanto processos de deleção quanto a incorporação de novos elementos genéticos oriundos de fontes distintas. Ademais, os plasmídeos tendem a acumular elementos genéticos móveis com maior facilidade do que os loci cromossômicos, uma vez que os genes que carregam não são essenciais para a sobrevivência celular.

Além disso, esses elementos podem interagir entre si ou com seus sítios-alvo, promovendo rearranjos adicionais (He *et al.*, 2015). Por exemplo, a recombinação homóloga entre diferentes cópias do mesmo transposon pode levar à aquisição, por parte dos plasmídeos, de genes de outros replicons (Zhang *et al.*, 2019), potencialmente mobilizando-os para transmissão a novos receptores. Essa hipótese é corroborada pela identificação de pelo menos uma IS em mais de 50% dos plasmídeos multi-replicon de *E. faecium* e *E. faecalis*. A presença frequente de elementos transponíveis em plasmídeos multi-replicon reforça ainda mais o papel fundamental desses elementos na dinâmica genética e na formação de plasmídeos mosaicos.

A identificação do gene *pilA*, anteriormente associado a grandes plasmídeos conjugativos (Kim *et al.*, 2010) e detectado no plasmídeo *repUS15*, aliada à possível presença de sistemas toxina-antitoxina nos plasmídeos *rep17* e *rep9*, bem como ao papel do gene *agg* na mediação da formação de agregados durante a conjugação em *E. faecalis* (Chuang-Smith *et al.*, 2010; Soares *et al.*, 2014) sugere que esses elementos colaboram para a manutenção e transferência desses plasmídeos mosaicos.

A transmissão horizontal de plasmídeos ocorre predominantemente por meio da conjugação, um processo no qual uma bactéria doadora transfere uma fita de DNA, seja de um plasmídeo ou de um elemento conjugativo cromossômico, para uma bactéria receptora, da mesma espécie ou de uma espécie diferente (Garcillán-Barcia *et al.*, 2022). Esse mecanismo é um dos principais responsáveis pela mobilidade intercelular de DNA em enterococos. O gene *agg*, além de estar envolvido na formação de biofilme em *Enterococcus*, também participa de uma parte importante na conjugação bacteriana por participar na formação de agregados, e já foi descrito em plasmídeos (Chuang-Smith *et al.*, 2010; Ruhel *et al.*, 2024; Soares *et al.*, 2014).

Embora se presuma que os mecanismos de conjugação em bactérias Gram-positivas diferem daqueles em bactérias Gram-negativas, em parte devido à ausência de pili conjugativos em espécies Gram-positivas (Clewell *et al.*, 2014; Grohmann *et al.*, 2018), um estudo recente (2024) demonstrou que o gene *pilA* está localizado entre genes preditos como parte de um possível sistema de secreção do tipo IV conjugativo. Isso sugere que o cluster *pilA* pode estar envolvido nesse aparato de conjugação (Stege *et al.*, 2024). Dessa forma, a associação entre *pilA*, os mecanismos conjugativos mediados por *agg* e os sistemas TA presentes no mesmo plasmídeo pode ser determinante para a estabilidade e disseminação desses plasmídeos mosaico.

A manutenção e transferência de plasmídeos entre células bacterianas impõem um ônus à fisiologia bacteriana, frequentemente reduzindo o *fitness* das bactérias portadoras (Vogwill; Maclean, 2015). Os custos associados aos plasmídeos são o principal fator limitante para sua persistência nas populações bacterianas e embora existam mecanismos eficazes para garantir a segregação dos plasmídeos durante a divisão celular, a probabilidade de perda nunca é nula (Carroll; Wong, 2018; Rodríguez-Beltrán *et al.*, 2021).

Quando há seleção constante por genes plasmidiais, esses genes podem se integrar ao cromossomo bacteriano, tornando o plasmídeo dispensável (Rodríguez-Beltrán *et al.*, 2021). Esse ciclo de adaptação e perda ajuda a explicar a dificuldade em compreender a ampla

prevalência de plasmídeos nas populações bacterianas, um enigma conhecido como "paradoxo dos plasmídeos" (Harrison, *et al.*, 2012). Nesse cenário, seria esperado que plasmídeos mosaicos fossem mais raros, já que costumam ter um tamanho maior que a média e carregar um número considerável de genes, implicando em custos energéticos adicionais. No entanto, nossos achados contradizem essa expectativa, pois plasmídeos mosaicos foram frequentemente identificados em ambas as espécies analisadas.

Vários estudos abordaram os princípios da biologia populacional que explicam a manutenção estável de plasmídeos, e esses princípios podem ser extrapolados para entender sua persistência nas amostras por nós estudadas. Estilos de vida bacterianos, como o crescimento em biofilme, podem favorecer a manutenção e a persistência dos plasmídeos apesar do fitness bacteriano (Ridenhour *et al.*, 2017; Stalder *et al.*, 2020). Assim sendo, essa característica fortalece nossa hipótese, considerando que o ambiente hospitalar favorece a formação de biofilme (Gilmore, *et al.*, 2013; Solheim *et al.*, 2011), e a presença de determinantes genéticos como *ebpA/B/C* e *asaI* no genoma e o gene *pilA* nos plasmídeos de *E. faecium* e *agg* nos plasmídeos de *E. faecalis* que facilitam tanto a formação quanto a manutenção de bactérias nesse tipo de ambiente (Ch'ng *et al.*, 2019; Ruhai *et al.*, 2024; Soares *et al.*, 2014).

Além disso, a presença de genes que conferem vantagens seletivas em ambientes hospitalares, como aqueles associados à resistência a antibióticos, metais, microbicidas e fatores de virulência, pode favorecer a manutenção dos plasmídeos e aumentar a probabilidade de sua coevolução com o hospedeiro ao longo do tempo. Nesse contexto, a aptidão do plasmídeo e do hospedeiro tornam-se interdependentes, pois a sobrevivência e o sucesso bacteriano impulsionam a persistência do plasmídeo. Esses genes, mais frequentemente carregados em plasmídeos do que no cromossomo, ampliam o nicho ecológico da bactéria e podem atenuar os custos de fitness associados à presença do plasmídeo (Millan *et al.*, 2014; Stalder *et al.*, 2017).

O modelo de "adaptação local" sugere que certas características são benéficas apenas em ambientes específicos, como ocorre com os genes de resistência a antimicrobianos nos plasmídeos *repUS15/rep17* em *E. faecium* e *rep7/rep9* em *E. faecalis* em genomas de amostras hospitalares. Novas amostras bacterianas que colonizam esse ambiente enfrentam desvantagem competitiva em relação às já estabelecidas, caso não possuam esses genes, mesmo que apresentem mutações benéficas em outras regiões do genoma. Assim, um plasmídeo que transmite características adaptativas locais a uma bactéria recém inserida nesse

nicho ecológico pode favorecer sua sobrevivência, beneficiando indiretamente os próprios plasmídeos que carregam esses genes acessórios e favorecendo sua manutenção (Bergstrom, *et al.*, 2000; Eberhard, 1989; Hall *et al.*, 2022)

Por fim, Harrison e Colaboradores (2015) demonstraram que os plasmídeos podem ser mantidos de forma estável em populações bacterianas, mesmo na ausência de seleção para os genes que carregam, através de evolução compensatória, onde mutações regulatórias benéficas em genes-alvo parecem estabilizar um plasmídeo ao compensar seus custos. Esse achado é particularmente relevante, pois desafia a visão tradicional do paradoxo dos plasmídeos, sugerindo que as condições para a manutenção desses elementos genéticos podem ser menos restritivas do que anteriormente suposto (Harrison *et al.*, 2015). Esses resultados podem não apenas explicar a presença e a manutenção dos plasmídeos mosaicos, mas também justificar sua maior frequência em comparação com suas versões desintegradas.

Tais observações sugerem que o acúmulo de determinantes genéticos em um único plasmídeo grande pode favorecer a co-resistência, ou seja, quando dois ou mais genes de resistência diferentes estão fisicamente associados no mesmo EGM ou na mesma amostra bacteriana, conferindo resistência a compostos distintos (Pal *et al.*, 2015, 2017). Esse agrupamento de genes aumenta as chances de co-transferência e, conseqüentemente, favorece a adaptação local em ambientes submetidos a múltiplas pressões seletivas. Por exemplo, a co-transferência do gene *tcrB*, integrante do operon *YAZBtcr* de resistência ao cobre, junto com o gene *ermB* de resistência a macrolídeos têm sido observadas em isolados de *E. faecium* e *E. faecalis* (Amachawadi *et al.*, 2013; Pasquaroli *et al.*, 2014). Da mesma forma, essa tendência é reforçada pela presença do *tcrB* no mesmo plasmídeo que o *cueO* e genes de resistência a aminoglicosídeos e tetraciclina em amostras enterocócicas (Rebelo *et al.*, 2023; Silveira *et al.*, 2014), bem como a associação dos genes *merA* (resistência ao mercúrio) com *tcrB* e *vanA* em um único plasmídeo (Rebelo *et al.*, 2021).

Nossos resultados corroboram essas observações quando verificamos que os plasmídeos *repUS15/rep17* continham o operon *YAZBtcr*, o gene *cueO* (resistência a cobre), o gene *merA* (tolerância a mercúrio), o operon de resistência à vancomicina *vanHAX*, três genes associados a elevados níveis de resistência a aminoglicosídeos (*aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *ant(6')-Ia* e *aph(3')-IIIa*), o gene *erm(B)* (resistência a macrolídeos) e o gene *pilA* (associado à formação de pili). Além disso, o plasmídeo multi-replicon *rep7a/rep9* em *E. faecalis* portava os genes *vanHAX*, *aac(6')-aph(2'')*, *cat*, *erm(B)*, *agg* e o operon *cyl*. Esses achados evidenciam como a

agregação de múltiplos traços adaptativos em plasmídeos pode facilitar a co-resistência e impulsionar a adaptação bacteriana em ambientes sob pressões seletivas distintas.

Em um estudo recente, Arya e colaboradores (Arya *et al.*, 2021) demonstraram de forma notável o impacto da co-seleção na manutenção da resistência aos antimicrobianos. Por meio de um modelo matemático, eles desenvolveram uma estrutura mecanicista capaz de prever as concentrações mínimas de metais necessárias para co-selecionar amostras resistentes, considerando sua toxicidade em diferentes níveis. Os resultados evidenciaram que a pressão co-seletiva pode sustentar a resistência a antimicrobianos em comunidades microbianas, mesmo na ausência do antibiótico. Além disso, o modelo indicou que a perda de genes de resistência ou de bactérias resistentes ocorre predominantemente em ambientes com baixa toxicidade por metais, sendo que, na maioria dos casos, os plasmídeos não impõem um custo adaptativo significativo. Apenas em situações raras, esse custo afeta o *fitness* bacteriano a ponto de levar à eliminação dos plasmídeos (Arya *et al.*, 2021).

Apesar de não conter genes de relevância clínica, o plasmídeo mais frequente em *E. faecalis* foi o *repUS43*, onde sua família *rep* demonstrou homologia com a família *rep* do plasmídeo pDO1. Esse plasmídeo já foi descrito carregando os genes *tetM* e *tetL*, além do transposon conjugativo *Tn6009*, que foi apontado como carreador dos genes *tet* (Fatoba *et al.*, 2022; Founou *et al.*, 2021; Karlsson *et al.*, 2024; Qin *et al.*, 2012), o que está de acordo com os nossos achados, mostrando que mais da metade dos plasmídeos continha esses genes.

Além disso, *Tn6009* foi previamente descrito em outras espécies bacterianas, incluindo bactérias Gram-negativas, que foram capazes de atuar como doadoras e transferir esse EGM, por conjugação, para uma amostra receptora de *E. faecalis*, resultando em transconjugantes de *E. faecalis* resistentes à tetraciclina (Farias *et al.*, 2023). O plasmídeo *repUS43* se revelou particularmente relevante por apresentar os genes *efrA/B*, que codificam a bomba de efluxo EfrA/B, um achado inédito em plasmídeos, presente em 30 dos 51 plasmídeos da família *repUS43* nos genomas de *E. faecalis*. Essa bomba de efluxo já foi descrita como sendo associada à resistência a desinfetantes, como triclosan e clorexidina, além de antissépticos, como acriflavina. Além disso, há evidências de que possa causar resistência cruzada, tendo sido associada à resistência a fluoroquinolonas e gentamicina (Esfahani *et al.*, 2020; Lavilla Lerma *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2003; Sobhanipoor *et al.*, 2021). Transposons conjugativos, como *Tn6009*, possuem uma capacidade extraordinária de realizar processos de troca genética em uma ampla diversidade de genomas, frequentemente resultando em plataformas mosaico que incorporam fragmentos de transposons e plasmídeos, o que se reflete em seu caráter

altamente recombinante (Clewell *et al.*, 2014; Soge *et al.*, 2008). Essa característica pode explicar a presença da bomba de efluxo *EfrA/B*, tipicamente encontrada no cromossomo, em plasmídeos detectados em mais da metade dos genomas de *E. faecalis* analisados, pois elementos genéticos móveis com essas propriedades são capazes de incorporar segmentos cromossômicos (Bennett, 2004).

