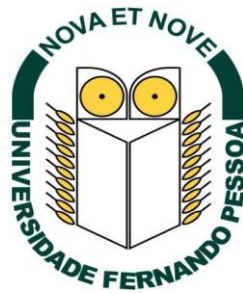


Mariana Vilhena Barros

Infeções Nosocomiais por *Enterococcus faecalis*

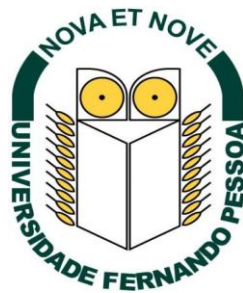


Universidade Fernando Pessoa
Faculdade Ciências da Saúde

Porto, 2014

Mariana Vilhena Barros

Infeções Nosocomiais por *Enterococcus faecalis*



Universidade Fernando Pessoa
Faculdade Ciências da Saúde

Porto, 2014

Infeções Nosocomiais por *Enterococcus faecalis*

Assinatura

(Mariana Barros nº19885)

Orientadora:

Professora Doutora Cristina Pina

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Resumo

As infecções nosocomiais são consideradas um problema mundial de saúde pública. A sua disseminação tem contribuído para aumento das taxas de mortalidade e morbidade, a maioria das vezes devido às limitadas ou mesmo inexistentes opções terapêuticas.

Enterococcus faecalis é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa, presente na flora comensal do trato gastrintestinal de humanos e animais. Apesar da sua suposta inocuidade, nas últimas décadas *E.faecalis* tem-se revelado um patógeno oportunista, representando a segunda e a terceira maior causa de infecções hospitalares a nível mundial. Esta bactéria é apontada como uma das principais causas de endocardites, bacteremias, infecções do trato urinário, intra-abdominais e de feridas contraídas em hospitais.

As suas características fisiológicas permitem-lhe sobreviver a altas temperaturas, a elevados valores de pH e concentrações salinas. Esta bactéria resiste também em ambientes hostis, em situações de subnutrição, de stress oxidativo e às técnicas tradicionais de limpeza.

Apresenta inúmeros fatores de virulência nomeadamente proteínas de superfície, enzimas hidrolíticas e capacidade de formação de biofilmes, o que auxilia esta bactéria a invadir, colonizar e infetar tecidos hospedeiros.

Enterococcus faecalis exhibe uma resistência intrínseca a algumas classes de antibióticos como β -lactâmicos, lincosamidas, trimetropim-sulfametoxazol, fluoroquinolonas e baixas concentrações de aminoglicósídeos. Devido à sua capacidade mutagénica e adaptativa, este microrganismo desenvolve e adquire novas resistências, através de mutações cromossomais ou por transferência de genes. Como é o caso do gene *vanA* e *vanB*, que lhe conferem resistência à vancomicina (VRE).

E.faecalis tem-se revelado uma constante ameaça de vida em todo o mundo, por isso é urgente controlar a disseminação desta bactéria. É importante desenvolver novos métodos terapêuticos, tendo em conta a ineficácia dos atuais e aplicar estratégias, a nível hospitalar, que diminuam ao máximo a transmissão do microrganismo.

Abstract

The nosocomial infections are nowadays a worldwide issue in terms of health. Its dissemination has been the cause of the rising of mortality and disease rates, most of the time due to limited or even nonexistent therapeutic options.

Enterococcus faecalis is a Gram-positive anaerobic facultative bacterium which is found in the flora of the gastrointestinal tract of humans and animals. Despite its alleged harmlessness, lately *E.faecalis* has been proved to be an opportunistic pathogen, representing the second and the third leading cause of hospital-acquired infections worldwide. This bacterium is being pointed as a mainly cause of endocarditis, fast progressing bacteremia may present, urinary tract infections, intra-abdominal and wounds contracted in hospitals.

Its physiological characteristics allows this bacterium to survive at high temperatures, high PH values and highly concentration salts. It can also resist in hostiles environments such as malnutrition, oxidative stress and traditional cleaning technics.

It feature numerous virulence factors including surface proteins, hydrolytic enzymes and ability of biofilm formation, which helps the bacterium to invade, colonize and infect the host tissue.

Enterococcus faecalis displays an intrinsic resistance to some classes of antibiotics such as β -lactam, lincosamides, trimetropim-sulfamethoxazole, fluoroquinolones and low concentration of aminoglycosides. Due to its mutagenic capacity and adaptive skills, this micro-organism develops and acquires new resistances, through chromosome mutations or by genetic transferences e.g. gene *vanA* e *vanB*, which confers resistance to Vancomycin (VRE).

E. faecalis has proved a constant threat of life throughout the world, so there is an urgent need to control the spread of this bacteria by developing new therapeutic methods, having regard to the ineffectiveness of current ones and looking for new strategies inside hospitals that will reduce as much as possible the transmission of the micro-organism.

Agradecimentos

Agradeço,

aos meus pais, por todo o apoio que me deram ao longo destes anos, todas as palavras de carinho, incentivo e por todos os sacrifícios que fizeram por mim.

ao meu irmão por todas as brincadeiras e momentos de alegria. Pela sua presença permanente em todos os momentos.

aos meus quatro avós pelo apoio incondicional, por tudo o que me transmitiram e proporcionaram ao longo destes anos. Por todo o carinho e dedicação que me fizeram chegar até aqui.

ao meu namorado pela paciência inesgotável, por todo o carinho e compreensão.

a todos os meus amigos, em especial aos que fiz na Universidade Fernando Pessoa ao longo deste percurso. É graças a eles que olho para trás saudades de todos estes anos e momentos inesquecíveis.

a toda a minha turma, por todas as alegrias e frustrações partilhadas, por todos os sorrisos de bom dia, por todo o companheirismo e amizade que formamos.

à minha orientadora Professora Doutora Cristina Pina por toda a simpatia com que sempre me tratou, toda a disponibilidade e compreensão que teve ao longo deste trabalho e por todo o tempo dedicado.

Obrigado.

Índice Geral

Resumo.....	v
Abstract.....	vi
Agradecimentos.....	vii
Índice de Figuras.....	x
Lista de Abreviaturas.....	xi
Introdução	1
1) Características de <i>Enterococcus faecalis</i>	3
1.1) Taxonomia	3
1.2) Características fisiológicas.....	4
1.3) Características epidemiológicas	5
1.4) Fatores de Virulência	6
1.4.2) Proteínas de Superfície.....	9
a) Substância de Agregação (Agg).....	9
b) Proteína Extracelular de Superfície (Esp).....	9
c) Fator de Colonização.....	10
1.4.3) Enzimas Hidrolíticas	11
a) Citolisina	11
b) Hialuronidasas.....	12
c) Gelatinase e Serina Protease.....	12
1.4.4) Ácido Lipoteicóico (LTA)	13
1.4.5) Produção de Superóxido Dismutase.....	14
1.4.6) Feromonas Sexuais	14
2) Principais Infecções Nosocomiais por <i>E.faecalis</i>	15
2.1) Endocardite Infeciosa	16
2.2) Infecção do Trato Urinário	17
2.3) Infecções associadas a Cateteres e Implantes Ortopédicos	18
2.4) Infecções Endodônticas.....	18
3) Resistências Antimicrobianas por <i>E.faecalis</i>	20
3.1) Principais Resistências Associadas a <i>E.faecalis</i>	23
3.1.1) Resistência aos Glicopéptidos	23
3.1.2) Resistência aos Aminoglicosídeos	25
3.1.3) Resistências aos β -Lactâmicos	26
3.1.4) Resistência aos Macrólidos	27
3.1.5) Resistência ao Cloranfenicol.....	28

3.1.6) Resistência à Tetraciclina	29
3.1.7) Resistência às Quinolonas	30
3.1.8) Resistência às Streptograminas	31
3.1.9) Resistência às Oxazolidinonas (Linezolida)	32
4) Métodos para diminuir a disseminação Bacteriana a nível Hospitalar	33
5) Conclusão	38
6) Bibliografia	40

Índice de Figuras	Pág.
Figura1- Posição Filogenética do género <i>Enterococcus</i> , <i>Streptococcus</i> e <i>Lactococcus</i> ...	4
Figura2- Operação ebp, o ebpR é o regulador transcripcional.	8
Figura3- Esquema do Operação cyl.....	12
Figura4- Locus fsr.....	13
Figura5 - Esquema representativo do processo de transferência do plasmídeo conjugativo cCF10 da uma célula dadora para uma recetora, induzido por uma feromona.....	15
Figura6- Esquema representativo dos mecanismos de resistência para as diferentes classes de antibióticos.....	22
Figura7- Esquema representativo da resistência à Vancomicina por <i>Enterococcus</i>	24
Figura8- Esquema do transposição Tn1546 com os genes associados à resistência VanA.....	25
Figura9- Esquema de transmissão de Infecções e respetivas Precauções.....	36

Lista de Abreviaturas

Agg - Substancia de Agregação

AMEs - Enzimas Modificadoras de Aminoglicosídeos

CMI - Concentração Mínima Inibitória

E.faecalis - *Enterococcus faecalis*

Ebp - Endocarditis - and Biofilm- associated Pili

EI - Endocardite Infeciosa

Fsr - E.faecalis Regulator

GBAP - Gelatinase Biosynthesis-Activating Pheromone

IACS - Infecção Associada aos Cuidados de Saúde

ITU - Infecção do Trato Urinário

LAB - Bactérias do Ácido Lático

LAP - Leucina Aminopeptidase

LTA - Ácido Lipoteicóico

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

MLS - Macrolídeos, Lincosaminas e Streptograminas

MMR - Microrganismos Multirresistentes

MSCRAMM - Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Meolecules

NNIS - National Nosocomial Infection Surveillance

erm - Erythromycin Ribosome Methylation

Esp - Proteína Extracelular de Superfície

ORF - Open Reading Frame

PBPs - Penicillin-Binging-Protein

PDT - Terapia Fotodinâmica

PYR - Pirrolidonil- β -Naftilamida

QS - Quorum Sensing

rRNA - Ácido Ribonucleico Ribossomal

ROS - Espécies de Radicais de Oxigénio

RPPS - Ribosome Protection Proteins

SOD - Superóxido Dismutase

Strep. - *Streptococcus*

VRE – Vancomycin-reistant *Enterococcus*

Introdução

A infecção hospitalar é um problema de saúde pública, que dificulta o tratamento adequado dos pacientes e apresenta um enorme impacto a nível da morbilidade e mortalidade. Estima-se que em países desenvolvidos as taxas de infecção hospitalar variem entre 5 a 10% de todas as infeções (DGS, 2007).

A Infecção Associada aos Cuidados de Saúde (IACS), anteriormente denominada infecção nosocomial ou hospitalar é definida como uma infecção adquirida após a admissão do paciente e cuja manifestação ocorreu durante a internação ou após alta, podendo ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares. Uma IACS é então considerada uma infecção que não estava em incubação à data de ingresso e que se manifesta apenas após 48 horas da admissão hospitalar, período que corresponde ao tempo de incubação mais comum em infeções bacterianas. Visto que existem vários agentes etiológicos com períodos de incubação diferentes, cada caso deve ser avaliado individualmente consoante as suas características. Como se pode verificar em pacientes submetidos a cirurgia cujo tempo de ocorrência de IACS é de 30 dias após a alta e pode ser aumentado para 1 ano em pacientes submetidos à introdução de próteses (Andersen et al., 2009, Bôas et al., 2004, Rosenthal et al., 2005).

As bactérias do género *Enterococcus* spp são consideradas importantes agentes patogénicos oportunistas. Apresentam uma capacidade notável de desenvolver e adquirir resistências contra vários grupos de agentes antimicrobianos, dificultando cada vez mais a escolha de estratégias terapêuticas eficazes (Lopes et al., 2005, Kayaoglu et al., 2004).

E.faecalis pertence a flora comensal de humanos e animais. Pode também ser encontrado em diversos alimentos, normalmente produtos cruz de origem animal, mas também em locais com poucas condições de higiene, onde a sua presença indica contaminação fecal (Martin., et al 2008).

Durante anos pensou-se que as infeções por *Enterococcus* eram adquiridas através da própria flora comensal do paciente, mas as novas técnicas moleculares e epidemiológicas confirmaram que estes organismos conseguem espalhar-se pelas instalações hospitalares, sendo umas das espécies mais comuns associadas a infeções clínicas (Klein et al., 2003).

E.faecalis é responsável por inúmeras infeções, nomeadamente do trato urinário, endocardites, infeções de feridas cirúrgicas, bacteremias (principalmente associadas a

cateteres), abscessos intra-abdominais, sepsis neonatal e hepatobiliar. Atualmente estima-se que mais de 90% das infecções humanas provocadas por *Enterococcus* são causadas por *E.faecalis* (Gómez-Gil et al., 2009).

Devido à sua resistência inata e adquirida à maioria dos antibióticos, o seu tratamento encontra-se muito limitado e por vezes impossível. Assim tendo em conta o número de clones, que aparecem em hospitais, com múltiplas resistências os clínicos têm cada vez mais dificuldade em encontrar agentes terapêuticos eficazes. O desenvolvimento de novos antibióticos, para combater as novas espécies multirresistentes exige um elevado conhecimento a nível fisiológico e genético das mesmas, sendo urgente o melhoramento de técnicas de análise genética (Dibo et al., 2004).

Atualmente a bactéria apresenta resistência a diversos antibacterianos, como é o caso da vancomicina. O primeiro *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE) foi identificado há vinte anos enquanto que *Enterococcus* resistente aos glicopéptidos (GRE) foram identificados recentemente, levando a um aumento crucial da taxa de mortalidade (Kainer et al., 2007).