Os plasmídeos *repUS43* foram descritos como pertencentes ao grupo Rep-trans (Fu *et al.*, 2024; Islam *et al.*, 2023). Estudos já demonstraram que os plasmídeos deste grupo podem ser mobilizados por outros plasmídeos conjugativos resistentes a antibióticos presentes na mesma célula (Freitas *et al.*, 2013; Garcia-Migura, *et al.*, 2009; Lanza *et al.*, 2015). Além disso, os plasmídeos *repUS43* coexistiram, em mais de 50% dos genomas analisados, com outros plasmídeos portadores de genes de relevância clínica, como o multi-replicon *rep7/rep9*. Essa coexistência sugere a atuação de uma pressão seletiva que favorece a manutenção e/ou a transferência concomitante desses elementos, indicando que a presença desses genes confere vantagens adaptativas aos hospedeiros bacterianos e promove a seleção simultânea desses plasmídeos.

A análise da distribuição dos STs em *E. faecium* revelou que 60% dos genomas pertenciam a linhagens associadas a hospitais, classificadas como Clado A1 nas análises filogenéticas e anteriormente designadas como complexo clonal 17 (CC17). Essas linhagens incluíam os STs: ST18, ST19, ST22, ST78, ST80, ST192, ST203, ST262, ST288, ST564, ST844, ST907, ST948, ST958, ST1626 e ST1628, além de STs que, embora não classificados como CC17, eram SLVs ou DLVs de algum ST pertencente a esse complexo. Os resultados refletem a proximidade genética dos genomas analisados, evidenciada pelos ramos curtos na árvore filogenética, indicando um elevado grau de auto clonalidade. Esse perfil era esperado devido à predominância de genomas isolados de ambientes hospitalares e pertencentes ao Clado A1, reforçando a disseminação e adaptação dessas linhagens nesse contexto. As características deste clado incluem um aumento em elementos genéticos móveis, alterações no metabolismo e hipermutabilidade, um conjunto de habilidades que fornece ao *E. faecium* um genoma maleável diante de múltiplas pressões seletivas (Gouliouris *et al.*, 2018; Rios *et al.*, 2020; Wei, *et al.*, 2024).

Análises genômicas recentes destacaram o papel multifacetado dos plasmídeos, dos elementos genéticos móveis e de sua disseminação na evolução do VREfm para se tornar um patógeno clínico. Uma análise filogenética que leva em consideração eventos de recombinação – um processo que resulta na mistura genômica de clones – sugere que o clado

A1, o mais clinicamente significativo, emergiu do clado A2, ambos descendentes do clado comunitário B, e que novas formas genômicas surgem por meio da troca de material genético entre esses membros, originando linhagens inéditas. De forma similar, a população de plasmídeos entre os VREfm é um fator crucial na distribuição dos genes de resistência antimicrobiana, e perfis específicos de plasmídeos podem ser utilizados para sugerir a fonte de origem dos isolados enterocócicos (Hourigan *et al.*, 2024; Van Hal *et al.*, 2022).

Ao analisarmos a distribuição desses genes e plasmídeos em relação à estrutura populacional, observamos uma maior concentração de genes de resistência a antimicrobianos, fatores de virulência e plasmídeos com perfis extensos de resistência a antimicrobianos, tolerância a metais e determinantes de virulência no Clado A1, especialmente no ST78, o mais frequente neste grupo. Além de plasmídeos que transportavam em conjunto genes de tolerância a metais, resistência a antimicrobianos e/ou determinantes de virulência, esses elementos estavam presentes no mesmo genoma juntamente com outros plasmídeos que continham genes de relevância clínica, como *aac(6')-aph(2'')*, *ant(6)-Ia*, *aph(3')-III*, *vanHAX* e *cat*. As amostras do Clado A1 já foram descritas com o dobro de genes associados a EGMs em comparação com as cepas não clínicas (Kim, *et al.*, 2014), além de apresentarem um maior número de genes relacionados à resistência antimicrobiana e virulência (Gao, *et al.*, 2018; Mikalsen *et al.*, 2015; Van Hal *et al.*, 2022).

A distribuição desses plasmídeos não está necessariamente vinculada a subclados específicos. Isso ocorre porque a natureza clonal das amostras e o fato de terem sido isoladas em ambiente hospitalar implicam em sua exposição a pressões seletivas comuns nesse meio. Essas pressões fazem com que as subpopulações evoluam de maneira convergente, apresentando os mesmos elementos genéticos móveis. Esse fenômeno também explica a circulação dos mesmos plasmídeos entre amostras de colonização e infecção.

Os genomas CL9251 (ST116) e CL9552 (ST1762) se destacaram por pertencerem ao complexo clonal 94 (CC94), o que se mostra particularmente relevante considerando a tradicional associação do CC94 a linhagens que se disseminam em comunidades, provocando infecções esporádicas em animais e humanos. Esse achado se torna ainda mais significativo ao ser observado que tais isolados foram obtidos a partir de infecções (Peng *et al.*, 2022). A análise evolutiva de *E. faecium* revela que dois eventos principais de divergência definiram os caminhos dos complexos CC17 e CC94. O primeiro, há cerca de 3.000 anos durante a urbanização humana, resultou na divisão em linhagens associadas a humanos e animais, com a linhagem animal se subdividindo posteriormente em uma linha hospitalar epidêmica (CC17)

e outra comunitária (CC94). O segundo evento, ocorrido há aproximadamente 74 ± 30 anos, foi provavelmente impulsionado pelo uso intensificado de antimicrobianos (Gilmore, *et al.*, 2013; Gouliouris *et al.*, 2018; Lebreton *et al.*, 2013, 2013; Peng *et al.*, 2022).

Atualmente, com os avanços nas ferramentas de análises filogenéticas baseadas no WGS, a estrutura filogenética de *E. faecium* tornou-se mais clara, evidenciando sua segregação em dois grandes clados. O clado A é composto principalmente por isolados clínicos e de origem animal, incluindo linhagens do CC17, enquanto o clado B abrange predominantemente isolados comensais e comunitários, associados ao CC94 (Lebreton *et al.*, 2013; Peng *et al.*, 2022; Rios *et al.*, 2020; Wei, *et al.*, 2024). Estudos filogenéticos também sugerem uma divergência mais recente dentro do clado A, favorecendo sua subdivisão em dois subclados: o clado A1, composto predominantemente por isolados hospitalares do CC17, e o clado A2, formado majoritariamente por isolados de origem animal (Gouliouris *et al.*, 2018). Essa trajetória evolutiva explica a organização da nossa árvore filogenética, na qual os genomas CL9251 e CL9552 formaram um cluster monofilético que apresenta um parentesco evolutivo mais distante, tanto em relação aos indivíduos pertencentes ao CC17 quanto aos não-CC17, evidenciado pelo extenso comprimento do ramo que os separa do ancestral comum mais recente.

Estudos recentes demonstraram que mais de 97% dos isolados do clado B compartilham identidade média de nucleotídeos (ANI) com *Enterococcus lactis*, sugerindo que o clado B deveria ser renomeado como *E. lactis*. Essa espécie, predominantemente isolada de alimentos fermentados, é geralmente considerada não patogênica e probiótica (Belloso Daza *et al.*, 2021; Choi *et al.*, 2024), esses dados já indicam uma distinção taxonômica relevante em comparação aos isolados clínicos.

No entanto, análises filogenéticas baseadas apenas nas sequências do gene 16S rRNA não conseguem diferenciar os genomas de *E. faecium* e *E. lactis* em clados distintos, provavelmente devido à alta similaridade de sequência. Em contrapartida, quando se utiliza o sequenciamento de genoma completo, a separação entre esses genomas torna-se muito mais evidente (Choi *et al.*, 2024), o que se reflete na organização observada em nossa árvore filogenética de máxima verossimilhança.

Essa maior resolução também foi corroborada pelos resultados obtidos com a ferramenta TYGS, que utiliza hibridização digital DNA-DNA (dDDH) para comparações pareadas com as cepas-tipo mais próximas e gera uma filogenia baseada no cálculo de distância genômica (Meier-Kolthoff, *et al.*, 2019). Notavelmente, o genoma CL9251

apresentou maior proximidade com a cepa-tipo *Enterococcus lactis* CCM8412, enquanto o genoma CL9552 se agrupou com a cepa-tipo *Enterococcus xinjiangensis* JCM 30200, sinônimo heterotípico de *E. lactis* (Belloso Daza *et al.*, 2021). Esses resultados sugerem a estreita relação entre o clado B e amostras identificadas como *E. lactis* e destacam a importância das abordagens baseadas em genoma completo para a diferenciação de linhagens bacterianas tão próximas.

Embora as amostras do clado B sejam geralmente descritas como portadoras de um número inferior de elementos genéticos móveis e genes de resistência antimicrobiana em comparação com as do clado A1 (Lebreton *et al.*, 2013; Van Hal *et al.*, 2022), o genoma CL9251 apresentou um número expressivo de genes associados à resistência a aminoglicosídeos, macrolídeos, estreptograminas e lincosamidas. Além disso, continha um plasmídeo da família *repUS15*, que abriga os genes *cueO* e *merA*, relacionados à resistência a metais, bem como o gene *pilA*, implicado na virulência. Esses resultados reforçam o potencial fluxo gênico entre os Clados A1 e B, e o possível papel do Clado B como reservatório de genes de importância clínica e na sua disseminação, tanto em ambientes hospitalares quanto comunitários.

A análise filogenética das amostras de *E. faecalis* revelou dois clados geneticamente distintos, caracterizados por longos ramos na árvore filogenética. O Clado 1, composto por oito genomas, inclui STs generalistas, como ST4, ST16, ST40 e ST21, que ocorrem em diversos ambientes, incluindo o hospitalar. Em contraste, o Clado 2, com 52 genomas, é predominantemente formado por STs especializados, fortemente associados a infecções hospitalares e quase exclusivamente isolados de ambientes clínicos. Esses achados corroboram a literatura, que destaca a maior adaptabilidade de *E. faecalis* a diferentes hospedeiros e ambientes em comparação a *E. faecium*, embora determinados complexos clonais—como CC2, CC40 e CC87—sejam amplamente predominantes em infecções hospitalares (Kuch *et al.*, 2012).

Os dois principais STs presentes no Clado 2 são o ST6 e o ST525, ambos pertencentes ao CC2. O ST6 está disseminado mundialmente, principalmente associado a infecções nosocomiais, enquanto o ST525 foi documentado apenas na região sudeste do Brasil (De Almeida *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2017). A predominância do CC2 em ambientes hospitalares é um fenômeno global, e diversos estudos têm destacado a importância desse complexo em infecções relacionadas à assistência à saúde (Choi *et al.*, 2024; De Almeida *et al.*, 2014; Kuch *et al.*, 2012; Peng *et al.*, 2022; Santos *et al.*, 2017). Nesse contexto, os STs 6 e

525 foram associados a amostras que carregam genes de resistência a antimicrobianos de relevância clínica, como *vanA*, *erm(B)*, *tet(M)*, *aac(6')-aph(2'')*, *aph(3')-III* e *ant(6)-Ia*, além de fatores de virulência implicados na formação de biofilme e invasão celular, como *ace*, *gelE*, *agg* e *cyl* (De Oliveira *et al.*, 2020; Freitas *et al.*, 2011; McBride *et al.*, 2007).

Esses genomas também apresentam um elevado número de elementos genéticos móveis (Mikalsen *et al.*, 2015). Esses achados corroboram a identificação do plasmídeo *repUS43*, que abriga genes de tolerância a microbicidas associados a genes de resistência e determinantes de virulência, bem como dos plasmídeos *rep9*, *rep2* e do multi-replicon *repUS43/rep9/rep2*, os quais foram predominantemente detectados em genomas do Clado 2, independentemente do subclado. Adicionalmente, os genomas contendo esses plasmídeos frequentemente apresentavam outros elementos de relevância clínica, como o plasmídeo multi-replicon *rep7a/rep9*, que carrega genes relacionados à resistência a antimicrobianos e determinantes de virulência, incluindo *vanHAX*, *aac(6')-aph(2'')*, *cat*, *erm(B)*, o operon *cyl* e *agg*.

Apesar do Clado 1 ter menor representatividade, detectamos o plasmídeo *repUS43*, que contém genes associados à tolerância a microbicidas e à resistência antimicrobiana. Esse elemento circula entre linhagens generalistas presentes tanto em ambientes hospitalares quanto extra-hospitalares, sugerindo um potencial de disseminação de resistência para além do contexto hospitalar.

A ausência de padrões claros na distribuição de plasmídeos na filogenia de *E. faecium* e *E. faecalis* era esperada, pois esses elementos genéticos móveis se disseminam entre linhagens com trajetórias evolutivas distintas, independentemente da história evolutiva das bactérias em que são veiculados. Plasmídeos e outros elementos genéticos móveis podem frequentemente transmitir genes entre espécies e linhagens mais distantes. Muitos genes e EGMs apresentam distribuições irregulares e parecem estar mais associados ao habitat do que à filogenia, o que sustenta um papel central da transferência horizontal de genes em sua disseminação (Stalder, *et al.*, 2017).