E.faecalis é um patógeno versátil e inúmeros fatores determinam a sua virulência, como a capacidade de colonizar o trato gastrointestinal, que é o habitat natural da espécie, ou a aderência à matriz extracelular de um grande número de proteínas incluindo trombospondina, lactoferrina e vitronectina (Billstrom et al., 2008). A produção de biofilmes é também fundamental na maioria das infecções, nomeadamente do trato urinário, em casos endodônticos assim como em endocardites (Deng et al., 2009).

Este estudo, tem por objetivo principal realizar uma pesquisa bibliográfica atual sobre as infecções nosocomiais por *E.faecalis*. Irão ser abordadas as características desta bactéria, de modo a explicar a associação deste microrganismo com a problemática das infecções nosocomiais. Pretende também ser uma chamada de atenção quanto à realidade atual da maioria dos hospitais no que toca a infecções por bactérias multirresistentes. Este é um tema preocupante, que cada vez mais carece da atenção de todos os profissionais de saúde, no sentido da investigação, prevenção e educação populacional.

1) Características de *Enterococcus faecalis*

1.1) Taxonomia

Enterococcus são bactérias Gram-positivas, de catalase negativa sem formação de esporos, anaeróbias facultativas, geralmente dispõem-se aos pares e em curtas cadeias. Pertencem a um grupo de organismos conhecidos como bactérias do ácido láctico (LAB) (Fisher et al., 2009). Têm capacidade de sobreviver em grandes níveis de stress e ambientes hostis, como temperaturas entre os 5-65°C, valores de pH entre 4.6-9 e também altas concentrações de sais (6,5%NaCl). Pertencem ao grupo D de Lancefield, cujo antígeno é o ácido lipoteicoico (LTA) encontrado em quase todas as bactérias Gram-positivas. Produzem leucina aminopeptidase (LAP) e não possuem enzimas citocromos (Portenier et al., 2003, Wanda et al., 2000).

A glicose e outros hidratos de carbono são metabolizados por fermentação e o ácido láctico é o principal produto desse metabolismo. Hidrolisam a esculina na presença de 40% de sais biliares, a L-leucina- β -naftilamida e a grande maioria hidrolisa o L-pirrolidonil- β -naftilamida (PYR) (Sood et al., 2008).

Ao longo dos anos foram feitos vários estudos para distinguir *Enterococcus* da espécie *Streptococcus*. Inicialmente o investigador Sherman dividiu os *Streptococcus* em quatro categorias, organizadas consoante as reações hemolíticas, o grupo de antígeno a que pertencem e o seu fenótipo. Os quatro subgrupos eram o grupo pyogenes, o grupo lactico, o grupo viridans e o grupo enterococcus. Este último era constituído por bactérias de origem fecal incluindo *Streptococcus faecalis*, *Strep. liquefaciens*, *Strep. zymogenes* e *Strep.durans* (kobayakawa et al., 2005).

Através de técnicas de hibridização do DNA e da sequenciação da porção 16S do rRNA foi provado que as espécies *Streptococcus faecium*, *Strep. faecalis*, *Strep. avium* e *Strep.gallinarum* eram bastante distintas dos restantes *Streptococcus*, e assim propôs-se a sua transferência para o género *Enterococcus* (Facklam et al., 2002, Foulquié-Moreno et al., 2006).

Até ao momento mais de 30 espécies já foram transferidas do grupo *Streptococcus* para o *Enterococcus*. O grupo láctico foi reclassificado e englobado num novo género denominado *Lactococcus*, embora as suas características não sejam as mesmas que as descritas para o subgrupo láctico (Figura1) (Poeta et al., 2005).

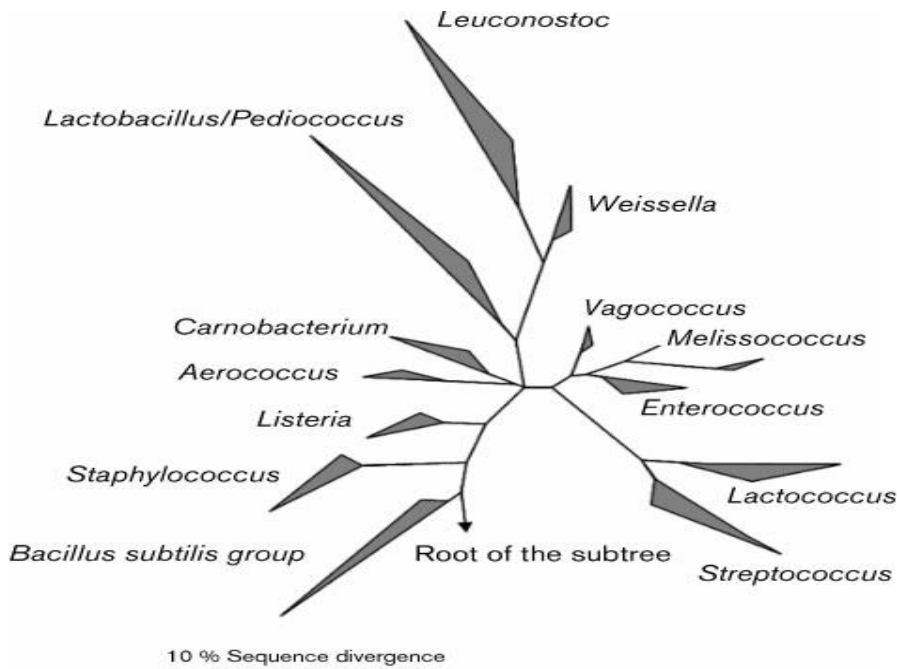


Figura1- Posição Filogenética do género *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Lactococcus* (adaptado de Fisher et al., 2009).

A principal diferença entre *Enterococcus* e *Streptococcus* encontra-se na presença do antígeno do grupo D de Lancefield, visto que apenas *Streptococcus bovis*, *Strep.alactolyticus* e *Strep.equinus* apresentam o serotipo deste grupo. Estes últimos são distinguidos dos *Enterococcus* devido ao não crescimento a uma concentração de 6.5% de NaCl e a 10°C (Schleifer et al., 2002).

1.2) Características fisiológicas

O género *Enterococcus* tem capacidade de crescimento entre os 5 e 50°C, sendo a sua temperatura ótima 42.7°C em condições aeróbicas, embora o desenvolvimento possa também ocorrer em atmosferas anaeróbicas. *Enterococcus faecalis* consegue mesmo

sobreviver durante 30 minutos e temperaturas que rondam os 60°C, capacidade que os distingue dos *Streptococcus*. Estudos demonstram que esta competência está relacionada com a estrutura da membrana, nomeadamente com os lípidos e ácidos gordos (Folquié Moreno et al., 2006). Esta situação deve-se à alteração quantitativa e qualitativa do perfil de ácidos gordos da membrana plasmática quando sujeita a situações de stress. A modificação da composição da membrana lipídica afeta, principalmente, a sua fluidez. Embora este mecanismo de resistência não esteja completamente esclarecido, sabe-se que com o aumento do teor de gorduras e a diminuição dos níveis de ácidos gordos saturados a temperaturas elevadas, a membrana plasmática tem demonstrado ter menos resistência (Marinho et al., 2013).

E. faecalis desenvolve-se num intervalo de pH entre 4.6 e os 9., sendo o seu pH ótimo de 7.5, esta resistência deve-se a durabilidade e impermeabilidade da membrana aos ácidos. Tolerância à presença de 40% de sais biliares e cresce em elevadas concentrações salinas (6.5% NaCl) (Nakajo et al., 2006). Durante a fase de crescimento a variável crucial é mesmo o pH, enquanto que a temperatura e a concentração em sal têm menos importância, já na fase estacionária esta bactéria apresenta maior resistência ao calor. *E. faecalis* pode, inclusivamente, tornar-se menos sensível a níveis letais de sulfato de sódio, à hiperosmolaridade, ao etanol e peróxido de hidrogénio (Ogier et al., 2008, Stuart et al., 2006).

1.3) Características epidemiológicas

Enterococcus faecalis forma uma parte essencial da microflora de animais e humanos, a sua distribuição é similar em ambos. Estas bactérias encontram-se, principalmente, no trato gastrointestinal e geniturinário, quando presentes em outros locais do organismo são consideradas uma espécie patogénica oportunista (Cauwerts, 2007).

Devido à sua localização, são muitas vezes isolados em diversos tipos de alimentos, especialmente de origem animal, como carne, peixe. A comida contaminada deve-se a alta resistência dos *E. faecalis* às elevadas temperaturas, como é o caso do processo de esterilização (Segley et al., 2004).

Visto ser uma bactéria oportunista, apresenta uma grande incidência em pacientes hospitalizados, não só devido à sua virulência, mas também, porque o próprio hospital se torna uma incubadora (Brown et al., 2006). De acordo com NNIS (*National Nosocomial Infection Surveillance*), *Enterococcus faecalis* é o terceiro patogénico mais comum a nível mundial nas seguintes infeções hospitalares: trato urinário, intra-abdominal, cirúrgica e associadas a cateteres (Aslam, 2010, Rosenthal et al., 2008).

Estudos epidemiológicos indicam que nos Estados Unidos da América 12% dos isolados associados a infeções durante o tratamento de saúde correspondem a *E.faecalis*. Já em Portugal a sua prevalência é de 5,14% (Hidron et al., 2008).

Estes microrganismos estão também bastante relacionados com endocardites, bacteremias, septicemias e são constantemente isolados em falhas endodónticas, nomeadamente nos canais radiculares. Cerca de 90% destas infeções devem-se exclusivamente a *E.faecalis* encontrado em canais obturados (Folquié Moreno et al., 2006).

As infeções por *Enterococcus faecalis* podem ser oriundas da flora microbiana comensal do paciente, onde estes microrganismos poderão ser transferidos de indivíduo para indivíduo ou adquiridos através do consumo de água ou alimentos contaminados (Werner et al., 2008). São então uma ameaça para a saúde humana, principalmente devido à grande resistência que têm vindo a adquirir contra um largo número de antimicrobianos, o que impossibilita a sua erradicação. Alguns fatores não microbiológicos, como é o caso do consumo de agentes antimicrobianos de forma incorreta ou desnecessária e mesmo a falta de higiene, contribuem para a evolução e perda de controlo desta infeção (Vignaroli et al., 2011).

1.4) Fatores de Virulência

Os fatores de virulência, são compostos ou estratégias que as bactérias utilizam para colonizar e invadir os tecidos do hospedeiro, de modo a percorrerem as células epiteliais escapando ao sistema imunitário. Estão muito relacionados com as estirpes nosocomiais, pois estas, devido ao ambiente onde estão inseridas, têm maior facilidade de adquirir fatores exógenos, aumentando a sua capacidade de infeção em relação às estirpes comensais (Paradella et al., 2007).

O aumento da resistência aos agentes antibacterianos e proteínas de superfície, permite que os microrganismos nosocomiais em causa colonizem uma maior variedade de nichos em relação às outras estirpes (Mundy et al., 2000).

Alguns destes fatores são codificados por plasmídeos conjugativos, ou rearranjos no genoma em ilhas de patogenicidade. A sua expressão não é essencial para a sobrevivência da estirpe, mas contribui para a gravidade da infeção provocada. (Ogier et al., 2008).

Vários fatores são cruciais para determinar a virulência de *Enterococcus faecalis*, como é o caso da capacidade de colonizar o trato gastrointestinal, a aderência ao epitélio do trato urinário, da cavidade oral e às células embrionárias dos rins. Visto que a maioria das infeções são endógenas, estas acontecem por translocação da bactéria entre as células epiteliais através do intestino, o que conseqüentemente causa uma infeção dos nódulos linfáticos e posteriormente disseminação por todas as células do corpo (Omar et al., 2004).

1.4.1) Formação de Biofilme

O biofilme consiste numa população de células ligadas irreversivelmente em várias superfícies bióticas e não bióticas, contidas numa matriz hidratada composta por várias substâncias, como proteínas, polissacarídeos e ácidos nucleicos (Mohamed et al., 2007). A sua formação estabelece-se através de um processo complexo de interação entre células e a sua imobilização, dando origem a um biofilme firme e tridimensional (Tendolkar et al., 2004).

A capacidade de formação de biofilme permite a colonização de superfícies inertes e biológicas, a proteção contra agentes antimicrobianos e fagocitários, mediando a adesão e invasão de células do hospedeiro (Baldassari et al., 2005).

Os nutrientes contidos no meio de crescimento são fatores essenciais para a produção de biofilme, como glucose ou sêrum, mas também a concentração em CO₂, pH, osmolaridade e temperatura. Outro fator é o metabolismo de carboidratos que regula a produção deste composto em vários Gram-positivos, incluindo *E.faecalis* (Pillai et al., 2004).

A regulação da expressão de genes bacterianos, nomeadamente para a produção de biofilme, é controlada através de um mecanismo denominado *Quorum Sensing* (QS) ou seja, é feita em resposta à densidade populacional de células, dependendo de sinais moleculares extracelulares. Os mecanismos QS têm como base a libertação de pequenas moléculas que atuam como um sinal químico, intituladas por “*autoinducers*”. Estas acumulam-se no meio extracelular e desencadeiam uma serie de respostas por parte das células, nomeadamente a ativação transcricional de um conjunto de genes, incluindo os genes envolvidos no processo de virulência (kong et al., 2006).

A capacidade de *E.faecalis* produzir biofilme é fundamental em várias infeções, nomeadamente no trato urinário, em endodontia e em endocardites. Os biofilmes maduros conseguem tolerar antibióticos em altas concentrações, estas bactérias tornam-se também resistentes à fagocitose. São estruturas extremamente difíceis de erradicar, levando muitas vezes a infeções crónicas (Lewis, 2001).

São vários os componentes tanto de proveniência microbiana como do hospedeiro, que contribuem para a formação do biofilme. Um dos principais fatores são as fímbrias, responsáveis pela anexação a outras superfícies da célula hospedeira. Os *Enterococcus* não conseguem produzir biofilme sem a presença deste elemento, ou seja, uma bactéria sem esta capacidade fica com a sua competência de infeção bastante reduzida. As fímbrias estão consequentemente correlacionadas com as endocardites e infeções do trato urinário provocadas por *E.faecalis* (Gilmore et al., 2005, Mandlik et al.,2008).

O operão associado a formação de fímbrias é o *ebp* (*endocarditis- and biofilm- associated pili*) (Figura2), constituído pelos genes *ebpA*, *ebpB*, *ebpC*. Este composto é constituído por filamentos cruzados de múltiplas proteínas precursoras acionadas por sortases, enzimas procariotas, que modificam as proteínas de superfície através do reconhecimento e clivagem do grupo carboxilo terminal (Hendrickx et al., 2009, Nallapareddy et al.,2006).



Figura2- Operão *ebp*, o *ebpR* é o regulador transcricional (Adapatado de Hendrickx et al., 2009).

1.4.2) Proteínas de Superfície

a) Substancia de Agregação (Agg)

A substancia de agregação é uma glicoproteína de superfície presente nos plasmídeos de *E.faecallis*. É induzida por feromonas e promove a formação de agregados durante a conjugação bacteriana, assim auxilia a transferência de plasmídeos e impulsiona a adesão de superfície das células eucariotas, tornando o contato entre células mais eficaz (Poeta et al., 2005). A presença desta proteína aumenta a hidrofobicidade da superfície da célula, promovendo a localização do colesterol para o fagossoma, prevenindo ou atrasando a fusão com as vesículas lisossomas (Koch et al., 2004).

A substância de agregação é um fator de virulência que medeia a ligação específica ao epitélio intestinal, as células epiteliais renais, neutrófilos humanos e macrófagos, facilitando assim a colonização e formação de vegetações (Folquié Moreno et al., 2006).

Esta proteína contém também duas sequências de aminoácidos Arg-Gly-Asp, reconhecidas por integrinas (receptores membranares). O epitélio intestinal apresenta estas integrinas, permitindo a translocação da bactéria através da barreira epitelial. Este fator promove a aderência e invasão dos microrganismos que o apresentam (Aberna et al., 2011).

Em *E.faecalis* os genes codificados da Agg são o *asp1*, *asc10* e *asa1* e os respectivos plasmídeos de conjugação são pPD1, pCF10 e pAD1. A expressão da proteína é induzida por feromonas e as células que conseguem fazer podem formar agregações maiores do que as que não têm esta capacidade, visto que Agg medeia a ligação entre a célula dadora e a potencial célula receptora (Hendrickx et al., 2009).

b) Proteína Extracelular de Superfície (Esp)

Os *Enterococcus* expressam uma proteína extracelular de superfície (Esp), que promove a adesão, colonização e invasão do sistema imunitário, aumentando assim a resistência da bactéria aos antibióticos. A proteína é constituída por 1873 aminoácidos e apresenta um domínio N-terminal sem significativa similaridade com outras proteínas nos bancos de dados. Apesar da sua função ainda não ser completamente esclarecida, alguns estudos

defendem que a região N-terminal pode contribuir na interação com o tecido hospedeiro (Paradella et al., 2007, Tolledo-Arana et al., 2001).

Esta proteína de elevada massa molecular é codificada cromossomicamente pelo gene *esp* detetado em casos de bacteremia, mas não em indivíduos saudáveis. Contribui para a transmissão nosocomial e para a persistência de *Enterococcus* nas células endoteliais do trato urinário e na matrix extracelular do hospedeiro humano (Carlos et al., 2010).

Segundo alguns estudos esta proteína está correlacionada com a produção de biofilme. Através da comparação entre *E.faecalis esp* positivo e *E.facalis esp* negativo, pode-se concluir que a produção de biofilme aumenta em grande escala após a introdução do gene responsável pela expressão da proteína (Tendolkar et al., 2005).

Apesar da ligação demonstrada entre a proteína e a formação de biofilme, estudos mais recentes comprovaram que a proteína Esp não é obrigatória para a criação do complexo, embora seja evidente o aumento dos níveis de produção quando esta está presente. Concluindo-se assim que os mecanismos envolvidos na correlação entre a produção de biofilme e Esp continuam a ser estudados para resultados mais evidentes (Di Rosa et al., 2006).

c) Fator de Colonização

O fator de colonização resulta da expressão do gene *ace*. É uma proteína de superfície *collagen-binding* e pertence à família MSCRAMM (*microbial surface components recognizing adhesive matrix meolecules*). Esta adesina tem capacidade de mediar ligações entre a célula bacteriana e o tecido do hospedeiro através da interação com o colagénio tipo I e IV, dentina e laminina. A proteína é produzida em condições fisiológicas específicas, tendo um papel importante em algumas infeções provocadas por *Enterococcus*, nomeadamente em endocardites (Koch et al., 2004).

A expressão desta proteína parece aumentar na presença de certos estímulos ambientais, como a presença de soro, sais biliares e altas temperaturas. Alguns estudos revelam que as estirpes de *E.faecalis* mutadas para este gene, apresentam um decréscimo acentuado, podendo-se concluir que Ace é um importante fator de virulência. O gene *ace* é ubíquo em *E.faecalis* e está bastante conservado. (Lebreton et al., 2009, Singh et al., 2010).

1.4.3) Enzimas Hidrolíticas

a) Citolisina

A citolisina, também denominada hemolisina, foi um dos primeiros fatores de virulência a ser estudado. A sua atividade contribui elevadamente para a citotoxicidade das infecções causadas por *E.faecalis*. Esta enzima tem ação bactericida contra um amplo espectro de bactérias Gram-positivas e está relacionada com o aumento do risco de morte súbita em casos de bacteriemia nosocomial (Izumi et al., 2005).

A citolisina é codificada em plasmídeos transmissíveis ou em cromossomas em ilhas de patogenicidade. Consiste num sistema de dois componentes peptídicos (Cyl_L e Cyl_S), no entanto é produzida através de um processo complexo que requer o produto de 8 genes que perfazem o seu operão: *cylR1*, *cylR2*, *cylL_L*, *cylL_S*, *cylM*, *cylB*, *cylA* e *cylI* (Figura3). Os genes *cylL_L* e *cylL_S* correspondem às unidades estruturais da enzima, os genes *cylM*, *cylB*, *cylA* são responsáveis por modificações traducionais e o gene *cylI* é responsável pela imunidade celular. Estes seis genes são transcritos como uma unidade e os genes *cylR1* e *cylR2* têm funções reguladoras e correspondem à segunda unidade transcripcional. As duas subunidades (Cyl_L e Cyl_S) estruturais são, por fim, modificadas pelo produto do gene *cylM* e transportadas para o meio extracelular, aqui são ativadas por uma protease codificada por *cylA*, resultando numa citolisina funcional (Coburn et al., 2003, Shankar et al., 2004).



Figura3- Esquema do operão *cyl* (Adaptado de Gaspar et al., 2009).

Esta enzima é regulada por mecanismos *quorum-sensing*, embora alterações na concentração em oxigénio também possam influenciar a sua expressão. Neste caso, condições anaeróbicas induzem uma maior produção de citolisina (Koch et al., 2008).

Este fator tem demonstrado um importante papel na primeira etapa dos processos infecciosos, ainda na fase assintomática, contribuindo para a penetração nos tecidos

intestinais. As estirpes de *E.faecalis* que expressão o gene *cyl* têm apresentado um nível de virulência mais acentuado do que as restantes (Cox et al., 2005).

b) Hialuronidases

As hialuronidases fazem parte do grupo de enzimas hidrolíticas que potenciam a virulência de *E.faecalis*, são codificadas pelo gene cromossomal *hyl*. Estão associadas a danos tecidulares, pois atuam de modo degradativo no ácido hialurónico que é um glucosaminoglicano encontrado no tecido conetivo, neural e epitelial (Semedo et al., 2003).

A hialuronidase tem capacidade de despolimerizar os mucopolissacarídeos do tecido conjuntivo, facilitando a colonização dos microrganismos nos tecidos do hospedeiro e conseqüentemente das suas toxinas (Kayaoglu et al., 2004). Outro papel importante desta enzima é o fornecimento de nutrientes à bactéria, pois os produtos de degradação do seu substrato são dissacáridos, que podem ser transportados e metabolizados pelo microrganismo (Hynes et al., 2000).

A importância clínica deste fator tem vindo a aumentar, pois foi descrita uma nova *open reading frame* (ORF), ou seja, uma sequência de DNA compreendida entre o códon de início de tradução e um códon de terminação. Sugerindo assim, que as bactérias que possuam esta enzima possam estar associadas, também, a doenças invasivas (Worth et al., 2008).

c) Gelatinase e Serina Protease

A gelatinase é uma metaloprotease de zinco extracelular. A principal função das proteases bacterianas é prover nutrientes peptídicos ao organismo, no entanto é possível que causem danos nos tecidos do hospedeiro, e daí serem apontadas como fatores de virulência (Thomas et al., 2008).

A gelatinase tem capacidade de hidrolisar um largo espetro de substratos do hospedeiro, incluindo o colagénio, fibrinogénio, fibrina, gelatina, caseína, LL-37 e também componentes do complemento como C3 e C3a. É codificada pelo gene *gelE* e constituída por resíduos de histina, cujos locais de ligação são ocupados pelos iões de

zinco. O seu pH ótimo encontra-se entre o 6-8, e apresenta uma natureza hidrofóbica (Lance et al., 2010). Esta enzima é geralmente produzida por *Enterococcus* provenientes de infeções nosocomiais, fecais ou de isolados clínicos (Lopes et al., 2006).

Tanto a gelatinase como a serina protease são codificadas através do operão *gelE-sprE*, cuja expressão é regulada por *quorum sensing*, codificado pelo locus *fsr* (Qin et al., 2001).

O *fsr* locus (*E.faecalis* regulator) contém os genes *fsrA*, *fsrB* e *fsrC* (Figura4). O *fsrB* liberta um péptido de sinal, uma feromona GBAP (*gelatinase biosynthesis-activating pheromone*), processado através do sistema *quorum sensing*. Quando o GBAP se acumula, transitando da fase exponencial para estacionária, os genes *gelE* e *sprE* são induzidos. Estes encontram-se imediatamente a seguir do regulador *fsr* e codificam então as proteínas gelatinase e serina protease (Nakayama et al., 2002).

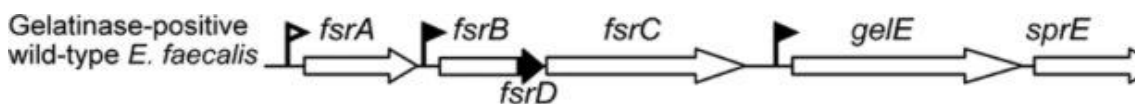


Figura4- Locus *fsr* (adaptado de Nakayama et al, 2006).

Estudos posteriores evidenciaram uma correlação entre a formação de biofilme e a presença do gene *gelE* controlado pelo operão *fsr*. Ou seja, quando existem mutações a nível do locus *fsr* (*fsrA*, *fsrB* e *fsrC*), ocorre uma diminuição da produção de biofilme. A gelatinase é então um dos elementos fundamentais para a formação do complexo, por isso a sua ausência tem um efeito mais acentuado do que o da serina protease (Mohamed et al., 2007).

1.4.4) Ácido Lipoteicóico (LTA)

E.faecalis liberta um importante fator de virulência, o ácido lipoteicóico (LTA). Este é estruturalmente e imunologicamente semelhante aos lipopolissacarídeos provenientes das bactérias Gram-negativas. O LTA atua como estimulador de leucócitos, monócitos e macrófagos na libertação de mediadores inflamatórios, como o TNF- α (fator de necrose tumoral), a interleucina-1- β , enzimas lisossomais e prostaglandinas E2 (Kayaoglu et al., 2004).

Encontra-se na superfície das células Gram-positivas e inibe a autólise das paredes celulares intactas ou isoladas. Apresenta uma potente ação citotóxica, exercendo um papel importante na formação de biofilme, o que promove uma maior resistência a antibacterianos e desinfetantes. Durante a infecção são criados anticorpos específicos contra o LTA. Este composto tem também um importante papel na formação da substância de agregação e na transferência de plasmídeos, contribuindo para a virulência do microrganismo (Baik et al., 2008).

1.4.5) Produção de Superóxido Dismutase

O anião superóxido, tal como as outras espécies de radicais de oxigénio (ROS) exercem um efeito destrutivo sobre uma variedade de componentes biológicos como lípidos, proteínas e ácidos nucleicos. A produção de superóxido pelos neutrófilos e por outras células fagocitárias é essencial para a morte do microrganismo, no entanto, sua produção causa dano tecidual no local da inflamação (Kayaoglu., et al 2004).