A identificação de genes de resistência a antimicrobianos, microbicidas e metais pesados coexistindo em uma mesma célula bacteriana de *Enterococcus faecium* ou de *Enterococcus faecalis* de origem hospitalar, especialmente quando inseridos em elementos genéticos móveis, evidencia um risco elevado de disseminação de fenótipos multirresistentes por transferência horizontal. A co-seleção mediada por pressões ambientais diversas, como o uso de antimicrobianos e agentes antimicrobianos não antibióticos, reforça a importância de abordagens integradas para vigilância e controle da resistência, considerando não apenas os

genes envolvidos, mas também os elementos que os transportam e o contexto ecológico no qual circulam. Esses achados ressaltam a urgência de políticas que limitem o uso indiscriminado de antimicrobianos e microbicidas, além de promoverem a importância da implementação do monitoramento genômico contínuo em ambientes de saúde.

7. CONCLUSÃO

Os genomas de *E. faecium* apresentaram maior diversidade e número de genes de resistência (21) em comparação a *E. faecalis* (13). O operon *vanHAX*, associado à resistência aos glicopeptídeos, foi altamente prevalente em ambas as espécies (*E. faecalis* 80%, *E. faecium* 75%). A resistência a aminoglicosídeos foi majoritariamente associada ao gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, presente em 75% dos genomas de *E. faecalis* e 65% de *E. faecium*.

Todos os genomas continham pelo menos um gene de virulência. *E. faecalis* apresentou alta frequência em genes que facilitam a invasão celular (*gelE*, *sprE*) e genes de adesão (*efaA*, *ace*, *ecbA*, *pilB* e *bopD*). *E. faecium* teve maior frequência em genes que facilitam a adesão (*ecbA*, *sgrA*, *acm*, *scm*, *pilB*, e *bopD*).

Foram identificados genes e operons de tolerância a metais pesados (cobre, cádmio e mercúrio) e a microbicidas (triclosan, clorexidina, cloreto de benzalcônio e acriflavina). Em *E. faecium*, destacou-se a alta frequência de genótipos para tolerância a metais, com os genes de cobre (operon *YAZBtcr* e *cueO*), mercúrio (*merA*) e cádmio (*cadA*), além do operon 2CS-CHX (resistência à clorexidina) e da bomba de efluxo EfrA/B. Já em *E. faecalis*, predominou o gene *cadA*, acompanhado pelas bombas de efluxo EfrA/B e EmeA.

A co-ocorrência entre genes de resistência a metais e genes de resistência antimicrobiana e virulência foi observada em *E. faecium*, destacando-se o gene *merA* com *vanHAX* e genes de resistência a aminoglicosídeos (*aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* e *aph(3')-III*) e *cat*, além dos genes de virulência *pilA* e *sgrA*. O operon *YAZBtcr* teve associação significativa com *vanHAX* e genes de resistência a aminoglicosídeos (*aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* e *aph(3')-III*). Em *E. faecalis*, *cadA* esteve associado a *vanHAX* e outros genes de resistência antimicrobiana, como *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *erm(B)*, *lsa(A)*, *cat*, *dfrF* e *tetM*. Determinantes de virulência, como *bopD*, *esp*, *gelE*, *ace* e *pilA*, também apresentaram associações com *cadA*.

O mobiloma revelou um perfil distinto entre as espécies. *E. faecium* apresentou 19 famílias *rep*, enquanto *E. faecalis* apresentou 12 famílias. Foram identificadas 13 sequências de inserção em *E. faecium*, e 10 em *E. faecalis*. Transposons variaram entre sete tipos em *E. faecium* e quatro em *E. faecalis*.

O Gplas revelou alta prevalência de plasmídeos nos genomas analisados, com destaque para *E. faecium*. Todos os genomas continham pelo menos um plasmídeo, variando em número e tamanho entre as espécies. *E. faecium* apresentou maior diversidade de famílias *rep* e maior frequência de plasmídeos multi-replicons, os mais frequentes o *repUS15*, *rep17a* e o seu multi-replicon *repUS15/rep17a*. Plasmídeos multi-replicons em *E. faecium* apresentaram maior tamanho e genes associados à resistência a antimicrobianos, metais pesados e virulência. *E. faecalis* apresentou menor diversidade de plasmídeos, com predominância de plasmídeos sensíveis a feromônios. O plasmídeo *repUS43* foi o mais frequente em *E. faecalis*, destacando-se pela presença dos genes *efrA/B* e outros genes de resistência. Plasmídeos multi-replicons foram mais frequentes em *E. faecium*, enquanto em *E. faecalis* houve maior separação entre plasmídeos com diferentes perfis gênicos.

Foram identificados 29 STs distintos em *E. faecium* e 60% dos genomas foram classificados como linhagens associadas a hospitais (Clado A1), e incluíram os cinco predominantes (ST18, ST78, ST19, ST22 e ST412). A árvore filogenética de *E. faecium* revelou relações evolutivas próximas entre a maior parte dos genomas, sugerindo um ancestral comum recente e relacionado a ambiente hospitalar (Clado A1). Porém, dois genomas, pertencentes ao Clado B (antigo CC94), mostraram parentesco evolutivo distante dos genomas do antigo CC17 (Clado A1) e foram mais próximos das cepas tipos de *E. lactis* e *E. xinjiangensis*. Genomas pertencentes ao Clado A1 (especialmente ST78) apresentaram alta concentração de plasmídeos com resistência a antimicrobianos, tolerância a metais e determinantes de virulência.

A filogenia de *E. faecalis* revelou dois cladogramas: Clado 1, associado a ambientes externos ao hospital, e Clado 2, predominantemente hospitalar. O Clado 2 apresentou três ramificações com STs ligados a infecções hospitalares (ST6, ST525, ST69 e ST778) e maior presença de plasmídeos *repUS43*, *rep9*, *rep2* e multi-replicon *rep9/rep7*, associados à resistência, tolerância a microbicidas e virulência. O *repUS43* também foi detectado no Clado 1, sugerindo sua circulação em linhagens não hospitalares.

Esses resultados sugerem que a pressão seletiva exercida por microbicidas e metais podem ter importante influência na co-seleção de determinantes de resistência aos antimicrobianos e de virulência entre linhagens de *Enterococcus* de origem hospitalar.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AAKRA, Å. *et al.* The response of *Enterococcus faecalis* V583 to chloramphenicol treatment. *International Journal of Microbiology*, 2010, p. 1–7, 2010.
2. AARESTRUP, F. M. *et al.* Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 37, n. 2, p. 127–137, jun. 2000.
3. ABBOOD, H. M.; HIJAZI, K.; GOULD, I. M. Chlorhexidine resistance or cross-resistance, that is the question. *Antibiotics*, v. 12, n. 5, p. 798, 2023.
4. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Avaliação dos Indicadores Nacionais de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência Microbiana (RM). 2022.
5. ALCÁNTAR-CURIEL, M. D. *et al.* Gram-negative ESKAPE bacteria bloodstream infections in patients during the COVID-19 pandemic. *PeerJ*, v. 11, p. e15007, 29 mar. 2023.
6. AMACHAWADI, R. G. *et al.* Occurrence of the transferable copper resistance gene *tcrB* among fecal enterococci of U.S. feedlot cattle fed copper-supplemented diets. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 79, n. 14, p. 4369–4375, jul. 2013.
7. ANDREWES, F. W.; HORDER, T. A study of the streptococci pathogenic for man. *The Lancet*, v. 168, n. 4334, p. 775–783, 1906.
8. APUA, T. White paper prepared by the Alliance for the Prudent Use of Antibiotics (APUA). Boston, MA, v. 2111, 2011.
9. ARBLOA, A. *et al.* Role of class A penicillin-binding proteins in PBP5-mediated β -lactam resistance in *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*, v. 186, n. 5, p. 1221–1228, 2004.
10. ARGUDÍN, M. A.; HOEFER, A.; BUTAYE, P. Heavy metal resistance in bacteria from animals. *Research in Veterinary Science*, v. 122, p. 132–147, fev. 2019.
11. ARIAS, C. A. *et al.* Cotransfer of antibiotic resistance genes and a *hyl Efm*-containing virulence plasmid in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, n. 10, p. 4240–4246, out. 2009.
12. ARIAS, C. A.; MURRAY, B. E. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nature Reviews Microbiology*, v. 10, n. 4, p. 266–278, abr. 2012.
13. ARREDONDO-ALONSO, S. *et al.* gplas: a comprehensive tool for plasmid analysis using short-read graphs. *Bioinformatics (Oxford, England)*, v. 36, n. 12, p. 3874–3876, jun. 2020.
14. ARREDONDO-ALONSO, S. *et al.* mlplasmids: a user-friendly tool to predict plasmid- and chromosome-derived sequences for single species. *Microbial Genomics*, v. 4, n. 11, p. e000224, nov. 2018.
15. ARREDONDO-ALONSO, S. *et al.* Plasmids shaped the recent emergence of the major nosocomial pathogen *Enterococcus faecium*. *mBio*, v. 11, n. 1, p. e03284-19, fev. 2020.
16. ARTHUR, M.; QUINTILIANI, R. Regulation of VanA- and VanB-type glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, n. 2, p. 375–381, fev. 2001.
17. ARYA, S. *et al.* Towards a general model for predicting minimal metal concentrations co-selecting for antibiotic resistance plasmids. *Environmental Pollution*, v. 275, p. 116602, 2021.
18. ASLANGUL, E. *et al.* Acquired gentamicin resistance by permeability impairment in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 50, n. 11, p. 3615–3621, nov. 2006.
19. AUCH, A. F. *et al.* Genome BLAST distance phylogenies inferred from whole plastid and whole mitochondrion genome sequences. *BMC Bioinformatics*, v. 7, p. 1–16, 2006.
20. BAKER-AUSTIN, C. *et al.* Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends in Microbiology*, v. 14, n. 4, p. 176–182, abr. 2006.
21. BELLOSO DAZA, M. V. *et al.* Genome-based studies indicate that the *Enterococcus faecium* Clade B strains belong to *Enterococcus lactis* species and lack of the hospital infection associated markers. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 71, n. 8, 18 ago. 2021.
22. BELLOSO DAZA, M. V. *et al.* Genomic insights of *Enterococcus faecium* UC7251, a multi-drug resistant strain from ready-to-eat food, highlight the risk of antimicrobial resistance in the food chain. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, p. 894241, jun. 2022.

23. BENNETT, P. M. Genome plasticity: insertion sequence elements, transposons and integrons, and DNA rearrangement. In: *Genomics, Proteomics, and Clinical Bacteriology: Methods and Reviews*, p. 71–113, 2004.
24. BENNETT, P. M. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology*, v. 153, n. S1, p. S347–S357, 2008.
25. BERGSTROM, C. T.; LIPSITCH, M.; LEVIN, B. R. Natural Selection, Infectious Transfer and the Existence Conditions for Bacterial Plasmids. *Genetics*, v. 155, n. 4, p. 1505–1519, ago. 2000.
26. BIGGEL, M. *et al.* Spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* ST133 in the aquatic environment in Switzerland. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, v. 27, p. 31–36, dez. 2021.
27. CALAFAT, A. M. *et al.* Urinary concentrations of triclosan in the US population: 2003–2004. *Environmental Health Perspectives*, v. 116, n. 3, p. 303–307, 2008.
28. CARATTOLI, A. *et al.* In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 58, n. 7, p. 3895–3903, jul. 2014.
29. ÇARDAK, M.; TOĞAY, S. Ö.; AY, M. Genotypic and Phenotypic Evaluation of Heavy Metal Resistance of Enterococcal Isolates from Seafood Products for Consumption. *Commagene Journal of Biology*, v. 7, n. 1, p. 58–64, 2023.
30. CARROLL, A. C.; WONG, A. Plasmid persistence: costs, benefits, and the plasmid paradox. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 64, n. 5, p. 293–304, mai. 2018.
31. CARTMAN, S. T. *et al.* The emergence of ‘hypervirulence’ in *Clostridium difficile*. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 300, n. 6, p. 387–395, 2010.
32. CATTOIR, V.; GIARD, J.-C. Antibiotic resistance in *Enterococcus faecium* clinical isolates. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, v. 12, n. 2, p. 239–248, fev. 2014.
33. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Antibiotic resistance threats in the United States, 2019. 2019.
34. CH’NG, J.-H. *et al.* Biofilm-associated infection by enterococci. *Nature Reviews Microbiology*, v. 17, n. 2, p. 82–94, 2019.
35. CHAPMAN, J. S. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 51, n. 4, p. 271–276, 2003.
36. CHARPENTIER, E.; COURVALIN, P. Antibiotic resistance in *Listeria* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 43, n. 9, p. 2103–2108, 1999.
37. CHOI, D. G. *et al.* Comparative pangenome analysis of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus lactis* provides new insights into the adaptive evolution by horizontal gene acquisitions. *BMC Genomics*, v. 25, n. 1, p. 28, jan. 2024.
38. CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 65, n. 2, p. 232–260, jun. 2001.
39. CHUANG-SMITH, O. N. *et al.* Acceleration of *Enterococcus faecalis* biofilm formation by aggregation substance expression in an ex vivo model of cardiac valve colonization. *PLoS ONE*, v. 5, n. 12, p. e15798, 2010.
40. CLEWELL, D. B. Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. 1993.
41. CLEWELL, D. B. *et al.* Extrachromosomal and mobile elements in enterococci: transmission, maintenance, and epidemiology. In: *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. [S.l.], 2014.
42. CLEWELL, D. B. Properties of *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1, a member of a widely disseminated family of pheromone-responding, conjugative, virulence elements encoding cytolysin. *Plasmid*, v. 58, n. 3, p. 205–227, nov. 2007.
43. COQUE, T. M. High occurrence of esp among ampicillin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus faecium* clones from hospitalized patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 50, n. 6, p. 1035–1038, dez. 2002.
44. CORREIA, S. *et al.* Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? *Journal of Medical Microbiology*, v. 66, n. 5, p. 551–559, 2017.

45. CRAIG, C. P. Preparation of the skin for surgery. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, v. 7, n. 5, p. 257–258, 1986.
46. DE ALMEIDA, L. M. *et al.* Linezolid resistance in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates in a Brazilian hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 58, n. 5, p. 2993–2994, 2014.
47. DE NIEDERHÄUSERN, S. *et al.* Vancomycin-resistance transferability from VanA enterococci to *Staphylococcus aureus*. *Current Microbiology*, v. 62, p. 1363–1367, 2011.
48. DE OLIVEIRA, E. S. *et al.* Silent clonal spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* ST6 and ST525 colonizing patients at hospital admission in Natal, Brazil. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, v. 41, n. 4, p. 485–487, 2020.
49. DIDEM, K. *et al.* Evaluation of antimicrobial durability and anti-biofilm effects in urinary catheters against *Enterococcus faecalis* clinical isolates and reference strains. *Balkan Medical Journal*, v. 34, n. 6, p. 546–552, 2017.
50. DOBRINDT, U. *et al.* Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*, v. 2, n. 5, p. 414–424, 2004.
51. DUARTE, B. *et al.* 2CS-CHX T Operon Signature of Chlorhexidine Tolerance among *Enterococcus faecium* Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 85, n. 23, p. e01589-19, dez. 2019.
52. EBERHARD, W. G. Why do bacterial plasmids carry some genes and not others? *Plasmid*, v. 21, n. 3, p. 167–174, mai. 1989.
53. ENTEROCOCCAL GROUP *et al.* The global dissemination of hospital clones of *Enterococcus faecium*. *Genome Medicine*, v. 13, n. 1, p. 52, dez. 2021.
54. ESFAHANI, S. *et al.* Co-Incidence of Type II Topoisomerase Mutations and Efflux Expression in High Fluoroquinolone Resistant *Enterococcus faecalis* Isolated from Urinary Tract Infections. *Infection and Drug Resistance*, v. 13, p. 553–559, fev. 2020.
55. FACKLAM, R. R.; CARVALHO, M. D. G. S.; TEIXEIRA, L. M. History, Taxonomy, Biochemical Characteristics, and Antibiotic Susceptibility Testing of Enterococci. In: *The Enterococci*. [S.l.]: John Wiley & Sons, Ltd, 2002. p. 1–54.
56. FARIAS, B. O. *et al.* First Report of a Wastewater Treatment-Adapted *Enterococcus faecalis* ST21 Harboring vanA Gene in Brazil. *Current Microbiology*, v. 80, n. 9, p. 313, 2023.
57. FATOBA, D. O. *et al.* Genomic analysis of antibiotic-resistant *Enterococcus* spp. reveals novel enterococci strains and the spread of plasmid-borne Tet(M), Tet(L) and Erm(B) genes from chicken litter to agricultural soil in South Africa. *Journal of Environmental Management*, v. 302, p. 114101, 2022.
58. FIORE, E.; VAN TYNE, D.; GILMORE, M. S. Pathogenicity of Enterococci. *Microbiology Spectrum*, v. 7, n. 4, p. 7.4.9, 19 jul. 2019.
59. FLORENSA, A. F. *et al.* ResFinder – an open online resource for identification of antimicrobial resistance genes in next-generation sequencing data and prediction of phenotypes from genotypes. *Microbial Genomics*, v. 8, n. 1, p. 000748, jan. 2022.
60. FOUNOU, R. C. *et al.* *Enterococcus faecalis* ST21 harbouring Tn6009 isolated from a carriage sample in South Africa. *South African Medical Journal*, v. 111, n. 2, p. 98–99, 2021.
61. FRAISE, A. P.; MAILLARD, J.-Y.; SATTAR, S. *Russell, Hugo and Ayliffe's principles and practice of disinfection, preservation and sterilization*. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2012.
62. FREITAS, A. R. *et al.* Clonal expansion within clonal complex 2 and spread of vancomycin-resistant plasmids among different genetic lineages of *Enterococcus faecalis* from Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 63, n. 6, p. 1104–1111, 2009.
63. FREITAS, A. 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*, v. 49, n. 3, p. 925–931, mar. 2011.
64. FREITAS, A. R. *et al.* Microevolutionary Events Involving Narrow Host Plasmids Influences Local Fixation of Vancomycin-Resistance in *Enterococcus* Populations. *PLoS ONE*, v. 8, n. 3, p. e60589, mar. 2013.
65. FU, Y. *et al.* High prevalence and plasmidome diversity of optrA-positive enterococci in a Shenzhen community, China. *Frontiers in Microbiology*, v. 15, p. 1505107, 2024.

66. GACA, A. O.; LEMOS, J. A. Adaptation to adversity: the intermingling of stress tolerance and pathogenesis in enterococci. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 83, n. 3, p. e00008-19, 21 ago. 2019.
67. GALIMAND, M. *et al.* Intrinsic resistance to aminoglycosides in *Enterococcus faecium* is conferred by the 16S rRNA m5C1404-specific methyltransferase EfmM. *RNA*, v. 17, n. 2, p. 251–262, 2 jan. 2011.
68. GALLOWAY-PEÑA, J. *et al.* Genomic and SNP Analyses Demonstrate a Distant Separation of the Hospital and Community-Associated Clades of *Enterococcus faecium*. *PLoS ONE*, v. 7, n. 1, p. e30187, jan. 2012.
69. GAO, W.; HOWDEN, B. P.; STINEAR, T. P. Evolution of virulence in *Enterococcus faecium*, a hospital-adapted opportunistic pathogen. *Current Opinion in Microbiology*, v. 41, p. 76–82, 2018.
70. GARCIA-MIGURA, L.; HASMAN, H.; JENSEN, L. B. Presence of pRI1: a small cryptic mobilizable plasmid isolated from *Enterococcus faecium* of human and animal origin. *Current Microbiology*, v. 58, p. 95–100, 2009.
71. GARCÍA-SOLACHE, M.; RICE, L. B. The *Enterococcus*: a model of adaptability to its environment. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 32, n. 2, p. e00058-18, 2019.
72. GARCILLÁN-BARCIA, M. P. *et al.* The Facts and Family Secrets of Plasmids That Replicate via the Rolling-Circle Mechanism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 86, n. 1, p. e00222-20, mar. 2022.
73. GARCILLÁN-BARCIA, M. P.; REDONDO-SALVO, S.; DE LA CRUZ, F. Plasmid classifications. *Plasmid*, v. 126, p. 102684, mai. 2023.
74. GHOSH, A.; DOWD, S. E.; ZUREK, L. Dogs leaving the ICU carry a very large multi-drug resistant enterococcal population with capacity for biofilm formation and horizontal gene transfer. *PLoS One*, v. 6, n. 7, p. e22451, 2011.
75. GILMORE, M. S. *et al.* Enterococcal Virulence. In: *The Enterococci*. [S.l.]: John Wiley & Sons, Ltd, 2002. p. 301–354.
76. GILMORE, M. S. *et al.* Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *Journal of Bacteriology*, v. 176, n. 23, p. 7335–7344, 1994.
77. GILMORE, M. S.; LEBRETON, F.; VAN SCHAİK, W. Genomic transition of enterococci from gut commensals to leading causes of multidrug-resistant hospital infection in the antibiotic era. *Current Opinion in Microbiology*, v. 16, n. 1, p. 10–16, fev. 2013.
78. GIPSON, K. S.; NICKERSON, K. P.; DENRKARD, E.; LLANOS-CHEA, A.; DOGIPARTHI, S. K.; LANTER, B. B.; HIBBLER, R. M.; YONKER, L. M.; HURLEY, B. P.; FAHERTY, C. S. The Great ESKAPE: Exploring the Crossroads of Bile and Antibiotic Resistance in Bacterial Pathogens. *Infect. Immun.*, v. 88, 2020.
79. GOMEZ, J. A. L. *et al.* A multiresistance megaplasmid pLG1 bearing a hylEfm genomic island in hospital *Enterococcus faecium* isolates. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 301, n. 2, p. 165–175, 2011.
80. GOULIOURIS, T. *et al.* Genomic Surveillance of *Enterococcus faecium* Reveals Limited Sharing of Strains and Resistance Genes between Livestock and Humans in the United Kingdom. *mBio*, v. 9, n. 6, p. e01780-18, dez. 2018.
81. GRIFFIN, P. M. *et al.* Use of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry to identify vancomycin-resistant enterococci and investigate the epidemiology of an outbreak. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 50, n. 9, p. 2918–2931, 2012.
82. GROHMANN, E. *et al.* Type IV secretion in Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology*, v. 107, n. 4, p. 455–471, fev. 2018.
83. GUZMAN PRIETO, A. M. *et al.* Global emergence and dissemination of enterococci as nosocomial pathogens: Attack of the Clones? *Frontiers in Microbiology*, v. 7, 2016.
84. GUZMÁN PRIETO, A. M.; WIJNGAARDEN, J.; BRAAT, J. C. *et al.* The two-component system ChtRS contributes to chlorhexidine tolerance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 61, n. 5, p. 10-1128, 2017.
85. HALL, J. P. J. *et al.* What makes a megaplasmid? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 377, n. 1842, p. 20200472, jan. 2022.

86. HALVORSEN, E. M. *et al.* Txe, an endoribonuclease of the enterococcal Axe–Txe toxin–antitoxin system, cleaves mRNA and inhibits protein synthesis. *Microbiology*, v. 157, n. 2, p. 387–397, fev. 2011.
87. HARRISON, E. *et al.* Parallel Compensatory Evolution Stabilizes Plasmids across the Parasitism-Mutualism Continuum. *Current Biology*, v. 25, n. 15, p. 2034–2039, ago. 2015.
88. HARRISON, E.; BROCKHURST, M. A. Plasmid-mediated horizontal gene transfer is a coevolutionary process. *Trends in Microbiology*, v. 20, n. 6, p. 262–267, jun. 2012.
89. HASMAN, H. The tcrB gene is part of the tcrYAZB operon conferring copper resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Microbiology*, v. 151, n. 9, p. 3019–3025, set. 2005.
90. HASMAN, H.; AARESTROP, F. M. tcrB, a Gene Conferring Transferable Copper Resistance in *Enterococcus faecium*: Occurrence, Transferability, and Linkage to Macrolide and Glycopeptide Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, n. 5, p. 1410–1416, mai. 2002.
91. HAYES, F. Toxins-Antitoxins: Plasmid Maintenance, Programmed Cell Death, and Cell Cycle Arrest. *Science*, v. 301, n. 5639, p. 1496–1499, set. 2003.
92. HE, S. *et al.* Insertion Sequence IS26 Reorganizes Plasmids in Clinically Isolated Multidrug-Resistant Bacteria by Replicative Transposition. *mBio*, v. 6, n. 3, p. e00762-15, jul. 2015.
93. HEGSTAD, K. *et al.* Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 16, n. 6, p. 541–554, jun. 2010.
94. HEIKENS, E. *et al.* Contribution of the enterococcal surface protein *Esp* to pathogenesis of *Enterococcus faecium* endocarditis. *Microbes and Infection*, v. 13, n. 14–15, p. 1185–1190, 2011.
95. HENDRICKX, A. P. A. *et al.* Differential PilA pilus assembly by a hospital-acquired and a community-derived *Enterococcus faecium* isolate. *Microbiology*, v. 156, n. 9, p. 2649–2659, 1 set. 2010.
96. HENDRICKX, A. P. A. *et al.* Expression of two distinct types of pili by a hospital-acquired *Enterococcus faecium* isolate. *Microbiology*, v. 154, n. 10, p. 3212–3223, 1 out. 2008.
97. HOBMAN, J. L.; CROSSMAN, L. C. Bacterial antimicrobial metal ion resistance. *Journal of Medical Microbiology*, v. 64, n. 5, p. 471–497, 1 maio 2015.
98. HOLLENBECK, B. L.; RICE, L. B. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence*, v. 3, n. 5, p. 421–569, 15 ago. 2012.
99. HOMAN, W. L. *et al.* Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 6, p. 1963–1971, 2002.
100. HOURIGAN, D. *et al.* Promiscuous, persistent and problematic: insights into current enterococcal genomics to guide therapeutic strategy. *BMC Microbiology*, v. 24, n. 1, p. 103, mar. 2024.
101. HOUSTON, T.; MCOLOY, J. The relation of the *Enterococcus* to "trench fever" and allied conditions. *The Lancet*, v. 188, n. 4858, p. 632–638, 1916.
102. HUYCKE, M. M.; SAHM, D. F.; GILMORE, M. S. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerging Infectious Diseases*, v. 4, n. 2, p. 239, 1998.
103. ISLAM, M. *et al.* Vancomycin Resistance in *Enterococcus faecium* from the Dallas, Texas, Area Is Conferred Predominantly on pRUM-Like Plasmids. *mSphere*, v. 8, n. 2, p. e00024-23, abr. 2023.
104. JENSEN, L. B. *et al.* A classification system for plasmids from enterococci and other Gram-positive bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, v. 80, n. 1, p. 25–43, jan. 2010.
105. JOHANSSON, M. H. K. *et al.* Detection of mobile genetic elements associated with antibiotic resistance in *Salmonella enterica* using a newly developed web tool: MobileElementFinder. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 76, n. 1, p. 101–109, jan. 2021.
106. JOHNSON, C. N. *et al.* Let Me Upgrade You: Impact of Mobile Genetic Elements on Enterococcal Adaptation and Evolution. *Journal of Bacteriology*, v. 203, n. 21, p. e00177-21, out. 2021.
107. JOLLEY, K. A.; BRAY, J. E.; MAIDEN, M. C. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Research*, v. 3, 2018.
108. JONAS, B. M.; MURRAY, B. E.; WEINSTOCK, G. M. Characterization of emeA, a norA Homolog and Multidrug Resistance Efflux Pump, in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, n. 12, p. 3574–3579, dez. 2001.
109. JONES, I. A.; JOSHI, L. T. Biocide Use in the Antimicrobial Era: A Review. *Molecules*, v. 26, n. 8, p. 2276, 14 abr. 2021.