A superóxido dismutase (SOD) é uma metaloenzima, codificada pelo gene *sodA*, que catalisa a conversão de superóxido em peróxido de hidrogénio (H₂O₂) e oxigénio molecular, sendo considerado um dos maiores mecanismos de defesa das células contra o stress oxidativo.

Tendo em conta que o anião superóxido está diretamente envolvido em danos tecidulares e reações inflamatórias, auxilia assim a bactéria a colonizar mais facilmente membranas celulares sem comprometer a sua sobrevivência (Verneuil et al., 2006).

1.4.6) Feromonas Sexuais

As feromonas são pequenos péptidos hidrofóbicos, compostos por 7 ou 8 aminoácidos, que têm como principal papel promover a transferência conjugativa de plasmídeos específicos entre estirpes bacterianas. Estes são codificados pelos genes *cdp* presentes no cromossoma bacteriano (Eaton et al., 2001).

O seu ciclo processa-se da seguinte maneira: uma célula recetora secreta uma feromona sexual específica de um plasmídeo que não transporta, de seguida a célula dadora produz um fator de agregação (Agg), permitindo o contacto entre as duas células e facilitando a

transferência do plasmídeo replicado (Figura5). Após este processo o recetor expulsa aquela feromona e começa a secretar outras, específicas de plasmídeos que ainda não contem. Este sistema facilita e aumenta em larga escala a quantidade de plasmídeos transferidos entre células (Kayaoglu et al., 2004).

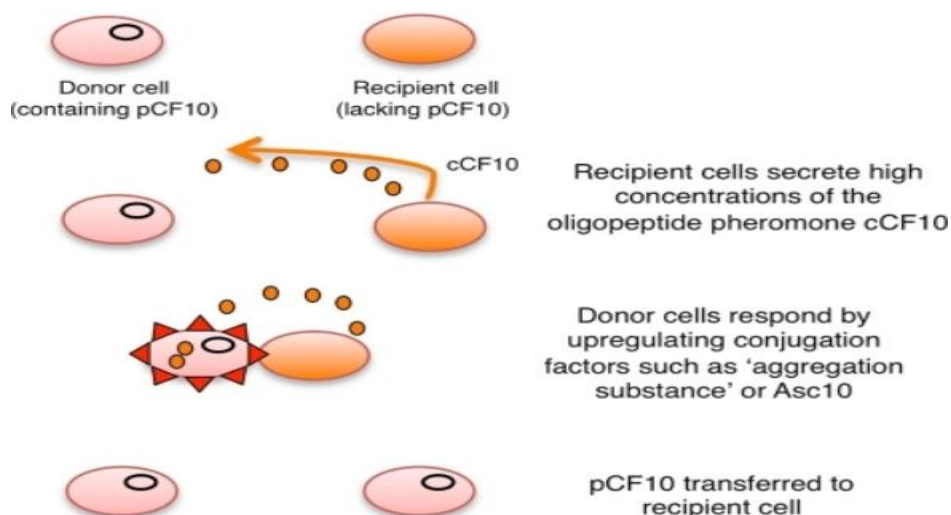


Figura5- Esquema representativo do processo de transferência do plasmídeo conjugativo cCF10 da uma célula dadora para uma recetora, induzido por uma feromona (Adapatado de Bennett et al., 2010).

2) Principais Infecções Nosocomiais por *E.faecalis*

Como já foi referido *E.faecalis* pertence à microflora comensal intestinal, da cavidade oral e do trato genital feminino. Visto ser um potencial patogénico em vários locais do corpo, causa infeções oportunistas com maior prevalência em indivíduos hospitalizados devido à sua condição (Richard et al., 2000).

Visto que esta bactéria apresenta resistências naturais a algumas classes de antibióticos e uma capacidade elevada de desenvolver e adquirir novas resistências, tanto provenientes de microrganismos da mesma espécie, como de outros, a sua terapia esta cada vez mais limitada. A falta de opções terapêuticas aumenta em grande escala a probabilidade de disseminação de *E.faecalis*, contribuindo para o agravamento das infeções hospitalares e consequentemente ambientais e alimentares (Sedgley et al., 2004).

Em ambiente hospitalar, *E.faecalis* é considerada a segunda e terceira maior causa de infecções nosocomias, nomeadamente em infecções do trato urinário e endocardites. A sua elevada virulência e capacidade mutagénica faz deste microrganismo uma das principais causas de endocardites, septicemias, infecções do trato urinário, cirúrgicas, endodónticas e até infecções de feridas (Dahlen et al., 2012).

Esta bactéria é também responsável por perigosas bacteriemias. Maioritariamente contraídas em hospitalar, afeta pacientes em estado grave, geralmente submetidos a procedimentos invasivos e tratamentos prévios com antibióticos de largo espectro (Estévez et al., 2010). Devido ao elevado número de resistências é importante ter em conta quais os fatores de predisposição para a aquisição de bacteriemia, a fim de se estabelecer qual o tratamento adequado (Silva et al., 2014).

E.faecalis pode também provocar infecções intra-abdominais, nomeadamente doenças relacionadas com a inflamação intestinal, tal como colite ulcerosa ou doença de Crohn (Steck et al., 2011).

2.1) Endocardite Infeciosa

Atualmente *E.faecalis* é considerado um dos principais causadores de endocardite infecciosa (EI) contraída em hospitais. Trata-se de uma infeção, por invasão do tecido endocárdico atingindo as válvulas do coração ou do revestimento interno, o que pode levar à destruição valvular e conseqüentemente à morte (Fernandez et al., 2007).

Como já foi referido, vários fatores de virulência estão relacionados com este tipo de infeção. Nomeadamente a proteína de superfície Ace, que interage com o colagénio, promovendo uma rápida agregação celular. A substância de agregação é outra proteína de superfície relacionada com a endocardite, mediando a aderência da bactéria às células do hospedeiro e promovendo a formação de vegetações e produção precoce de biofilme. A secreção de protease, gelatinase e expressam da proteína de superfície esp, também contribuem para a formação de vegetações bacterianas e são fatores também referenciados na formação de biofilme (Johansson et al., 2013).

O sistema Fsr, para além de controlar a expressão de gelatinase e da serina protease através do sistema *quorum-sensing*, regula também, outros genes importantes para a

virulência, como é o caso do locus codificante do Ebp (endocarditis and biofilm associated pili), cujas subunidades são codificadas pelo operão *ebp*, formado por *ebpA*, *ebpB*, *ebpC* associados à *srtC* (codificante da sortase C) (Bourgogne et al., 2010).

Mais recentemente encontrou-se uma correlação entre a capacidade de agregação plaquetária e a formação de colônias nas válvulas. A ativação de plaquetas, por *E.faecalis*, pode então também contribuir como fator de virulência em casos de EI (Sava et al., 2010).

A aquisição de múltiplas resistências fez com que a endocardite infecciosa se torna-se uma constante ameaça de vida, sendo necessário uma alternativa eficaz às estratégias antibacterianas atualmente utilizadas. Alguns estudos demonstram que a sua terapêutica deveria passar pela imunoprofilaxia ou imunoterapia (Sreedhar et al., 2006). Deste modo têm sido pesquisadas proteínas alvo, que sejam expressadas *in vivo* e que tenham um importante papel de virulência. É o caso das proteínas microbianas de superfície, pois podem ser potenciais candidatas a antígenos, para o desenvolvimento de imunoterapias. A mesma situação tem sido também estudada para as proteínas associadas à formação de biofilme, como por exemplo *ebpA*, *ebpB* e *ebpC*. (Tendolkar et al., 2006).

2.2) Infecção do Trato Urinário

A infecção do trato urinário (ITU) é uma das causas mais comuns de infecção na população em geral, tendo uma representação cada vez maior em pacientes internados em unidades hospitalares (Roriz-Filho et al., 2010).

Em ambiente hospitalar 80% das ITU são provocadas pelo uso de um cateter urinário permanente, sendo a maioria delas diagnosticadas por um bacteriúria assintomática. Nestes casos a probabilidade de adquirir a infecção depende do método, do tempo de permanência do cateter, dos cuidados hospitalares e da suscetibilidade do doente. As ITU associadas a cateteres, geralmente, são adquiridas por pacientes de idade avançada ou em estado debilitado. Neste tipo de ITU o risco de ser aplicado o tratamento empírico inadequado é bastante elevado, por isso o uso de cateteres para este fim deve ser limitado e controlado a nível hospitalar, de modo a diminuir a disseminação das ITU e os grupos de risco (Ortega et al., 2013, Richard et al., 2000)

Quando a ITU é adquirida em ambientes hospitalares os agentes etiológicos possíveis são bastantes diversificados, predominando as enterobactérias, em destaque a espécie *Enterococcus faecalis*. Devido à dificuldade de estratégias antimicrobianas aplicadas neste microrganismo, novos estudos demonstraram a eficácia de uma nova cefalosporina (aprovada recentemente) em casos de ITU, a ceftobiprole medocaril. (Kavindra et al., 2012). Esta cefalosporina de quinta geração apresenta atividade contra as bactérias resistentes à vancomicina e às β -lactamases positivas. É importante a pesquisa da terapêutica correta para evitar bacteremias, muito relacionadas também a infecções por *E.faecalis* (Arias et al., 2007).

2.3) Infecções associadas a Cateteres e Implantes Ortopédicos

Enterococcus faecalis é também considerada um dos principais causadores de bacteremias associadas a cateteres venosos e são frequentemente isolados de pacientes ventilados mecanicamente (Baldassari et al., 2005).

Mais recentemente esta espécie tem sido reportada como um dos principais agentes etiológicos de infecções em implantes ortopédicos. Sendo necessário ter em consideração que as infecções são as complicações mais graves em cirurgia ortopédica e a principal causa para a falha do implante (Campoccia et al., 2006).

E.faecalis apresenta uma rápida mutabilidade genética, juntamente com a sua capacidade de transferência de resistências para outras bactérias e o seu grande número de fatores de virulência, adequados para aderir aos biomateriais (tal o como a produção de biofilme), e colonizar os tecidos. Tendo em conta todos estes aspetos, conclui-se que esta bactéria detém as qualidades certas para se tornar um perigoso patogénico de infecções implantares. (Arciola et al., 2007).

2.4) Infecções Endodônticas

Enterococcus faecalis tem sido reportada como sendo uma das principais causas microbianas dos insucessos em tratamentos endodônticas. Por vezes, podem ser isolados em baixos níveis na mucosa oral de indivíduos saudáveis, mas a sua frequência ocorre predominantemente em estado de infecção. Esta bactéria persiste em periodontites,

abscessos periradiculares e principalmente canais radiculares obturados, são mais raramente encontradas em peri-implantites (Kayaoglu et al., 2004).

A distribuição da espécie na mucosa oral ou nas infecções orais profundas é muito similar às infecções ocorridas nas outras partes do corpo. Sendo um microrganismo oportunista, usualmente ocorre em pacientes imunodeprimidos e na maioria das vezes internados. (Dahlén et al., 2012).

Esta infecção é um problema no tratamento de dentes comprometidos endodonticamente, pois é uma bactéria fortemente resistente às substâncias químicas utilizadas nos procedimentos de limpeza e desinfecção dos canais obturados. *E.faecalis* está quase sempre relacionada com o insucesso do tratamento endodôntico (Gomes et al., 2008).

Quando estes microrganismos e os seus produtos estão presentes no sistema de canais radiculares, ocorre uma difusão em direção à polpa, levando à inflamação e necrose da mesma. Estes aderem à cavidade pulpar, formam biofilmes e de seguida invadem os tecidos periapicais. Após esta invasão promovem a destruição tecidular, resultando no desenvolvimento de lesões (Siqueira et al., 2009).

As infeções por *E.faecalis* são maioritariamente assintomáticas e duradouras devido à capacidade de sobrevivência desta espécie por extensos períodos de tempo em canais radiculares obturados. Durante a invasão tecidular, os *Enterococcus* modelam a expressão de fatores de virulência, cuja transcrição de genes é ativada caso seja necessário, nomeadamente em ambientes com limitada disponibilidade de nutrientes. Estes microrganismos têm também capacidade de suprimir a ação dos linfócitos, potenciando a sua persistência na patologia endodôntica (Basrani et al., 2003, Burley et al., 2012).

Apresenta resposta ao pH alcalino, adaptando-se através da bomba de prótons capaz de acidificar o citoplasma bacteriano, este processo justifica a sua resistência a medicamentos intracanalais à base de hidróxido de cálcio. Outro fármaco muito recorrente é a cloroxidina, utilizada mundialmente para prevenir a placa bacteriana e recentemente tem sido sugerida como medicação intracanal. Esta molécula é reconhecida pela sua ampla atividade antimicrobiana e baixa citotoxicidade, por estes motivos tem sido proposta a sua utilização na irrigação de canais radiculares durante o tratamento endodôntico, embora *E.faecalis* exiba, também, resistência a este composto (Nacif et al., 2010, Zehnder, 2006).

Devido à dificuldade de erradicação desta bactéria em infecções endodônticas, novos métodos têm sido investigados na tentativa de a eliminar. Destacando-se a associação da terapia endodôntica convencional ao uso laser e terapia fotodinâmica (PDT) (Poly et al., 2010). Estudos recentes sobre a utilização de PDT têm comprovado a sua eficácia como coadjuvante do tratamento endodôntico, devido a uma significativa redução da população microbiana, destruindo os microrganismos remanescentes nos sistemas de canais radiculares. Esta é uma técnica de fácil e rápida aplicação clínica, que pode ser utilizada em tratamentos endodônticos realizados em sessões únicas ou múltiplas (Bergman et al., 2006, Fonseca et al., 2008).