110. KALINA, A. P. The taxonomy and nomenclature of enterococci. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 20, n. 2, p. 185–189, 1970.
111. KARIYAMA, R. *et al.* In-vitro activity of the combination of ampicillin and arbekacin against high-level gentamicin-resistant enterococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 42, n. 6, p. 836–838, 1 dez. 1998.
112. KARLSSON, P. A. *et al.* Heterogeneity and Metabolic Diversity among *Enterococcus* Species during Long-term Colonization. *bioRxiv*, p. 2024.10.18.619042, 2024.
113. KIM, D. S. *et al.* The *fms21 (pila)-fms20* locus encoding one of four distinct pili of *Enterococcus faecium* is harboured on a large transferable plasmid associated with gut colonization and virulence. *Journal of Medical Microbiology*, v. 59, n. 4, p. 505–507, 1 abr. 2010.
114. KIM, E. B.; MARCO, M. L. Nonclinical and Clinical *Enterococcus faecium* Strains, but Not *Enterococcus faecalis* Strains, Have Distinct Structural and Functional Genomic Features. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 80, n. 1, p. 154–165, jan. 2014.
115. KLARE, I. *et al.* Spread of ampicillin/vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* of the epidemic-virulent clonal complex-17 carrying the genes *esp* and *hyl* in German hospitals. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 24, n. 12, p. 815–825, dez. 2005.
116. KOHLER, V.; VAISHAMPAYAN, A.; GROHMANN, E. Broad-host-range Inc18 plasmids: occurrence, spread and transfer mechanisms. *Plasmid*, v. 99, p. 11–21, 2018.
117. KRAWCZYK, P. S.; LIPINSKI, L.; DZIEMBOWSKI, A. PlasFlow: predicting plasmid sequences in metagenomic data using genome signatures. *Nucleic Acids Research*, v. 46, n. 6, p. e35, abr. 2018.
118. KRISTICH, C. J.; RICE, L. B.; ARIAS, C. A. Enterococcal infection—treatment and antibiotic resistance. In: *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection*. [S.l.], 2014. [Internet].
119. KUCH, A. *et al.* Insight into antimicrobial susceptibility and population structure of contemporary human *Enterococcus faecalis* isolates from Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 67, n. 3, p. 551–558, 2012.
120. KURENBACH, B. *et al.* Intergeneric transfer of the *Enterococcus faecalis* plasmid pIP501 to *Escherichia coli* and *Streptomyces lividans* and sequence analysis of its *tra* region. *Plasmid*, v. 50, n. 1, p. 86–93, 2003.
121. KWONG, J. C. *et al.* Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology. *Pathology*, v. 47, n. 3, p. 199–210, 2015.
122. LANCEFIELD, R. C. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *Journal of Experimental Medicine*, v. 57, n. 4, p. 571–595, 1933.
123. LANZA, V. F. *et al.* The Plasmidome of Firmicutes: Impact on the Emergence and the Spread of Resistance to Antimicrobials. *Microbiology Spectrum*, v. 3, n. 2, p. 3.2.24, abr. 2015.
124. LARSEN, M. V. *et al.* Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 50, n. 4, p. 1355–1361, 2012.
125. LAVILLA LERMA, L. *et al.* Role of EfrAB efflux pump in biocide tolerance and antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from traditional fermented foods and the effect of EDTA as EfrAB inhibitor. *Food Microbiology*, v. 44, p. 249–257, dez. 2014.
126. LEAVIS, H. *et al.* A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the *esp* virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. *Journal of Bacteriology*, v. 186, n. 3, p. 672–682, 2004.
127. LEAVIS, H. L. *et al.* Insertion sequence–driven diversification creates a globally dispersed emerging multiresistant subspecies of *E. faecium*. *PLoS Pathogens*, v. 3, n. 1, p. e7, 2007.
128. LEBRETON, F. *et al.* Emergence of Epidemic Multidrug-Resistant *Enterococcus faecium* from Animal and Commensal Strains. *mBio*, v. 4, n. 4, p. e00534-13, ago. 2013.
129. LEBRETON, F. *et al.* Tracing the enterococci from Paleozoic origins to the hospital. *Cell*, v. 169, n. 5, p. 849–861.e13, 2017.
130. LEE, E.-W. *et al.* EfrAB, an ABC Multidrug Efflux Pump in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, n. 12, p. 3733–3738, dez. 2003.
131. LEE, T. *et al.* Antimicrobial-resistant CC17 *Enterococcus faecium*: The past, the present and the future. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, v. 16, p. 36–47, mar. 2019.

132. LEMIRE, J. A.; HARRISON, J. J.; TURNER, R. J. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nature Reviews Microbiology*, v. 11, n. 6, p. 371–384, jun. 2013.
133. LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research*, v. 49, n. W1, p. W293–W296, jul. 2021.
134. LISTER, J. *The antiseptic system and a new method of treating compound fracture, abscess, etc.* 1867. p. 257; 326; 387; 507.
135. LIU, B. *et al.* VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic Acids Research*, v. 47, n. D1, p. D687–D692, jan. 2019.
136. LOWE, A. M.; LAMBERT, P. A.; SMITH, A. W. Cloning of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen: homology with adhesins from some oral streptococci. *Infection and Immunity*, v. 63, n. 2, p. 703–706, 1995.
137. MACCALLUM, W. G.; HASTINGS, T. W. A case of acute endocarditis caused by *Micrococcus zymogenes* (nov. spec.), with a description of the microorganism. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 4, n. 5–6, p. 521–534, 1899.
138. MAHILLON, J.; CHANDLER, M. Insertion sequences. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 62, n. 3, p. 725–774, 1998.
139. MAILLARD, J.-Y. Antimicrobial biocides in the healthcare environment: efficacy, usage, policies, and perceived problems. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, [S.l.], [s.d.].
140. MAILLARD, J.-Y. Resistance of Bacteria to Biocides. *Microbiology Spectrum*, v. 6, n. 2, p. 6.2.19, 6 abr. 2018.
141. MAILLARD, J.-Y.; PASCOE, M. Disinfectants and antiseptics: mechanisms of action and resistance. *Nature Reviews Microbiology*, v. 22, n. 1, p. 4–17, jan. 2024.
142. MANSON, J. M.; HANCOCK, L. E.; GILMORE, M. S. Mechanism of chromosomal transfer of *Enterococcus faecalis* pathogenicity island, capsule, antimicrobial resistance, and other traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 27, p. 12269–12274, 2010.
143. MARACCINI, P. A.; FERGUSON, D. M.; BOEHM, A. B. Diurnal Variation in *Enterococcus* Species Composition in Polluted Ocean Water and a Potential Role for the Enterococcal Carotenoid in Protection against Photoinactivation. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 78, n. 2, p. 305–310, 15 jan. 2012.
144. MCBRIDE, S. M. *et al.* Genetic Diversity among *Enterococcus faecalis*. *PLoS ONE*, v. 2, n. 7, p. e582, jul. 2007.
145. MCGINNIS, S.; MADDEN, T. L. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Research*, v. 32, n. Web Server issue, p. W20–W25, jul. 2004.
146. MEIER-KOLTHOFF, J. P.; GÖKER, M. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nature Communications*, v. 10, n. 1, p. 2182, mai. 2019.
147. MIKALSEN, T. *et al.* Investigating the mobilome in clinically important lineages of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *BMC Genomics*, v. 16, n. 1, p. 282, dez. 2015.
148. MILLAN, A. S. *et al.* Positive selection and compensatory adaptation interact to stabilize non-transmissible plasmids. *Nature Communications*, v. 5, n. 1, p. 5208, out. 2014.
149. MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In: 2010 Gateway Computing Environments Workshop (GCE). New Orleans, LA, USA: IEEE, nov. 2010.
150. MILLER, W. R. *et al.* Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, v. 12, n. 10, p. 1221–1236, out. 2014.
151. MILLER, W. R. *et al.* Vancomycin-resistant enterococci: therapeutic challenges in the 21st century. *Infectious Disease Clinics*, v. 30, n. 2, p. 415–439, 2016.
152. MOURÃO, J. *et al.* Relevance of tcrYAZB operon acquisition for *Enterococcus* survival at high copper concentrations under anaerobic conditions: Table 1. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 71, n. 2, p. 560–563, fev. 2016.
153. MOUSTAFA, A. M.; LAL, A.; PLANET, P. J. Comparative genomics in infectious disease. *Current Opinion in Microbiology*, v. 53, p. 61–70, 2020.
154. MÜLLER, T. *et al.* Identification of plant-associated enterococci. *Journal of Applied Microbiology*, v. 91, n. 2, p. 268–278, 2001.

155. MUNDT, J. O. Occurrence of enterococci in animals in a wild environment. *Applied Microbiology*, v. 11, n. 2, p. 136–140, 1963.
156. MUNITA, J. M. *et al.* Correlation between Mutations in *liaFSR* of *Enterococcus faecium* and MIC of Daptomycin: Revisiting Daptomycin Breakpoints. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, n. 8, p. 4354–4359, ago. 2012.
157. MURRAY, L. M. *et al.* Co-selection for antibiotic resistance by environmental contaminants. *npj Antimicrobials and Resistance*, v. 2, n. 1, p. 9, abr. 2024.
158. NAKAYAMA, J. *et al.* Revised model for *Enterococcus faecalis* *fsr* quorum-sensing system: the small open reading frame *fsrD* encodes the gelatinase biosynthesis-activating pheromone propeptide corresponding to staphylococcal *agrD*. *Journal of Bacteriology*, v. 188, n. 23, p. 8321–8326, 2006.
159. NI, A. H.; HUYSCKE, M. M. Enterococcal disease, epidemiology, and implications for treatment. 2014.
160. NOBLE, W. C. *et al.* Gentamicin resistance gene transfer from *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* to *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus*. *Veterinary Microbiology*, v. 52, n. 1–2, p. 143–152, 1996.
161. NORMAN, A.; HANSEN, L. H.; SØRENSEN, S. J. Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 364, n. 1527, p. 2275–2289, ago. 2009.
162. NOSKIN, G. A. *et al.* High-Level Gentamicin Resistance in *Enterococcus faecalis* Bacteremia. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 164, n. 6, p. 1212–1215, 1 dez. 1991.
163. NRIAGU, J. O. A history of global metal pollution. *Science*, v. 272, n. 5259, p. 223, 12 abr. 1996.
164. NUCIFORA, G. *et al.* Cadmium resistance from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258 *cadA* gene results from a cadmium-efflux ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 86, n. 10, p. 3544–3548, 1989.
165. OGER, C.; MAHILLON, J.; PETIT, F. Distribution and diversity of a cadmium resistance (*cadA*) determinant and occurrence of IS257 insertion sequences in *Staphylococcal* bacteria isolated from a contaminated estuary (Seine, France). *FEMS Microbiology Ecology*, v. 43, n. 2, p. 173–183, mar. 2003.
166. OGURA, T.; HIRAGA, S. Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 80, n. 15, p. 4784–4788, ago. 1983.
167. OLSON, R. D. *et al.* Introducing the Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC): a resource combining PATRIC, IRD and ViPR. *Nucleic Acids Research*, v. 51, n. D1, p. D678–D689, jan. 2023.
168. ORLA-JENSEN, S. *The lactic acid bacteria*. v. 3. [S.l.]: Høst, 1919.
169. OSINKA, A.; PASTERNAK, K. Mercury in medicine and health service. *Journal of Elementology*, n. 1/2014, 18 abr. 2014.
170. OTT, E.-M. *et al.* Population dynamics and antagonistic potential of enterococci colonizing the phyllosphere of grasses. *Journal of Applied Microbiology*, v. 91, n. 1, p. 54–66, 2001.
171. PAGANELLI, F. L.; WILLEMS, R. J.; LEAVIS, H. L. Optimizing future treatment of enterococcal infections: attacking the biofilm? *Trends in Microbiology*, v. 20, n. 1, p. 40–49, 2012.
172. PAGE, A. J. *et al.* Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*, v. 31, n. 22, p. 3691–3693, nov. 2015.
173. PAL, C. *et al.* BacMet: antibacterial biocide and metal resistance genes database. *Nucleic Acids Research*, v. 42, n. D1, p. D737–D743, jan. 2014.
174. PAL, C. *et al.* Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. *BMC Genomics*, v. 16, n. 1, p. 964, dez. 2015.
175. PAL, C. *et al.* Metal Resistance and Its Association With Antibiotic Resistance. In: *Advances in Microbial Physiology*, v. 70, p. 261–313, 2017. [S.l.]: Elsevier.
176. PALMER, K. L.; GILMORE, M. S. Multidrug-Resistant Enterococci Lack CRISPR-cas. *mBio*, v. 1, n. 4, p. e00227-10, out. 2010.
177. PARK, S. Y. *et al.* Immune evasion of *Enterococcus faecalis* by an extracellular gelatinase that cleaves C3 and iC3b. *The Journal of Immunology*, v. 181, n. 9, p. 6328–6336, 2008.
178. PARTE, A. C. *et al.* List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 70, n. 11, p. 5607–5612, 2020.

179. PARTRIDGE, S. R. *et al.* Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 31, n. 4, p. e00088-17, out. 2018.
180. PASQUAROLI, S. *et al.* Erythromycin- and copper-resistant *Enterococcus hirae* from marine sediment and co-transfer of erm(B) and tcrB to human *Enterococcus faecalis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 80, n. 1, p. 26–28, set. 2014.
181. PATTI, J. M.; HÖÖK, M. Microbial adhesins recognizing extracellular matrix macromolecules. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 6, n. 5, p. 752–758, 1994.
182. PAULSEN, I. T. *et al.* Role of Mobile DNA in the Evolution of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis*. *Science*, v. 299, n. 5615, p. 2071–2074, 28 mar. 2003.
183. PAZOLES, J. *et al.* *Enterococcus faecalis* multi-drug resistance transporters: application for antibiotic discovery. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, v. 3, n. 2, p. 179–184, 2001.
184. PEDICORD, V. A. *et al.* Exploiting a host-commensal interaction to promote intestinal barrier function and enteric pathogen tolerance. *Science Immunology*, v. 1, n. 3, p. eaai7732, 2016.
185. PENAS, P. P. *et al.* Analysis of genetic lineages and their correlation with virulence genes in *Enterococcus faecalis* clinical isolates from root canal and systemic infections. *Journal of Endodontics*, v. 39, n. 7, p. 858–864, 2013.
186. PENG, Z. *et al.* Antimicrobial-Resistant Evolution and Global Spread of *Enterococcus faecium* Clonal Complex (CC) 17: Progressive Change from Gut Colonization to Hospital-Adapted Pathogen. *China CDC Weekly*, v. 4, n. 2, p. 17–21, 2022.
187. PEREIRA, A. P. *et al.* Current insights into the effects of cationic biocides exposure on *Enterococcus* spp. *Frontiers in Microbiology*, v. 15, p. 1392018, 2024.
188. PEREIRA, A. P. *et al.* Evolution of Chlorhexidine Susceptibility and of the EfrEF Operon among *Enterococcus faecalis* from Diverse Environments, Clones, and Time Spans. *Microbiology Spectrum*, v. 10, n. 4, p. e01176-22, 2022.
189. PESESKY, M. W.; TILLEY, R.; BECK, D. A. C. Mosaic plasmids are abundant and unevenly distributed across prokaryotic taxa. *Plasmid*, v. 102, p. 10–18, mar. 2019.
190. PIDOT, S. J. *et al.* Increasing tolerance of hospital *Enterococcus faecium* to handwash alcohols. *Science Translational Medicine*, v. 10, n. 452, 2018.
191. POOLE, K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 56, n. 1, p. 20–51, 1 jul. 2005.
192. PORTILLO, A.; RUIZ-LARREA, F.; ZARAZAGA, M.; ALONSO, A.; MARTÍNEZ, J. L.; TORRES, C. Macrolide resistance genes in *Enterococcus* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 44, n. 4, p. 967–971, abr. 2000.
193. QIN, X. *et al.* Complete genome sequence of *Enterococcus faecium* strain TX16 and comparative genomic analysis of *Enterococcus faecium* genomes. *BMC Microbiology*, v. 12, n. 1, p. 135, dez. 2012.
194. QUINONES, D.; KOBAYASHI, N.; NAGASHIMA, S. Molecular epidemiologic analysis of *Enterococcus faecalis* isolates in Cuba by multilocus sequence typing. *Microbial Drug Resistance*, v. 15, n. 4, p. 287–293, 2009.
195. REBELO, A. *et al.* Diversity of metal and antibiotic resistance genes in *Enterococcus* spp. from the last century reflects multiple pollution and genetic exchange among phyla from overlapping ecosystems. *Science of The Total Environment*, v. 787, p. 147548, set. 2021.
196. REBELO, A. *et al.* *Enterococcus* spp. from chicken meat collected 20 years apart overcome multiple stresses occurring in the poultry production chain: Antibiotics, copper and acids. *International Journal of Food Microbiology*, v. 384, p. 109981, jan. 2023.
197. RICE, L. B. *et al.* Role of class A penicillin-binding proteins in the expression of β -lactam resistance in *Enterococcus faecium*. *Journal of Bacteriology*, v. 191, n. 11, p. 3649–3656, 2009.
198. RICE, L. B. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 197, n. 8, p. 1079–1081, 15 abr. 2008.
199. RIDENHOUR, B. J. *et al.* Persistence of antibiotic resistance plasmids in bacterial biofilms. *Evolutionary Applications*, v. 10, n. 6, p. 640–647, jul. 2017.

200. RIESCO, R.; TRUJILLO, M. E. Update on the proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 74, n. 3, 21 mar. 2024.
201. RIOS, R. *et al.* Genomic Epidemiology of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* (VREfm) in Latin America: Revisiting The Global VRE Population Structure. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 5636, mar. 2020.
202. RODRÍGUEZ-BELTRÁN, J. *et al.* Beyond horizontal gene transfer: the role of plasmids in bacterial evolution. *Nature Reviews Microbiology*, v. 19, n. 6, p. 347–359, jun. 2021.
203. ROSVOLL, T. C. S. *et al.* Increased high-level gentamicin resistance in invasive *Enterococcus faecium* is associated with *aac(6)Ie-aph(2'')Ia*-encoding transferable megaplasmids hosted by major hospital-adapted lineages. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, v. 66, n. 2, p. 166–176, nov. 2012.
204. ROSVOLL, T. C. S. *et al.* 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 & Medical Microbiology*, v. 58, n. 2, p. 254–268, mar. 2010.
205. RUHAL, R. *et al.* Biofilm-specific determinants of enterococci pathogen. *Archives of Microbiology*, v. 206, n. 10, p. 397, out. 2024.
206. RUIZ-GARBAJOSA, P. *et al.* Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of recombination. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 6, p. 2220–2228, 2006.
207. SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed Research International*, v. 2016, p. 2475067, 5 maio 2016.
208. SANTOS, B. A. *et al.* Major globally disseminated clonal complexes of antimicrobial resistant enterococci associated with infections in cancer patients in Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 55, p. 56–62, nov. 2017.
209. SCHLEIFER, K. H.; KILPPER-BÄLZ, R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 34, n. 1, p. 31–34, 1984.
210. SCHNAPPINGER, D.; HILLEN, W. Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. *Archives of Microbiology*, v. 165, n. 6, p. 359–369, 24 jun. 1996.
211. SCHWARZ, F. V.; PERRETEN, V.; TEUBER, M. Sequence of the 50-kb conjugative multiresistance plasmid pRE25 from *Enterococcus faecalis* RE25. *Plasmid*, v. 46, n. 3, p. 170–187, 2001.
212. SCHWARZ, S. *et al.* Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 28, n. 5, p. 519–542, nov. 2004.
213. SCHWARZ, S.; CARDOSO, M.; WEGENER, H. C. Nucleotide sequence and phylogeny of the tet(L) tetracycline resistance determinant encoded by plasmid pSTE1 from *Staphylococcus hyicus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 36, n. 3, p. 580–588, mar. 1992.
214. SEEMANN, T. Abricate. GitHub, [s.d.].
215. SEEMANN, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics (Oxford, England)*, v. 30, n. 14, p. 2068–2069, jul. 2014.
216. SILVEIRA, E. *et al.* Co-transfer of resistance to high concentrations of copper and first-line antibiotics among *Enterococcus* from different origins (humans, animals, the environment and foods) and clonal lineages. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 69, n. 4, p. 899–906, abr. 2014.
217. SKIVE, B. *et al.* Survival of hospital- and community-associated *Enterococcus faecium* following exposure to in-use concentrations of the biocide sodium dichloroisocyanurate (NaDCC). *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, v. 29, p. 281–288, 2022.
218. SOARES, R. O. *et al.* Correlation between biofilm formation and *gelE*, *esp*, and *agg* genes in *Enterococcus* spp. clinical isolates. *Virulence*, v. 5, n. 5, p. 634–637, 2014.
219. SOBHANIPOOR, M. H. *et al.* Determination of efflux activity in Enterococci by Hoechst accumulation assay and the role of zinc oxide nanoparticles in inhibition of this activity. *BMC Microbiology*, v. 22, n. 1, p. 195, 2022.

220. SOBHANIPOOR, M. H. *et al.* Reduced Susceptibility to Biocides among Enterococci from Clinical and Non-Clinical Sources. *Infection & Chemotherapy*, v. 53, n. 4, p. 696, 2021.
221. SOGE, O. O. *et al.* A novel transposon, Tn6009, composed of a Tn916 element linked with a *Staphylococcus aureus* mer operon. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 62, n. 4, p. 674–680, 2008.
222. SOLHEIM, M. *et al.* Comparative genomic analysis reveals significant enrichment of mobile genetic elements and genes encoding surface structure-proteins in hospital-associated clonal complex 2 *Enterococcus faecalis*. *BMC Microbiology*, v. 11, p. 1–12, 2011.
223. STALDER, T. *et al.* Emerging patterns of plasmid-host coevolution that stabilize antibiotic resistance. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 4853, jul. 2017.
224. STALDER, T. *et al.* Evolving Populations in Biofilms Contain More Persistent Plasmids. *Molecular Biology and Evolution*, v. 37, n. 6, p. 1563–1576, jun. 2020.
225. STAMATAKIS, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, v. 30, n. 9, p. 1312–1313, mai. 2014.
226. STEEMERS, F. J.; GUNDERSON, K. L. Illumina, Inc. *Pharmacogenomics*, v. 6, n. 7, p. 777–782, 2005.
227. STEGE, P. B. *et al.* Colonization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in human-derived colonic epithelium: unraveling the transcriptional dynamics of host–enterococcal interactions. *FEMS Microbes*, v. 5, p. xtae014, jan. 2024.
228. ŠVEC, P.; FRANZ, C. M. A. P. The genus *Enterococcus*. In: HOLZAPFEL, W. H.; WOOD, B. J. B. (Eds.). *Lactic Acid Bacteria*. 1. ed. [S.l.]: Wiley, 2014. p. 175–211.
229. SYED, A. K. *et al.* Triclosan promotes *Staphylococcus aureus* nasal colonization. *MBio*, v. 5, n. 2, p. 10.1128/mbio.01015-13, 2014.
230. TACCONELLI, E.; CATALDO, M. A. Vancomycin-resistant enterococci (VRE): transmission and control. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 31, n. 2, p. 99–106, 2008.
231. TEIXEIRA, L. M. *et al.* Enterococcus. In: DE FILIPPIS, I. (Ed.). *Molecular Typing in Bacterial Infections, Volume II*. Cham: Springer International Publishing, 2022. p. 131–145.
232. TENG, F. *et al.* An *Enterococcus faecium* secreted antigen, SagA, exhibits broad-spectrum binding to extracellular matrix proteins and appears essential for *E. faecium* growth. *Infection and Immunity*, v. 71, n. 9, p. 5033–5041, 2003.
233. TENSON, T.; LOVMAR, M.; EHRENBERG, M. The Mechanism of Action of Macrolides, Lincosamides and Streptogramin B Reveals the Nascent Peptide Exit Path in the Ribosome. *Journal of Molecular Biology*, v. 330, n. 5, p. 1005–1014, jul. 2003.
234. THIERCELIN, E.; JOUHAUD, L. Reproduction de l'enterocoque; taches centrales; granulations périphériques et microblastes. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie, Paris*, v. 55, p. 686–688, 1903.
235. THIERCELIN, M. E. Morphologie et modes de reproduction de l'enterocoque. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de ses Filiales*, v. 11, n. 11, p. 551–553, 1899.
236. THOMAS, V. C. *et al.* A fratricidal mechanism is responsible for eDNA release and contributes to biofilm development of *Enterococcus faecalis*. *Molecular Microbiology*, v. 72, n. 4, p. 1022–1036, 2009.
237. TOMITA, H.; LU, J.-J.; IKE, Y. High Incidence of Multiple-Drug-Resistant Pheromone-Responsive Plasmids and Transmissions of VanA-Type Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* between Livestock and Humans in Taiwan. *Antibiotics*, v. 12, n. 12, p. 1668, 2023.
238. TOP, J. *et al.* Ecological replacement of *Enterococcus faecalis* by multiresistant clonal complex 17 *Enterococcus faecium*. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 13, n. 3, p. 316–319, 2007.
239. VAN HAL, S. J. *et al.* The interplay between community and hospital *Enterococcus faecium* clones within health-care settings: a genomic analysis. *The Lancet Microbe*, v. 3, n. 2, p. e133–e141, fev. 2022.
240. VAN MELDEREN, L.; SAAVEDRA DE BAST, M. Bacterial Toxin–Antitoxin Systems: More Than Selfish Entities? *PLoS Genetics*, v. 5, n. 3, p. e1000437, mar. 2009.
241. VAN TYNE, D.; GILMORE, M. S. Friend Turned Foe: Evolution of Enterococcal Virulence and Antibiotic Resistance. *Annual Review of Microbiology*, v. 68, n. 1, p. 337–356, 2014.
242. VOGWILL, T.; MACLEAN, R. C. The genetic basis of the fitness costs of antimicrobial resistance: a meta-analysis approach. *Evolutionary Applications*, v. 8, n. 3, p. 284–295, 2015.