3) Resistências Antimicrobianas por *E.faecalis*

Os antibióticos são definidos como produtos naturais ou sintéticos, que inibem o crescimento microbiano ou têm efeitos microbicidas. Estes compostos só podem ser empregues na terapêutica caso não produzam efeitos deletérios significativos sobre o hospedeiro infetado (Sousa et al., 2005).

A resistência é um fenómeno que ocorre como resposta da bactéria, frente a um amplo uso de antibióticos e a sua presença no meio ambiente. A primeira bactéria resistente foi isolada há mais de 60 anos, a partir desse momento as resistências bacterianas difundiram-se por todo o mundo e tornaram-se um problema usual nos cuidados de saúde (Nicolaou et al., 2009).

Anteriormente a resistência bacteriana ocorria, predominantemente, em ambientes hospitalares, mas atualmente este processo está associado a diversos ambientes atingindo a comunidade. Muitas das bactérias adquiriram resistência a pelo menos um antibiótico em três ou mais classes, tornando-se microrganismos multirresistentes (MMR). Consequentemente o tratamento destas infeções tem-se complicado ao longo dos anos, devido às opções limitadas de antibióticos ou mesmo à completa ineficácia dos mesmos (Guimarães et al., 2010).

A resistência bacteriana em meio hospitalar é uma ameaça para a saúde pública e compromete o tratamento apropriado dos pacientes. Durante a prática clínica os médicos

deparam-se muitas vezes com doentes infetados por microrganismos para os quais não há tratamento adequado ou os existentes são limitados. Por isso, a resistência aos antimicrobianos é apontada, pelos profissionais de saúde, como umas das maiores dificuldades da sua prática clínica (Dress et al., 2008, Lepape et al., 2009).

Em hospitais, a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos é cada vez mais urgente e as investigações não têm oferecido perspectivas de resolução do problema. Mais de 70% das bactérias que causam infeções hospitalares são resistentes a pelo menos um dos antibióticos utilizados no seu tratamento. Tendo em conta que a maioria dos medicamentos atualmente utilizados são eficazes durante pouco tempo, a necessidade de novos antibióticos é uma urgência, pois é inevitável escapar a esta problemática (Fischbach et al., 2009).

A resistência bacteriana, para além de comprometer a saúde pública é também um problema a nível económico. Estas infeções não só são mais dispendiosas a nível de fármacos usados no tratamento como no período de tempo de internação que é muito superior ao previsto (Tavares, 2000).

A resistência de uma bactéria a um antibiótico pode ser intrínseca ou extrínseca. A resistência intrínseca ou natural está relacionada com características particulares de cada microrganismo, como a sua estrutura (por exemplo a composição da parede celular ou morfologia) e com a sua fisiologia. Esta é transmitida apenas verticalmente, faz parte da herança genética do microrganismo, não apresentando qualquer risco para a terapêutica, pois é previsível, bastando conhecer o agente etiológico da infeção e os mecanismos de ação do fármaco (Rice et al., 2005, Tenover, 2006).

A resistência extrínseca ou adquirida provêm de mutações ou aquisição de genes de outros microrganismos. Ocorre quando uma bactéria se torna resistente a um fármaco ao qual era suscetível. Existem quatro grandes mecanismos possíveis de resistência (Figura6): alteração do local de ação, mutações enzimáticas que alteram a estrutura química do antibiótico, bomba de efluxo e alteração da permeabilidade da membrana (Sousa, 2005).

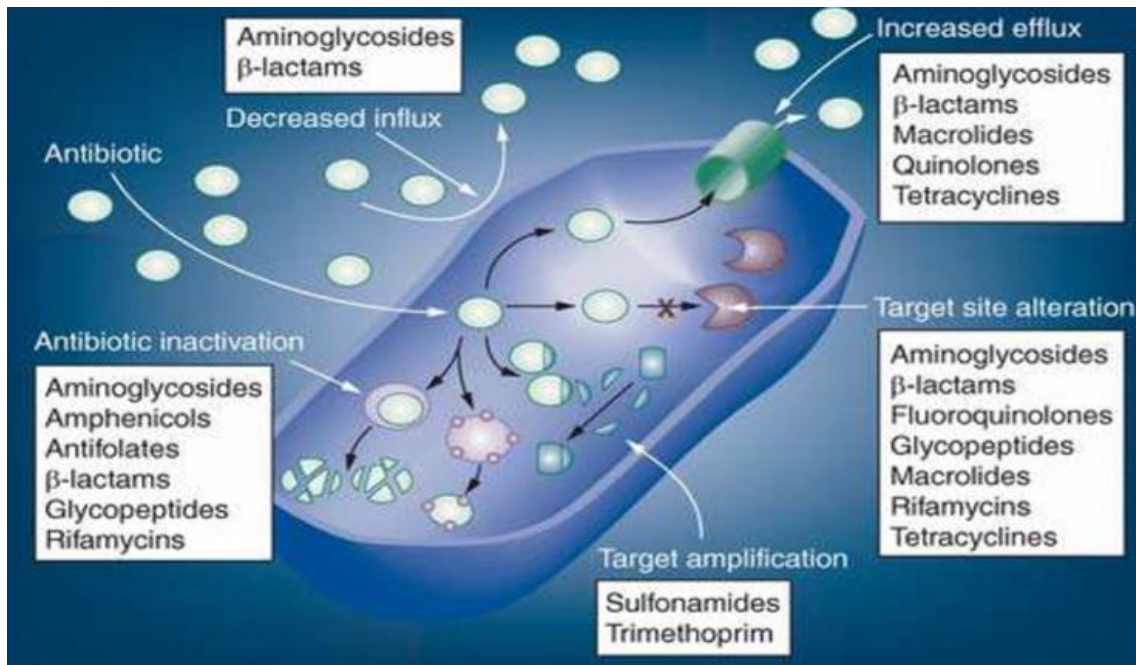


Figura6- Esquema representativo dos mecanismos de resistência para as diferentes classes de antibióticos (Adaptado de Schmieder et al., 2012).

A aquisição do novo material genético pode ocorrer por conjugação, que é a transferência de genes através de um plasmídeo, por transdução, onde a transferência ocorre através de um vírus (bacteriófago), por transformação onde a transferência de genes da célula dadora para a recetora acontece sem contacto entre elas ou por transposição, onde os genes de resistência podem ser transferidos entre plasmídeos, cromossomas ou bacteriófagos através de um trasnposição (Rice et al., 2005, Rossi, 2011).

O elevado número de resistências intrínsecas adicionado à facilidade de aquisição de novos genes, aumenta em larga escala o risco de infeção por *Enterococcus* e a sua disseminação. Possuem assim mecanismos de transferência genética capazes de alterar o gene de transferência consoante o ambiente em questão e troca-lo com espécies filogeneticamente afastadas, incluindo as não patogénicas (Lester at al., 2006).

Este aumento drástico das resistências deve-se também à elevada prevalência de *E.faecalis* em infeções nosocomiais, ocorrendo um maior uso dos antimicrobianos em hospitais, originando resistências aos antibióticos comumente empregues na terapêutica (Ishikawa et al., 2011).

3.1) Principais Resistências Associadas a *E.faecalis*

3.1.1) Resistência aos Glicopéptidos

Os glicopéptidos são uma classe de antibióticos da qual faz parte a vancomicina e teicoplanina. A vancomicina é um antibiótico tricíclico, introduzido na prática médica como alternativa ao tratamento por infecção a estafilococos resistentes à penicilina (Schwartz et al., 2003).

A vancomicina é um bacteriolítico, ativo contra bactérias em crescimento. Atua inibindo a biossíntese do peptidoglicano que compõe a parede celular bacteriana, através de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas ao terminal D-alanil-D-alanina da cadeia peptídica. Como consequência da ausência de transferência das unidades recém sintetizadas para a matriz parietal, acontece a lise da célula bacteriana. Altera também, a permeabilidade da membrana citoplasmática, prejudicando a síntese de RNA. Devido ao seu grande tamanho molecular é incapaz de penetrar na membrana externa de bactérias Gram-negativas (Goodman et al., 2006, Mandel et al., 2009, Sousa, 2005).

A vancomicina foi o primeiro antibiótico, desta classe, a ser utilizado na área clínica e as primeiras resistências foram descobertas apenas 15 anos depois, surgindo assim os primeiros VRE (*Vancomycin-resistant Enterococcus*) (Fisher et al., 2009). Atualmente são várias vezes aplicados em infecções provocadas por bactérias Gram-positivas multiresistentes ou em pacientes alérgicos a antibióticos β -lactâmicos (Costa et al., 2004).

O aumento da resistência à vancomicina tem sido associada à seleção positiva exercida por alguns antibióticos, à transmissão cruzada e horizontal, mas também a uma capacidade de adaptação especial do ambiente hospitalar (Willems et al., 2007).

Diferentes mecanismos de resistência aos glicopéptidos foram descritos. Alguns são adquiridos, como os genes *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, outros são intrínsecos como o fenótipo *vanC* associado a *Enterococcus* móveis (López et al., 2009).

O fenótipo VanA é codificado pelo gene *vanA* e está associado ao alto nível de resistência à vancomicina e teicoplanina. Já o VanB está relacionado com níveis induzíveis de resistência apenas à vancomicina, o fenótipo *vanC* induz baixos níveis de resistência à

vancomicina e susceptibilidade à teicoplanina e o vanD confere resistência moderada a ambos os antibióticos (Werner et al., 2008). A maioria dos *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina apresentam o gene *vanA*. Este é habitualmente adquirido através do transposição Tn1546 que faz parte de um plasmídeo conjugativo, permitindo a sua rápida transferência entre *Enterococcus* e outras bactérias Gram-positivas. A sua capacidade de resistência deve-se à alteração do alvo D-alanil-Dalanina para D-alanil-D-lactato ou D-alanil-D-serina, que se liga precariamente aos glicopéptidos, devido à ausência da ponte de hidrogénio (Figura7) (Cordeiro et al., 2004, Top et al., 2008).

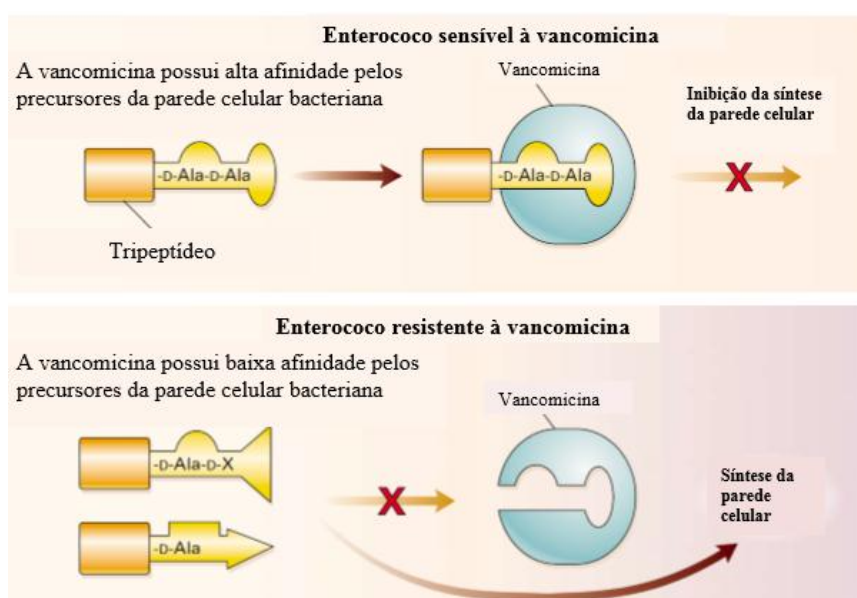


Figura7- Esquema representativo da resistência à Vancomicina por *Enterococcus* (Adaptado de Muray, 2000).

Assim vários estudos têm demonstrado que a causa principal do aumento acentuado de VRE é a transferência do gene *vanA*. Este processo tem inúmeras consequências, tal como a disseminação da resistência à vancomicina não só entre *Enterococcus*, mas também entre outras bactérias, como é o caso de *Staphylococcus aureus*, devido à transferência génica horizontal do transposição Tn 1546 (Figura8), onde está localizado o cluster de genes associados ao fenótipo em questão (Palazzo et al., 2006). Por todos estes motivos, diversos investigadores defendem que a pesquisa de *vanA* deveria ser introduzida nas práticas de controlo em infeções (Pourakbari et al., 2012).

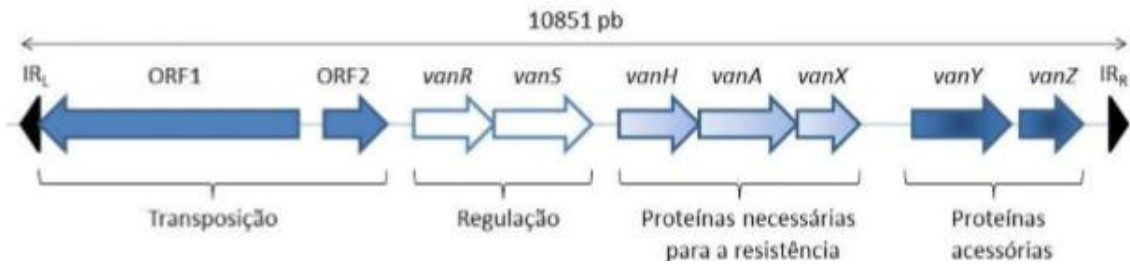


Figura8- Esquema do transposon Tn1546 com os genes associados à resistência VanA. Os IR_L e IR_R são extremidades de repetição. (Adaptado de Arthur et al., 1996).