243. WANG, J.-L.; HSUEH, P.-R. Therapeutic options for infections due to vancomycin-resistant enterococci. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, v. 10, n. 5, p. 785–796, abr. 2009.
244. WANG, P. *et al.* Biological applications of copper-containing materials. *Bioactive Materials*, v. 6, n. 4, p. 916–927, abr. 2021.
245. WANG, X. *et al.* First Report of the Plasmid-mediated fosB Gene in *Enterococcus faecalis* from Pigs. *Genes*, v. 12, n. 11, p. 1684, out. 2021.
246. WEAVER, K. E. Enterococcal Genetics. *Microbiology Spectrum*, v. 7, n. 2, p. 7.2.11, abr. 2019.
247. WEAVER, K. E. *et al.* Functional analysis of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded stability determinant par. *Molecular Microbiology*, v. 20, n. 1, p. 53–63, 1996.
248. WEAVER, K. E. *et al.* The replicons of Gram-positive bacteria: A family of broadly distributed but narrow host range plasmids. *Plasmid*, v. 61, n. 2, p. 94–109, mar. 2009.
249. WEAVER, K. E.; RICE, L. B.; CHURCHWARD, G. Plasmids and Transposons. In: *The Enterococci*. [S.l.]: John Wiley & Sons, Ltd, 2002. p. 219–263.
250. WEI, Y.; PALACIOS ARAYA, D.; PALMER, K. L. *Enterococcus faecium*: evolution, adaptation, pathogenesis and emerging therapeutics. *Nature Reviews Microbiology*, v. 22, n. 11, p. 705–721, nov. 2024.
251. WENDT, C. *et al.* Survival of Vancomycin-Resistant and Vancomycin-Susceptible Enterococci on Dry Surfaces. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, n. 12, p. 3734–3736, dez. 1998.
252. WERNER, G. *et al.* Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Eurosurveillance*, v. 13, n. 47, 2008.
253. WIST, V. *et al.* Phenotypic and Genotypic Traits of Vancomycin-Resistant Enterococci from Healthy Food-Producing Animals. *Microorganisms*, v. 8, n. 2, p. 261, fev. 2020.
254. YAN, X. *et al.* Transcriptomic Response of *Enterococcus faecalis* V583 to Low Hydrogen Peroxide Levels. *Current Microbiology*, v. 70, n. 2, p. 156–168, fev. 2015.
255. YASUFUKU, T. *et al.* Mechanisms of and Risk Factors for Fluoroquinolone Resistance in Clinical *Enterococcus faecalis* Isolates from Patients with Urinary Tract Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 49, n. 11, p. 3912–3916, nov. 2011.
256. ZALIPOUR, M.; ESFAHANI, B. N.; HAVAEI, S. A. Phenotypic and genotypic characterization of glycopeptide, aminoglycoside and macrolide resistance among clinical isolates of *Enterococcus faecalis*: a multicenter based study. *BMC Research Notes*, v. 12, n. 1, p. 292, dez. 2019.
257. ZHANG, S. *et al.* Genome sequences of copper resistant and sensitive *Enterococcus faecalis* strains isolated from copper-fed pigs in Denmark. *Standards in Genomic Sciences*, v. 10, p. 1–10, 2015.
258. ZHANG, X. *et al.* A genetic element present on megaplasmids allows *Enterococcus faecium* to use raffinose as carbon source. *Environmental Microbiology*, v. 13, n. 2, p. 518–528, 2011.
259. ZHANG, X. *et al.* Evolution of satellite plasmids can prolong the maintenance of newly acquired accessory genes in bacteria. *Nature Communications*, v. 10, n. 1, p. 5809, dez. 2019.
260. ZHONG, Z. *et al.* Comparative genomic analysis of the genus *Enterococcus*. *Microbiological Research*, v. 196, p. 95–105, 2017.
261. ZSCHECK, K. K.; MURRAY, B. E. Evidence for a staphylococcal-like mercury resistance gene in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 34, n. 6, p. 1287–1289, jun. 1990.

Apêndice. Dados e métricas de 110 genomas de *Enterococcus faecium* e 60 genomas de *Enterococcus faecalis* incluídos no presente estudo

Amostra	Espécie	Ano de isolamento	ST	N. de acesso SRA	N. de contigs	Tamanho do genoma (Mb)	N50	Cobertura	GC%
CL1271	<i>E. faecium</i>	1994	ST18	-	148	2.82	83594	101x	37.80
CL1710	<i>E. faecium</i>	1995	ST22	-	41	2.63	306228	150x	37.85
CL2360	<i>E. faecium</i>	1996	ST958	-	83	2.75	134252	110x	37.79
CL2828	<i>E. faecium</i>	1997	ST948	-	84	2.74	96587	119x	37.92
CL5087	<i>E. faecium</i>	1999	ST54	-	44	2.72	185347	117x	37.92
CL5677	<i>E. faecium</i>	2002	ND	-	257	2.84	27994	133x	37.64
CL6259	<i>E. faecium</i>	2003	ST18	-	173	2.77	37061	82x	37.82
CL6322	<i>E. faecium</i>	2003	ST19	-	150	2.90	70950	50x	37.75
CL6583	<i>E. faecium</i>	2004	ND	-	165	2.87	55121	82x	37.73
CL6596	<i>E. faecium</i>	2004	ST78	-	342	2.78	13957	18x	37.80
CL6601	<i>E. faecium</i>	2004	ST907	-	69	2.60	126688	44x	37.93
CL6670	<i>E. faecium</i>	2004	ST78	-	165	2.87	54995	90x	37.71
CL6684	<i>E. faecium</i>	2004	ST78	-	175	2.89	51406	46x	37.71
CL6729	<i>E. faecium</i>	2005	ST78	-	181	2.96	38695	49x	37.72
CL6755a	<i>E. faecium</i>	2005	ST564	-	166	2.87	48397	109x	37.83
CL6787	<i>E. faecium</i>	2005	ST78	-	168	2.87	55121	83x	37.73
CL6802	<i>E. faecium</i>	2005	ST38	SRR15291471	59	2.75	131193	68x	37.76
CL6900	<i>E. faecium</i>	2005	ST78	-	172	2.88	40208	99x	37.45
CL6941	<i>E. faecium</i>	2005	ST78	-	167	2.87	56351	91x	37.73
CL6950	<i>E. faecium</i>	2005	ST610	-	103	2.56	101457	105x	38.04
CL6959	<i>E. faecium</i>	2005	ST78	-	170	2.96	56351	85x	37.41
CL6964	<i>E. faecium</i>	2005	ST288	-	341	2.80	16063	29x	37.80
CL7044	<i>E. faecium</i>	2006	ST18	-	554	2.71	7591	17x	37.85
CL7045	<i>E. faecium</i>	2006	ST78	-	158	2.85	55121	99x	37.74
CL7087a	<i>E. faecium</i>	2006	ST78	-	147	2.62	47273	56x	38.00
CL7093	<i>E. faecium</i>	2006	ST78	-	172	2.78	46530	26x	37.85
CL7133	<i>E. faecium</i>	2006	ST78	-	129	2.61	59833	88x	38.03
CL7153	<i>E. faecium</i>	2006	ST78	-	162	2.87	52144	62x	37.73
CL7197	<i>E. faecium</i>	2006	ST78	-	265	2.82	21890	15x	37.77
CL7220	<i>E. faecium</i>	2006	ST262	-	162	2.80	57894	80x	37.86
CL7388	<i>E. faecium</i>	2007	ST29	-	70	2.54	92781	93x	38.01
CL7435	<i>E. faecium</i>	2007	ST78	-	169	2.84	55121	87x	37.73
CL7448	<i>E. faecium</i>	2007	ST78	-	176	2.76	49555	45x	37.86
CL7611	<i>E. faecium</i>	2007	ST78	SRR13573646	169	2.84	55121	87x	37.73
CL7720b	<i>E. faecium</i>	2007	ST78	-	166	2.80	49307	73x	37.87
CL7880	<i>E. faecium</i>	2008	ST78	SRR15291470	164	2.80	39015	70x	37.83
CL7936b	<i>E. faecium</i>	2008	ST18	-	215	2.85	46557	72x	37.77

Amostra	Espécie	Ano de isolamento	ST	N. de acesso SRA	N. de contigs	Tamanho do genoma (Mb)	N50	Cobertura	GC%
CL8055	<i>E. faecium</i>	2008	ST78	-	234	2.81	34248	44x	37.91
CL8101	<i>E. faecium</i>	2008	ST 2293	-	78	2.44	79738	58x	38.06
CL8134a	<i>E. faecium</i>	2008	ST203	-	151	2.81	69136	65x	37.86
CL8191	<i>E. faecalis</i>	2008	ST6	SRR31370179	90	3.26	151885	76x	37.76
CL8192	<i>E. faecalis</i>	2008	ST6	SRR15291453	110	3.20	63612	52x	37.07
CL8216	<i>E. faecium</i>	2008	ST412	-	312	2.82	16542	11x	37.04
CL8226	<i>E. faecium</i>	2009	ST192	-	213	2.84	47876	101x	37.75
CL8267a	<i>E. faecium</i>	2009	ST412	-	183	2.89	50588	92x	37.74
CL8308	<i>E. faecium</i>	2009	ST412	-	188	2.97	47474	47x	37.72
CL8324	<i>E. faecium</i>	2009	ST412	SRR13573645	187	2.89	50366	100x	37.80
CL8340	<i>E. faecalis</i>	2009	ST30	SRR15291452	189	2.99	29711	32x	37.73
CL8348a	<i>E. faecalis</i>	2009	ST40	SRR15291451	83	3.01	89050	51x	37.17
CL8439	<i>E. faecium</i>	2009	ST192	SRR13573690	210	2.84	47474	81x	37.24
CL8450a	<i>E. faecium</i>	2009	ST412	-	187	2.89	48502	73x	37.74
CL8476	<i>E. faecium</i>	2009	ST78	SRR13573689	164	2.80	55121	91x	37.73
CL8527	<i>E. faecium</i>	2009	ST412	-	199	2.91	51810	122x	37.86
CL8539	<i>E. faecalis</i>	2009	ST6	SRR15291450	72	3.12	102784	39x	37.71
CL8540	<i>E. faecalis</i>	2009	ND	SRR15291449	87	3.26	114632	48x	37.11
CL8579	<i>E. faecium</i>	2009	ST1626	SRR13573688	186	2.77	37562	94x	37.07
CL8584b	<i>E. faecalis</i>	2009	ST6	SRR15291448	95	3.26	188832	65x	37.87
CL8585	<i>E. faecalis</i>	2009	ST6	SRR31370219	351	3.01	16359	36x	37.07
CL8592	<i>E. faecalis</i>	2009	ST6	SRR15291447	81	3.26	133495	60x	37.68
CL8593	<i>E. faecalis</i>	2009	ST6	SRR15291469	151	3.24	69231	68x	37.07
CL8655	<i>E. faecium</i>	2009	ST412	-	213	2.91	50710	81x	37.06
CL8682	<i>E. faecalis</i>	2009	ST769	SRR15291468	97	3.08	145564	90x	37.73
CL8714	<i>E. faecalis</i>	2009	ST769	SRR15291467	89	3.08	166847	74x	37.30
CL8738	<i>E. faecalis</i>	2010	ST21	SRR13573687	30	2.88	284416	209x	37.30
CL8750	<i>E. faecalis</i>	2010	ST16	SRR13573686	32	2.87	360446	179x	37.45
CL8780	<i>E. faecium</i>	2010	ST412	-	178	2.85	49891	88x	37.54
CL8790	<i>E. faecium</i>	2010	ST1628	SRR13573685	65	2.61	173367	103x	37.77
CL8793	<i>E. faecium</i>	2010	ST412	-	269	2.80	28881	62x	37.83
CL8797	<i>E. faecium</i>	2010	ST963	-	188	2.89	52103	90x	38.01
CL8917	<i>E. faecium</i>	2010	ST412	-	204	2.90	49891	127x	37.77
CL8924	<i>E. faecium</i>	2011	ST963	-	188	2.88	47931	101x	37.66
CL8986	<i>E. faecium</i>	2011	ST412	-	198	2.89	36748	95x	37.74
CL8988	<i>E. faecium</i>	2011	ST203	-	170	2.92	47464	87x	37.67
CL9162	<i>E. faecium</i>	2011	ST412	-	212	2.90	38485	88x	37.73
CL9166	<i>E. faecium</i>	2011	ST412	-	246	2.89	30950	61x	37.73
CL9172	<i>E. faecalis</i>	2011	ST21	SRR15291464	31	2.87	260309	158x	37.71