A estirpe *E.faecalis* V583 representa o primeiro isolado clínico resistente à vancomicina que exibe o fenótipo vanB. Esta estirpe foi a primeira de *Enterococcus* cujo genoma foi totalmente sequenciado e caracterizado, abrindo assim novas possibilidades para obtenção de informações relativas à biologia molecular deste microrganismo (Aakra et al., 2005).

De acordo com os inúmeros estudos realizados com base em *Enterococcus* resistentes à vancomicina, provou-se que a sua prevalência difere de maneira significativa entre regiões geográficas, grupos de pacientes e localização (Wang et al., 2013).

3.1.2) Resistência aos Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são um grupo bastante heterogêneo, do qual fazem parte alguns antibióticos como é o caso da estreptomicina, canamicina, neomicina, gentamicina, sisomicina, ampicilina e isepamicina. São bactericidas de amplo espectro, cujo mecanismo de ação se processa através da ligação ao componente 16S da subunidade 30S ribossomal impedindo a correta ligação com a subunidade 50S, provocando uma leitura errada da mensagem codificada pelo RNA mensageiro. Promovem erros de tradução através da incorporação de aminoácidos inapropriados na cadeia peptídica, levando à morte celular (Bomono et al., 2006). Esta classe de antibióticos pode também incorporar proteínas membranares mal traduzidas na membrana citoplasmática, aumentando a permeabilidade celular e consequentemente elevando a concentração do antibacteriano no interior da célula (Kohanski et al., 2010).

Apresentam eficácia contra microrganismos Gram-negativos e através de sinergismos com outros antibacterianos são usados também no tratamento de infecções por Gram-positivos (Bourgoin et al., 2001).

Apesar da sua importância, esta classe de antibióticos detêm concentrações séricas de doses terapêuticas muito próximas das doses tóxicas, ou seja, têm um baixo índice terapêutico. Causam também alguns efeitos secundários, nomeadamente nefrotoxicidade, ototoxicidade e bloqueio muscular, por isso a sua utilização é limitada (Nash et al., 2002).

Os *Enterococcus* apresentam uma resistência intrínseca a baixos níveis de aminoglicosídeos, pois têm capacidade de diminuir a entrada de antibióticos através da membrana. A aquisição de resistência a níveis elevados é mediada por genes codificadores de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs) que inativam o antibiótico. Este último mecanismo é o mais importante a nível clínico. As enzimas nucleotidiltransferases, acetiltransferases e fosfotransferases, impedem a ação do antibiótico ao transformá-lo num metabolito inativo, resultando em estirpes com valores muito elevados de CMI (concentração mínima inibitória), tornando as bactérias muito resistentes. Estas enzimas eliminam o efeito sinérgico entre as classes antibacterianas que atuam na parede celular como os β -lactâmicos ou glicopeptídeos e quase todos os aminoglicosídeos (Chan, 2008, Emaneini et al., 2008).

A partir de isolados clínicos de *E.faecalis* com elevados níveis de resistência a aminoglicosídeos, vários estudos demonstraram que a maioria possui os genes codificadores das enzimas a cima referidas. Um dos mais importantes é o *aph(2'')*-Ic, codificante de uma fosfotranferase responsável pela resistência à gentamicina, tobramicina, canamicina e dibecacina. Este gene é também responsável pela eliminação do sinergismo ampicilina/gentamicina. A aquisição de resistências a aminoglicosídeos de alto nível é cada vez maior, sendo observada em todo o mundo, principalmente a nível nosocomial (Silva et al., 2013, Zarrili et al., 2005).

3.1.3) Resistências aos β -Lactâmicos

De acordo com a sua estrutura química, os antibióticos β -Lactâmicos estão divididos em penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos, monobactâmicos e inibidores das β -lactamases como o ácido clavulânico, sulbactam, tazobactam (Wang et al., 2010).

Esta classe é bacteriolítica, atuando ao nível da biossíntese da parede celular. Inibe as enzimas transpeptidases, carbopeptidases, transglicosidases, responsáveis pela formação do peptidoglicano. Esta inibição é catalisada pelas PBPs (“*Penicillin-Binding-Protein*”), proteínas que fixam o antibiótico e estão presentes na membrana celular das bactérias. A inibição é atingida devido ao facto dos β -lactâmicos serem análogos do dipéptido terminal D-alanil-D-alanina do peptidoglicano, atuando como substratos das PBPs durante a fase de transcrição. Com esta ligação a estrutura da parede celular fica enfraquecida levando à sua rutura. (Rice et al., 2006, Kohanski et al., 2010).

As bactérias *E.faecalis* apresentam uma resistência adquirida aos β -Lactâmicos. Este atributo difere entre os antibióticos desta classe, sendo as penicilinas, nomeadamente a ampicilina, a surtir um maior efeito contra estes microrganismos, seguidos dos carbapenemos e por fim as cefalosporinas. A resistência às últimas é tao acentuada que não podem ser aplicadas no caso de infeções por *Enterococcus*, correndo o risco de agravar a situação (Lopes et al., 2005).

A primeira resistência adquirida por *E.faecalis* contra os β -lactâmicos foi descrita em 1983, devendo-se à produção de β -lactamases mediadas por plasmídeos transferíveis, codificada pelo gene *blaZ*. Estas enzimas têm uma estrutura semelhante às PBPs e hidrolisam o anel β -lactâmico das penicilinas e cefalosporinas. Criam uma barreira de proteção em redor da bactéria, inativando o antibiótico e impedindo que este se ligue às proteínas alvo (PBPs) (Mundy et al., 2000).

Outro mecanismo de resistência associado a *E.feacalis* baseia-se na alteração ou superprodução de determinadas PBPs. Estas quando alteradas apresentam uma afinidade diminuída a vários antimicrobianos da classe em questão. Originando assim mutações na região de ligação do fármaco, codificadas pelo gene *pbp5*.

As resistências adquiridas aos β -lactâmicos comprometem não só a eficácia desta classe de antibióticos, como também a ação sinérgica com outras classes, por exemplo com os aminoglicosídeos (Marothi et al., 2005, Macbride et al., 2007).

3.1.4) Resistência aos Macrólidos

Os macrólidos são antibióticos usados no tratamento de inúmeras infeções. Esta classe é ativa contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo as mais usuais a

eritromicina, claritromicina, clindamicina, roxitromicina e azitromicina. Por vezes são substitutos das penicilinas em caso de alergias ou outras reações (Cauwerts et al., 2009).

São bacteriostáticos e o seu mecanismo de ação passa pela ligação à subunidade 50S ribossomal, impedindo o processo de transpeptidação e translocação, levando à libertação prematura do péptido. Esta classe inibe então a síntese proteica (Hermann, 2005).

Atualmente vários mecanismos de resistência têm sido associados aos macrólidos, mas o mais preponderante em *E.faecalis* é a metilação de um resíduo de adenina presente na porção 23S da subunidade 50S do RNA ribossomal, através da presença dos genes *ermA*, *ermB*, *ermC* (erythromycin ribosome methylation). Estes genes alteram o local de ligação ao ribossoma, impedindo a entrada do antimicrobiano (Fracalanza et al., 2007).

Outro mecanismo de resistência destes antibióticos acontece devido à presença do gene *mefA* e *mefE*), que codifica uma proteína de efluxo que expulsa o macrólido da bactéria, embora não esteja tao presente em *Enterococcus* (Zou et al., 2011).

Atualmente a maioria dos estudos demonstram que grande parte das amostras isoladas de *E.faecalis* apresenta resistência a eritromicina devido, principalmente, ao gene *erm(B)* e de seguida *erm(A)*, embora este último com muito menos frequência. (López et al., 2009). Em alguns casos mais raros são mesmo identificas os dois tipos de genes *ermA* e *ermB* (Cariolato et al., 2008).

A correlação entre esta resistência e os genes de virulência desenvolvidos pela bactéria tem sido bastante positiva. Alguns investigadores põem até a hipótese de transmissão da resistência juntamente com o fator de virulência entre os microrganismos No caso da resistência à eritromicina o gene de virulência mais determinante e comum é o *gelE* (Velenzuela et al., 2009).

3.1.5) Resistência ao Cloranfenicol

O cloranfenicol é um antibiótico com amplo espectro de ação antimicrobiana, atua através da ligação à subunidade 50S ribossomal, interferindo com a incorporação de novos aminoácidos, inibindo a síntese proteica. Este antibiótico apresenta uma ação

bacteriostática, causa efeitos de toxicidade no fígado e nas células estaminais da medula óssea, por isso o seu uso é muito limitado (Sefton, 2002).

A resistência a este fármaco é habitualmente causada por uma acetiltransferase. Esta enzima é codificada pelo gene *cat*, proveniente tanto de plasmídeos como de cromossomas. Os derivados acetilados do cloranfenicol não conseguem atingir o ribossoma (Marothi et al., 2005). As proteínas CAT são divididas em três tipos CATI, CATII e CATIII, sendo a CATI a mais prevalente em *Enterococcus faecalis* (Biswas et al., 2012).

Atualmente uma grande percentagem de estirpes de *E.faecalis* apresenta resistência ao cloranfenicol, principalmente, quando isoladas a nível hospitalar (Fracalazza et al., 2007). A utilização deste antibiótico, a nível sistémico, tem aumentando nos últimos tempos, como consequência do aparecimento de cada vez mais casos de VRE. O cloranfenicol apresenta eficácia contra estas bactérias, o que quer dizer que o aumento de resistências contra este fármaco pode aumentar muito a gravidade de infeções provocadas por *Enterococcus*. Embora sempre que possível deva ser substituído devido à sua elevada toxicidade e ao alto nível de discrasias sanguíneas (Casal, 2009).

3.1.6) Resistência à Tetraciclina

A tetraciclina é um antibiótico ativo contra bactérias aeróbias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo de efeito bacteriostático amplamente utilizado. Inibe a síntese de proteínas bacterianas, através da ligação à subunidade 30S do ribossoma bacteriano, evitando que o acesso do aminoacil-tRNA ao local recetor no complexo mRNA-ribossoma (Goodman et al., 2006).

Existem 3 tipos de mecanismo principais de resistência contra este tipo de antibiótico. O primeiro é a diminuição de concentração de tetraciclina em consequência de uma diminuição do influxo ou aquisição de bombas de efluxo, devido à presença do gene *tetL*-like. Outro mecanismo é a produção de uma proteína de proteção ribossómica que desloca o antibiótico do seu alvo, pela produção de proteínas RPPS (*ribosome protection proteins*), devido aos genes *tetM*-Like. A terceira resistência é produzida através da inativação enzimática da tetraciclina, devido ao gene *tet(X)*, presente principalmente em plasmídeos (Goodman et al., 2006, Roberts, 2011).

Embora existam mais do que um gene responsável pela produção de proteínas que evitem a ligação da tetraciclina ao ribossoma, o mais comum em *Enterococcus* é o já mencionado *tet(M)*. Este gene é tipicamente cromossômico e transportado pelo transposão Tn916 ou transposões conjugativos relacionados, por vezes é também em alguns plasmídeos conjugativos (Zhanet et al., 2004).

Ao longo dos anos outros genes de resistência foram inseridos nesta família de transposões, carregando dois ou mais genes de resistência ao antibiótico. Por isso o gene *tet (M)* esta muitas vezes relacionado com o gene *erm(B)* que confere resistência aos macrolídeos e lincosamidas. Da mesma forma o gene *tet(M)* esta muitas vezes ligado ao gene *cat* proveniente da resistencia ao cloranfenicol e a uma fosfotransferase que codifica resistência à canamicina. Estas associações ocorrem inúmeras vezes em *Enterococcus*, tornando-os multirresistentes (Cauwerts et al., 2007, Gilmore et al., 2002).

O aumento das resistências à tetraciclina tem sido um assunto cada vez mais sério e debatido nos últimos anos. Várias estirpes isoladas de *E.faecalis* apresentam resistência a este antibiótico (Macribe et al., 2009).

Estudos apontam que a maioria de *Enterococcus faecalis* isolados em hospital, mas também em alimentos, apresentam resistência à tetraciclina, devido principalmente ao gene *tet(M)*. Este gene é o responsável pela elevada percentagem de resistência em quase toda a Europa, incluindo Portugal (Poeta et al., 2005).

3.1.7) Resistência às Quinolonas

As quinolonas são antibióticos com ampla atividade antimicrobiana, mostrando-se eficazes no tratamento de várias doenças infecciosas, a primeira descrita foi o ácido nalidixico. A introdução das quatro quinolonas fluoradas sendo estas a ciprofloxacina, moxifloxacina, norfloxacina e gatifloxacina, representou um grande avanço terapêutico (Goodman et al., 2006).

O seu mecanismo de ação passa pela penetração no citoplasma da bactéria através da camada fosfolipídica ou dos canais de porinas de modo a interferir na síntese dos ácidos nucleicos. Têm como objetivo a inibição da DNA-girase e a topoisomerase IV bacterianas. Para a maioria das bactérias Gram-positiva a topoisomerase IV é o alvo das quinolonas de

3º geração, enquanto que nas Garm-negativas é a DNA-Girase (Onodera et al., 2002, Sousa, 2005).

A resistência a este tipo de antibióticos pode ocorrer por 3 mecanismos: por aumento da impermeabilização da membrana, por diminuição da expressão das porinas OmpF através do efluxo do antibiótico ou através da mutação enzimática do local alvo (Sousa, 2005). As resistências associadas à maioria das bactérias Gram-positivas estão relacionadas com mutações enzimáticas dos genes *gyr(A)*, *gyr(C)*, *gry(D)* no caso do alvo ser a DNA-girase e os genes *parC* e *parE* caso o alvo seja a topoisomerase IV, por vezes ocorre também o efluxo do agente bacteriano (Poeta et al., 2005).

E.faecalis apresenta uma resistência intrínseca a baixas concentrações de quinolonas. A resistência adquirida a maiores concentrações ainda não está totalmente esclarecida. Na maioria dos casos ocorre uma mutação a nível do gene *parC* e *gyrA* do DNA bacteriano (Folquié Moreno et al., 2006).

Atualmente a taxa de resistência à ciprofloxacina é muito elevada em todo o mundo. Estudos concluíram que a maioria das estirpes de *E.faecalis* com alta resistência a este antibiótico foram isolados em meios hospitalares, sendo que grande parte apresentava resistências simultâneas à tetraciclina e eritromicina (Silva et al., 2014).

3.1.8) Resistência às Estreptograminas

As Estreptograminas pertencem ao grupo macrolídeos, lincosaminas e estreptograminas (MLS). Apesar de serem antibióticos quimicamente distintos, apresentam efeitos similares ao nível da inibição da síntese proteica (Bouchami et al., 2011).

A classe das Estreptograminas é composta por micamicinas, pristinamicinas, oestreomicinas e virginamicinas. Durante um longo período, o tratamento de infeções por *Staphylococcus* era feito através do uso oral e tópico de pristinamicinas (Singh et al., 2002).

Atualmente na terapêutica utiliza-se uma associação de duas estreptograminas, a quinupristina, uma estreptogramina B com dalfopristina, uma estreptogramina A, numa proporção 30:70, que atuam de modo sinérgico. Estes compostos são derivados semissintéticos de pristimanicinas de ocorrência natural, produzidas por *Streptomyces*

pristinaespirales. A quinupristina e a dalfopristina são derivadas mais solúveis da pristinamicina IA e da pristimanicina IIA, por isso são apropriados para administração venosa (Goodman et al., 2006, Raad et al., 2004)

Esta associação tem atividade bactericida, embora quando utilizados isoladamente sejam bacteriostáticos. Inibem a síntese proteica, através da ligação à subunidade 50S ribossomal. A quinupristina liga-se ao mesmo local dos macrolídeos, inibe a cadeia polipeptídica e ocorre a terminação precoce da síntese das proteínas, a dalfopristina liga-se a um local próximo e interfere diretamente com a peptidiltransferase, aumentando sinergicamente a ligação da quinupristina. (Solway et al., 2003, Sousa, 2005).

Os principais alvos desta associação são microrganismos resistentes e com poucas opções terapêuticas, pois é eficaz contra inúmeras bactérias incluindo os VRE. Embora alguns microrganismos já tenham adquirido e desenvolvido mecanismos de defesa, entre os quais a modificação enzimática do local alvo, através de uma metiltransferase (Eliopoulos et al., 2005).

A nível de *Enterococcus faecalis* não existem resultados satisfatórios, pois apresentam uma resistência intrínseca a esta classe de antibacterianos. Este facto deve-se a expressão de um gene cromossomal *Isa*, que confere à bactéria resistência à dalfopristina eliminando a atividade sinérgica entre os dois componentes. Este tipo de resistência aplica-se também à clindamicina (Rivero et al., 2007).

3.1.9) Resistência às Oxazolidinonas (Linezolida)

A linezolida é um antibiótico de síntese química da classe das oxazolidinonas. Inibe a síntese proteica, é bacteriostático e por ter um mecanismo de ação diferente não provoca reações cruzadas com outros antibacterianos.

Através da ligação ao local 23S da região P da subunidade ribossomal 50S, impede a formação do complexo fMet-tRNA-ribossómico, que dá início à síntese proteica. Devido ao seu mecanismo diferente, este antibiótico é ativo contra a maioria dos microrganismos Gram-positivos (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, cocos anaérobios e Bastonetes) e bactérias multirresistentes, como é o caso dos *Enterococcus* resistentes à vancomicina (Goodman et al., 2006, Sousa, 2005).

Embora seja um antibiótico recente, já existem bactérias munidas de resistências contra este mecanismo de ação alterado. Vários microrganismos isolados têm apresentado resistência a este antibacteriano, incluindo *E.faecalis*. Neste caso o processo passa pela mutação do 23S o rRNA, resultando de uma diminuição da afinidade de ligação. Visto que existem múltiplas cópias de genes de rRNA de 23S, a resistência exige mutações em duas ou mais (Livermore et al., 2007).

A lizenolida foi o primeiro antibiótico do grupo das oxazolidinonas a ser aprovado. Atualmente apenas é permitido para uso hospitalar, apresentando alta eficácia no tratamento de infecções graves. Nos últimos anos têm sido relatados poucos casos de *E.faecalis* resistentes a este antibacteriano (Long et al., 2012).

Alguns estudos demonstram que a maioria dos casos de *E.faecalis* resistentes a este antibacteriano são isolados de pacientes previamente infetados com outras bactérias e já tratados com linezolida. Sendo assim, a resistência é adquirida mais rapidamente caso o paciente já tenha sido exposto ao fármaco. Embora casos de resistência sem exposição prévia também já tenham sido relatados, o que pode significar que a resistência pode já estar entre a população de *Enterococcus* (Auckland et al., 2002, Gomez-Gil et al., 2009).

E.faecalis contem quatro cópias do gene 23S rRNA e vários grupos investigadores têm constatado uma relação direta entre o número de alelos contendo a mutação G25761 e o nível de resistência à linezolida. Esta mutação cria um novo local para a enzima de restrição Nhe1 nas cópias mutados do operão rRNA, este sítio está ausente nos genes não mutados (Wang et al., 2014).

4) Métodos para diminuir a disseminação Bacteriana a nível Hospitalar

Embora o arsenal terapêutico antimicrobiano se tenha expandido de forma acelerada, a investigação não consegue competir com a capacidade bacteriana de desenvolver e adquirir novas resistências.

O uso excessivo e durante largos períodos de tempo de antibióticos juntamente com a sua toxicidade e efeitos adversos levam a consequências muito graves para a saúde pública, tal como o aumento da morbidade e mortalidade, a disseminação de microrganismos

resistentes, o aumento de infecções e os elevados custos associados aos cuidados prestados em saúde. Tendo em conta que 25 a 50% dos pacientes internados são sujeitos a terapias antimicrobianas este é um assunto urgente nos dias que correm (Pittet et al., 2008).

Os *Enterococcus*, comparativamente com outros géneros bacterianos, têm-se revelado um desafio a nível hospitalar ao longo das últimas décadas. Inúmeras estratégias têm vindo a ser adotadas com o objetivo de controlar o desenvolvimento e propagação desta bactéria. (Freitas et al., 2006).

Tradicionalmente são apresentadas três categorias de fatores de risco associados à aquisição de infecções hospitalares sendo estes: fatores inerentes ao próprio paciente, fatores relacionados com os procedimentos invasivos e condições do ambiente hospitalar. Através da análise dos pontos referidos devem ser orientadas e implementadas medidas para controlar essas infecções (Richards et al., 2003).

A vigilância epidemiológica é outro ponto crucial no sentido de controlar as infecções nosocomiais, estabelecendo taxas endémicas, através da monitorização contínua dos casos hospitalares. A partir deste processo pode-se estabelecer uma relação causa- efeito de surtos e casos isolados (Arantes et al., 2003).

As bactérias que causam infecções hospitalares podem ser adquiridas de várias maneiras, tendo em conta que geralmente a fonte primária provém de um indivíduo infetado que é internado ou de um profissional de saúde também infetado (Michalopoulos et al., 2006, WHO).

Estas podem ser oriundas da flora comensal ou transitória do paciente, quando as bactérias migram do seu habitat natural através da terapêutica ou danos nos tecidos, causando infecções endógenas. Podem, também, ser transmitidas a partir da flora de outro paciente ou de um membro hospitalar, causando infecções exógenas. A transmissão acontece através de contacto direto ou por objetos contaminados pelo paciente como equipamentos, lençóis ou curativos de feridas. Outro meio de propagação é a meio ambiental do próprio hospital, estas bactérias podem-se encontrar na água, áreas húmidas, em equipamentos médicos, nos alimentos ou mesmo em partículas do ar (Lawrence et al., 2007).

No caso dos pacientes, alguns fatores são determinantes para contraírem a infecção. Os mais relevantes são a idade, o estado de imunidade, qualquer patologia subjacente, e as intervenções a nível de diagnóstico e terapêuticas aplicadas. As crianças e idosos são grupos de maior risco, devido à sua menor resistência. Pacientes com doenças crónicas, como tumores malignos, leucemia, Diabetes Mellitus apresentam uma maior vulnerabilidade, assim como aqueles cuja terapêutica passa pela administração de fármacos imunodepressores ou estão sujeitos a radiações (WHO).

A prevenção e controlo da transmissão de Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde (IACS) baseia-se na implementação de uma estratégia de boas práticas e a sua monitorização (Figura9), tendo em conta alguns pontos fundamentais baseadas nas Precauções Básicas, tais como (Dias., 2010):

- Higiene das mãos - Este passo é vital na prestação de cuidados ao doente, pois as mãos são o veículo mais comum de transmissão cruzada de agentes infecciosos relacionados com as IACS apresentando uma elevada relação custo-benefício. A higienização das mãos constitui uma ação simples e rápida e continua a ser uma das principais medidas para reduzir estas infeções em todo o mundo;
- Uso apropriado de equipamento de proteção individual - O uso adequado do equipamento diminui o risco dos profissionais de saúde adquirirem os microrganismos a que estão expostos. A utilização de luvas, batas, máscaras e proteção ocular/facial é um procedimento padronizado para os profissionais que contactam com pacientes infetados;
- Desinfecção e esterilização dos dispositivos médicos;
- Boas práticas nos procedimentos invasivos, como utilização de técnica asséptica;
- Controlo do ambiente hospitalar - O ambiente hospitalar desempenha um papel crucial de reservatório de microrganismos, aumentando a exposição dos doentes aos diferentes patogénicos;
- Correta utilização e rejeição objetos corto-perfurantes e resíduos hospitalares;
- Higiene respiratória e etiqueta da tosse;
- Colocação correta de doentes conforme a patologia em causa;
- Uso racional de antimicrobianos;

- Práticas seguras para administração injetáveis;
- Plano de vacinação

Todos os profissionais de saúde devem conhecer e aplicar as precauções básicas de modo a prevenir e controlar infeções em todas as situações (Lawrence et al., 2007, Pina et al., 2010).

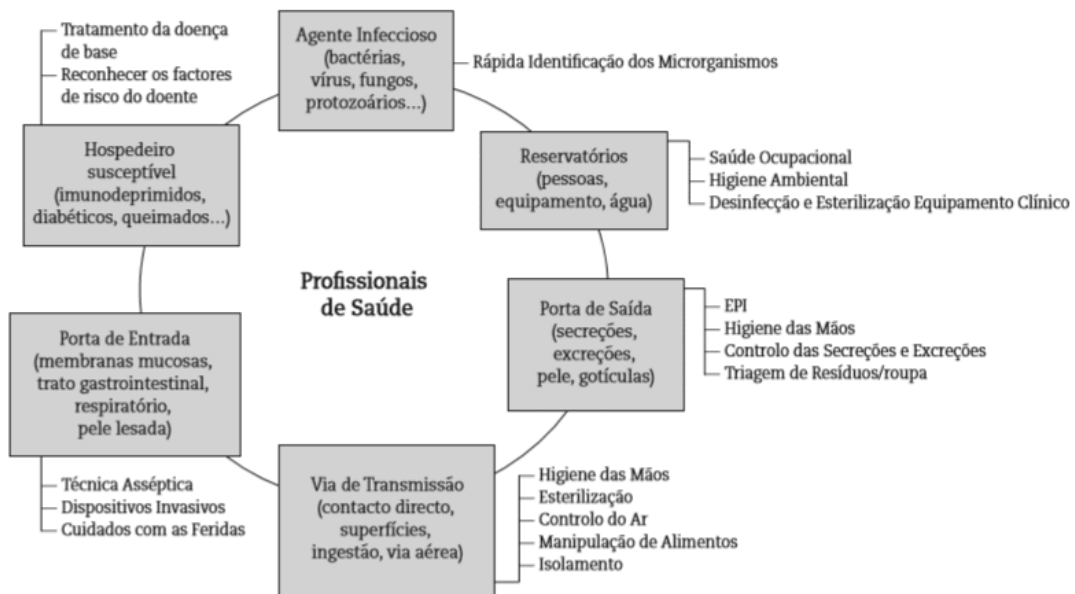


Figura9- Esquema de transmissão de Infeções e respetivas Precauções (Adaptado de Pina et al., 2010).

O uso racional de antibióticos é então uma das maiores preocupações da medicina moderna. Devido à importância da questão, existem atualmente vários hospitais com comissões de antibioterapia que definem linhas de racionalização e orientação para a prescrição de antibióticos. Estes devem ser utilizados por razões terapêuticas de 3 modos: específico, ou seja, de acordo com a suscetibilidade microbiana, de maneira empírica ou para fins profiláticos (Tunger et al., 2009).