Amostra	Espécie	Ano de isolamento	ST	N. de acesso SRA	N. de contigs	Tamanho do genoma (Mb)	N50	Cobertura	GC%
CL9218	<i>E. faecium</i>	2012	ST412	-	197	2.89	36748	82x	37.68
CL9251	<i>E. faecium</i>	2012	ST116	-	109	3.00	83.147	91x	37.43
CL9263b	<i>E. faecium</i>	2012	ST412	-	202	2.92	33368	19x	37.73
CL9313	<i>E. faecium</i>	2013	ST963	-	197	2.77	30587	15x	37.95
CL9314	<i>E. faecalis</i>	2013	ST21	SRR15291463	39	2.89	270208	70x	37.77
CL9361	<i>E. faecium</i>	2013	ST963	-	187	2.81	51809	88x	37.83
CL9373	<i>E. faecium</i>	2013	ST885	-	99	2.68	81508	105x	37.42
CL9386	<i>E. faecium</i>	2013	ST963	-	175	2.81	51810	80x	37.77
CL9388	<i>E. faecium</i>	2013	ST844	-	208	2.88	53738	84x	37.92
CL9405	<i>E. faecium</i>	2013	ST844	-	211	2.89	58909	127x	37.81
CL9406	<i>E. faecium</i>	2013	ST844	SRR13573683	253	2.86	41801	79x	37.80
CL9458	<i>E. faecium</i>	2013	ST253	-	58	2.78	227579	188x	37.80
CL9540	<i>E. faecium</i>	2014	ST963	-	194	2.78	41801	94x	37.80
CL9583	<i>E. faecium</i>	2014	ST963	-	223	2.82	36748	91x	37.86
CL9552	<i>E. faecium</i>	2015	ST1762	-	193	2.79	44418	41x	37.82
CL9726	<i>E. faecium</i>	2015	ST963	SRR15291462	211	2.84	34790	123x	37.79
CL9727	<i>E. faecalis</i>	2015	ST6	SRR31370224	99	3.15	94015	54x	37.81
CL9732	<i>E. faecium</i>	2015	ST896	SRR15291461	222	2.88	32052	99x	37.80
CL9733	<i>E. faecalis</i>	2015	ST525	SRR31370225	104	3.13	178081	73x	37.31
CL9734	<i>E. faecium</i>	2015	ST412	-	222	2.88	30908	74x	37.81
CL9735	<i>E. faecium</i>	2015	ST896	-	225	2.82	31004	46x	37.22
CL9739	<i>E. faecium</i>	2015	ST896	-	222	2.88	30944	112X	37.84
CL9741	<i>E. faecalis</i>	2015	ST525	SRR31370227	108	3.14	150775	90X	38.01
CL9742	<i>E. faecium</i>	2015	ST963	-	204	2.81	44416	87x	37.80
CL9745	<i>E. faecalis</i>	2015	ST525	SRR15291460	124	3.17	172473	77x	37.16
CL9746	<i>E. faecium</i>	2015	ST963	-	210	2.83	34788	90x	37.85
CL9747	<i>E. faecium</i>	2015	ST963	-	208	2.86	38449	67x	37.16
CL9752	<i>E. faecalis</i>	2015	ST6	SRR15291458	97	3.22	101769	71x	37.80
CL9755	<i>E. faecium</i>	2015	ST963	-	197	2.81	41643	117X	37.81
CL9756	<i>E. faecium</i>	2015	ST896	-	216	2.86	31004	109x	37.12
CL9759	<i>E. faecium</i>	2015	ST412	-	241	2.87	29145	70x	37.79
CL9761	<i>E. faecalis</i>	2015	ST525	SRR31370228	107	3.14	121559	64x	37.82
CL9762	<i>E. faecium</i>	2015	ST963	-	208	2.81	44417	98x	37.70
CL9765	<i>E. faecalis</i>	2015	ST778	SRR31370292	141	3.17	150982	43x	37.36
CL9771	<i>E. faecalis</i>	2015	ST525	SRR31370299	105	2.98	83515	59x	37.81
CL9772	<i>E. faecalis</i>	2015	ST525	SRR31370368	123	3.16	201150	95X	37.21
CL9780	<i>E. faecalis</i>	2015	ST525	SRR31370446	130	3.18	150775	83X	37.59
CL9781	<i>E. faecium</i>	2015	ST963	-	226	2.81	33886	105X	37.19
CL9783	<i>E. faecalis</i>	2015	ST525	SRR13573681	137	3.16	177797	191X	37.15

Amostra	Espécie	Ano de isolamento	ST	N. de acesso SRA	N. de contigs	Tamanho do genoma (Mb)	N50	Cobertura	GC%
CL9785	<i>E. faecium</i>	2015	ST963	-	202	2.83	34524	122x	37.81
CL9787	<i>E. faecium</i>	2015	ST80	SRR13573679	224	2.97	40304	245X	37.12
CL9789	<i>E. faecium</i>	2015	ST896	-	253	2.88	30944	68x	37.81
CL9791	<i>E. faecalis</i>	2015	ST525	SRR13573678	148	3.18	150774	208X	37.67
CL9793	<i>E. faecium</i>	2015	ST963	SRR13573677	205	2.82	37106	187X	37.77
CL9794	<i>E. faecalis</i>	2015	ST525	SRR13573676	107	3.20	171083	140X	37.12
CL9797	<i>E. faecalis</i>	2015	ST525	SRR13573675	141	3.19	150775	208X	37.81
CL9800	<i>E. faecium</i>	2015	ST896	-	206	2.87	32232	50x	37.11
CL9804	<i>E. faecium</i>	2015	ST896	-	224	2.81	28330	105x	37.11
CL9806	<i>E. faecalis</i>	2015	ST525	SRR13573674	107	3.25	167300	199X	37.83
CL9809	<i>E. faecalis</i>	2015	ST525	SRR13573673	116	3.22	178093	193X	37.98
CL9813	<i>E. faecalis</i>	2015	ST778	SRR13573672	152	3.19	151138	222X	37.09
CL9815	<i>E. faecalis</i>	2015	ST778	SRR13573671	157	3.18	151122	143X	37.14
CL9816	<i>E. faecium</i>	2015	ST963	SRR13573670	198	2.86	45578	210X	37.22
CL9824	<i>E. faecalis</i>	2015	ST631	SRR13573668	25	2.64	1362542	243X	37.22
CL9825	<i>E. faecalis</i>	2015	ST6	SRR15291457	100	3.22	118054	98x	37.73
CL9826	<i>E. faecium</i>	2015	ND	-	191	2.81	47048	95x	37.71
CL9839	<i>E. faecium</i>	2015	ST97	-	71	2.48	89783	128x	37.15
CL9844	<i>E. faecalis</i>	2015	ST525	SRR13573667	112	3.25	171083	171X	37.81
CL9845	<i>E. faecalis</i>	2015	ST6	SRR13573666	91	3.18	118053	235X	38.08
CL9848	<i>E. faecium</i>	2015	ST896	-	224	2.89	31552	90x	37.09
CL9849	<i>E. faecalis</i>	2015	ST525	SRR13573665	115	3.15	178093	191X	37.21
CL9852	<i>E. faecalis</i>	2015	ST525	SRR13573664	86	3.17	178114	138X	37.79
CL9856	<i>E. faecium</i>	2015	ST896	-	235	2.83	28396	62x	37.15
CL9864	<i>E. faecalis</i>	2015	ST525	SRR13573663	110	3.25	167300	174X	37.14
CL9872	<i>E. faecium</i>	2015	ST896	SRR15291456	223	2.88	31553	69x	37.96
CL9882	<i>E. faecium</i>	2015	ST896	-	226	2.87	31004	74x	37.09
CL9896	<i>E. faecalis</i>	2015	ST6	SRR13573662	83	3.12	134611	156x	37.80
CL9904	<i>E. faecalis</i>	2015	ST6	SRR13573661	91	3.19	123650	206X	37.81
CL9905	<i>E. faecalis</i>	2015	ST525	SRR13573660	149	3.18	146561	180X	37.28
CL9906	<i>E. faecalis</i>	2015	ST6	SRR13573659	79	3.11	118053	209X	37.20
CL9918a	<i>E. faecalis</i>	2015	ST525	SRR31370458	93	3.15	146044	65x	37.12
CL9918b	<i>E. faecalis</i>	2015	ST525	SRR31370459	73	3.03	228836	76x	37.29
CL9918c	<i>E. faecalis</i>	2015	ST525	SRR31370464	117	3.17	146045	62x	37.16
CL9919	<i>E. faecalis</i>	2015	ST525	SRR13573657	152	3.18	145573	180X	37.30
CL9922	<i>E. faecalis</i>	2015	ST6	SRR13573655	148	3.33	130807	149X	37.11
CL9924	<i>E. faecalis</i>	2015	ST6	SRR13573654	83	3.25	130807	172X	37.12
CL10055	<i>E. faecium</i>	2016	ST963	-	225	2.81	34787	85x	37.05
CL1005a	<i>E. faecium</i>	2016	ST80	-	195	2.84	37172	80x	37.14

Amostra	Espécie	Ano de isolamento	ST	N. de acesso SRA	N. de contigs	Tamanho do genoma (Mb)	N50	Cobertura	GC%
CL1005b	<i>E. faecium</i>	2016	ST80	-	199	2.83	39015	75x	37.82
CL10189	<i>E. faecium</i>	2016	ST963	-	227	2.80	34152	80x	37.83
CL10395	<i>E. faecium</i>	2016	ST896	-	234	2.93	31553	88x	37.81
CL10484	<i>E. faecium</i>	2016	ST412	-	241	2.98	34792	71x	37.82
CL9943	<i>E. faecalis</i>	2016	ST4	SRR13573653	158	3.28	164884	219X	37.82
CL9944	<i>E. faecalis</i>	2016	ST778	SRR13573652	108	3.17	151144	212X	37.64
CL9947	<i>E. faecium</i>	2016	ST963	-	200	2.78	36802	90x	36.98
CL9952	<i>E. faecalis</i>	2016	ST525	SRR13573650	116	3.17	172473	149X	37.24
CL10955	<i>E. faecalis</i>	2017	ST525	SRR13573692	127	3.14	146561	176X	37.82
CL10995	<i>E. faecium</i>	2017	ST963	SRR13573691	192	2.89	42326	199X	37.16
CL11000	<i>E. faecium</i>	2017	ND	SRR13573680	86	2.44	67543	253X	37.15
CL11146	<i>E. faecalis</i>	2017	ND	SRR13573669	639	3.27	11741	190x	37.69
CL11199	<i>E. faecalis</i>	2017	ST778	SRR13573658	113	3.25	151131	268X	38.20
CL11247	<i>E. faecalis</i>	2017	ST525	SRR13573649	152	3.18	150774	238X	36.97
CL11268	<i>E. faecalis</i>	2017	ST525	SRR13573648	138	3.25	150775	193X	37.19
CL11322	<i>E. faecalis</i>	2017	ST6	SRR31369121	160	3.15	130853	86X	37.12

Legenda: *Sequence Type* (ST); *Sequence Read Archive* (SRA); Número (N); Megabase (Mb); Guanina-Citosina (GC).