De acordo com os critérios de escolha do antibiótico, o princípio básico da terapia é a determinação do agente causal da infeção e a sua sensibilidade aos antimicrobianos, pois as possibilidades etiológicas são múltiplas e os perfis de sensibilidade muito variáveis. Assim é imprescindível a elaboração de testes laboratoriais para uma maior efetividade da terapêutica e diminuição da probabilidade de desenvolvimento de resistência (Deresinski, 2007, Kollef et al., 2005).

O uso desnecessário de antimicrobianos nas várias vertentes de aplicação deve ser totalmente evitado. Existem inúmeros métodos para conseguir antever esta necessidade, havendo até a possibilidade de distinguir colonização e infecção, devendo só ser instituída terapêutica no segundo caso (Fiol et al., 2010).

Uma grande parte das aplicações antimicrobianas tem um objetivo profilático, são utilizados para prevenir o desenvolvimento de uma infecção por microrganismos específicos aos quais estão expostos. Esta técnica trouxe grandes benefícios para os doentes e uma melhor relação custo-benefício desses fármacos. Apesar de vantagens, o uso inadequado desta técnica tem promovido um grande aumento de resistências bacterianas. Muitos profissionais de saúde optam por antibióticos de espectro mais alargado do que o necessário (privilegiando os fármacos de última geração) e aumentam o período de administração com o objetivo de conseguir maior segurança. Estes erros promovem assim a seleção de bactérias resistentes e expõem os pacientes a um maior risco de efeitos secundários (Bratzler et al., 2004, Fiol et al., 2010).

A prescrição de doses adequadas, em intervalos corretos e otimização das condições para serem obtidos níveis certos de concentração no local de infecção são variáveis determinantes na eficácia do resultado final (Kollef et al., 2005).

Visto que o uso prolongado de antibióticos aumenta o risco de infecção por microrganismos multirresistentes, atualmente tem-se optado por um conceito de ciclos curtos de terapêutica antimicrobiana, que não exceda os 8 dias, exceto nos casos de bacteriemia sobretudo na presença de material protésico (Deresinski, 2007).

Diversas razões justificam a necessidade urgente de novos agentes antibacterianos. O aumento das resistências hospitalares e consequente taxa de mortalidade levam à necessidade de agentes que atuem por mecanismos de ação diferentes dos fármacos em uso. Nos últimos 10 anos somente foram aprovados a linezolid e a doxamicina com novos mecanismos de ação. Os investigadores têm investido em fontes naturais ainda pouco exploradas, pois organismos obtidos de novos ecossistemas estão associados à nova diversidade química, com resistências a alterações drásticas de temperatura, pH e humidade (Guimarães et al., 2010).

5) Conclusão

De acordo com este estudo de revisão bibliográfica conclui-se que *Enterococcus faecalis* representa uma grande ameaça para a saúde pública, nomeadamente a nível hospitalar. Esta bactéria detém inúmeros atributos que a tornam uma das espécies com taxas de mortalidade mais elevadas entre as infeções nosocomiais.

Uma grande quantidade de fatores de virulência permite que este microrganismo, colonize todo o tipo de tecidos e materiais, infetando com relativa facilidade diversos órgãos, implantes, próteses e até cateteres. Esta defesa auxilia-o a resistir a um largo espectro de temperaturas, pH e concentrações salinas. *E.faecalis* sobrevive em ambientes hostis, inclusivamente situações de subnutrição, através da modelação dos fatores de virulência a cada situação.

Devido à sua elevada capacidade mutagénica, consegue adaptar-se a novas condições contornando e por vezes controlando o sistema imunitário do hospedeiro.

As suas resistências inatas e adquiridas a numerosas classes de antibióticos seleciona desde logo a sua terapêutica, mas na atualidade é a capacidade de adquirir e desenvolver novas resistências que preocupa os investigadores e profissionais de saúde.

Nas últimas décadas *E.faecalis* tem demonstrado elevadas capacidades de aquisição de múltiplas resistências, tornando-se um microrganismo multirresistente a quase todos os mecanismos de antibioterapia, inclusivamente aos de última geração.

Tendo em conta a gravidade da problemática, é urgente que todos os profissionais de saúde adaptem medidas de prevenção, com o objetivo de controlar e minimizar a disseminação desta bactéria. Por isso, em meio hospital é crucial ter em conta todos os cuidados básicos interpessoais e higiénicos.

A necessidade de novos meios terapêuticos é cada vez mais alarmante entre as infeções nosocomiais. É crucial que uso racional de antibióticos seja uma prática realizada em todas as instituições de saúde. A prescrição destes fármacos deve ser feita, sempre que possível, baseada em testes laboratórios, administrando sempre o antibiótico mais específico possível para cada situação, tendo em conta a concentração correta e duração do tratamento.

Caso estas e outras medidas não sejam adotadas rapidamente, a bactéria tornar-se-á resistente a todos os antibacterianos desenvolvidos até então, originando uma catástrofe sem solução ao nível de infeções bacterianas.

6) Bibliografia

- Aakra, A. et al. (2005). Transcriptional response of *Enterococcus faecalis* V583 to erythromycin. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 49, pp.2246-2259.
- Aberna, R. e Prabakaran, K. (2011). Evaluation for the association of virulence determinants among *E. faecalis* with its clinical outcome. *Int J Biol Med Res*, 2(2), pp.523-527.
- Andersen, B. et al. (2009). Hospital-acquired infections before and after healthcare reorganization in a tertiary university hospital in Norway. *Journal of Public Health*, 31, pp. 98-104.
- Arantes, A. et al. (2003). Uso de diagramas de controle na vigilância epidemiológica das infeções hospitalares. *Revista de Saúde Pública*, 37(6), pp.768-774.
- Arciola, C. R. et al. (2007). The role of *Enterococcus faecalis* in orthopaedic peri-implant infections demonstrated by automated ribotyping and cluster analysis. *Biomaterials*, 28, pp.3987-3995.
- Arias, C. A. et al. (2007). Evaluation of ceftobiprole medocaril against *Enterococcus faecalis* in a mouse peritonites model. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 60, pp.594–598.
- Arthur, M. et al. (1996). Mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *Journal of Infection*, 32(1), pp.11-16.
- Aslam, M. (2010). Characterization of antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. Recovered from a commercial beef processing plant. *Foodborne Pathogens disease*, 7(3), pp.235-241.
- Auckland, C. et al. (2002). Linezolid-resistant enterococci: report of the first isolates in the United Kingdom. *Journal Antimicrob Chemotherapy*, 50, pp.743–746.
- Baik, J. E. (2008). Lipoteichoic Acid Partially Contributes to the Inflammatory responses to *Enterococcus faecalis*. *Journal Endodontic*, 34, pp.975-82.
- Baldassarri, L. et al. (2005). Pathogenesis of implant infections by enterococci. *The International Journal of Artificial Organs*, 28, pp.1101-1109.

- Basrani, B. et al. (2003). Efficacy of chlorhexidine- and calcium hydroxide-containing medicaments against *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*, 96, pp.618-624.
- Bennett, R. J. e Dunny, G. M. (2010). Analogous Telesensing Pathways Regulate Mating and Virulence in Two Opportunistic Human Pathogens. *Mbio*, 1(4), pp.1-6.
- Bergmans, L. et al. (2006). Bactericidal effect of Nd:YAG laser irradiation on some endodontic pathogens ex vivo. *International Endodontic Journal*, 39(7), pp.547-557.
- Billstrom, H. et al. (2008). Virulence and antimicrobial resistance in *Enterococcus faecium*. *Int.J. Antimicrobiol*, 32, pp.374-377.
- Biswas, T. et al. (2012). The structural basis for substrate versatility of chloramphenicol acetyltransferase CATI. *Protein Science*, 21(4), pp.520-530.
- Bonono, R. A. e Szabo, D. (2006). Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical infectious Diseases*, 43(2), pp.49-56.
- Bouchami, O. Achour, W. e Hassen, A.B. (2011). Prevalence of resistance phenotypes and genotypes to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics in Gram-positive cocci isolated in Tuniisian Bone Marrow transplant center. *Pathologic Biologie*, 59, pp.199-206.
- Bourgogne, A. et al. (2010). Bicarbonate enhances expression of the endocarditis and biofilm associated pilus locus, *ebpR-ebpABC*, in *Enterococcus faecalis*. *BMC Microbiology*, 10 (17), pp.1-13.
- Bourgoin, A. Leone, M. e Martin, C. (2001). Role of glycopeptides in the treatment of septic complications after cardiac surgery. *Journal of Chemotherapy*, 1(1), pp.112-118.
- Burley, K. M e Sedgley, C. M. (2012). CRISPR-Cas, a Prokaryotic Adaptive Immune System, in Endodontic, Oral, and Multidrug-resistant Hospital-acquired *Enterococcus faecalis*. *JOE*, 38(11), pp.1511-1515.
- Campoccia, D. Montanaro, L. e Arciola, C. R. (2006). The significance of infection related to orthopaedic devices and issues of antibiotic resistance. *Biomaterials*, 27(11), pp.2331–2339.

- Carlos, A. R. Semedo-Lemsaddek, T, Barreto-Crespo, M. T. e Tenreiro, R. (2010) Transcriptional analysis of virulence-related genes in enterococci from distinct origins. *Journal of Applied Microbiology*, 108(5), pp.1563-1575.
- Cariolato, D. Andrighetto, C. e Lombardi, A. (2008). Occurrence of virulence factors and antibiotic resistances in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* collected from dairy and human samples in North Italy. *Food Control*, 19, pp.886-892.
- Casal, M. M. et al. (2009). Investigacion de la resistências a antimicrobianos en *Enterococcus faecalis*. *Revista Espanola de Quimioterapia*, 22(3), pp.117-119.
- Cauwerts, K. (2007). High prevalence of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from broilers carrying the *erm(B)* gene. *Avian Pathology*, 36(5), pp.395-399.
- Chan, Y. Y. (2008). Low prevalence of vancomycin and bifunctional aminoglycoside-resistant enterococci isolated from poultry farms in Malaysia. *International Journal of Food Microbiology*, 122, pp.221-226.
- Coburn, P.S. e Gilmore, M.S. (2003). The *Enterococcus faecalis* cytolysin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. *Cellular Microbiology*, 5(10), pp. 661-669.
- Cordeiro, J.C.R. et al. (2004). Inter-hospital dissemination of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecalis* in Brazil. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(3), pp.260-262.
- Costa, D. et al. (2004). Detection of CTX-M-1 and TEM-52 -lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy pets in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54, pp.960-961.
- Cox, C.R. Coburn, P.S. e Gilmore, M.S. (2005). Enterococcal cytolysin: a novel two component peptide system that serves as bacterial defense against eukaryotic and prokaryotic cells. *Current Protein and Peptide Science*, 6(1), pp.77-84.
- Dahlén, G. et al. (2012). Virulence factors and antibiotic susceptibility in enterococci isolated from oral mucosal and deep infections. *Journal of Oral Microbiology*, 4, pp.1-7.
- Deng, D. et al. (2009). Influence of *Streptococcus mutans* on *Enterococcus faecalis* Biofilm formation. *JOE*, 35, pp. 1249-1251.

- Deresinsli, S. (2007). Principles of Antibiotic Therapy in Severe Infections: Optimizing the Therapeutic Approach by Use of Laboratory and clinical data. *CID*, 45(3), pp.177-183.
- Di Rosa, R. et al. (2006). Relationship between biofilm formation, the enterococcal surface protein (Esp) and gelatinase in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *FEMS Microbiol Lett*, 256, pp.145–150.
- Dias, C. S. (2010). Prevenção da Infecção Nosocomial. *Revista Port Med Int*, 17(1), pp.47-53.
- Direcção-Geral da Saúde (2007). PROGRAMA NACIONAL DE PREVENÇÃO E CONTROLO DA INFEÇÃO ASSOCIADA AOS CUIDADOS DE SAÚDE. [Em linha]. Disponível em < <http://www.dgs.pt/upload/membro.id/ficheiros/i008902.pdf>>. [Consultado em 12/05/14].
- Dibo, I. et al. (2004). Linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* isolated from a cord blood transplant recipient. *J Clin Microbiol*, 42, pp.1843-1845.
- Drees, M. et al. (2008). Prior environmental contamination increases the risk of acquisition of vancomycin-resistant enterococci. *Clin Infect Disease*, 46(5), pp.678-685.
- Eaton, T. J. e Gasson, M. J. (2001). Molecular screening of *Enterococcus* spp. virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, pp.1628-1635.
- Eliopoulos, G. M. Ferraro, M. J. Wennersten, C. B. e Moellering, R. C. (2005). In vitro activity of na oral streptogramin antimicrobial, XRP2868, against gram-positive bacteria. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 49(7), pp.3034-3039.
- Emanini, M. et al. (2008). Characterization of Glycopeptides, Aminoglycosides and Macrolide resistance among *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from hospitals in Tehran. *Polish Journal of Microbiology*, 57(2), pp.173-178.
- Estévez, A.C. et al. (2010). Características clínicas diferenciales entre las bacteriemias por *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*. *Enfermedades infecciosas y Microbiología clínica*, 28(6), pp.342-348.
- Facklam, R. (2002). What Happened to the Streptococci: Overview of Taxonomy and Nomenclature changes. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(4), pp.613-630.

- Fernandez, M. L.G, et al. (2007). Enterococcal endocarditis on native and prosthetic valves: a review of clinical and prognostic factors with emphasis on hospitalacquired infections as a major determinant of outcome. *Medicine*, 86, pp.363–377.
- Fiol, F. S. et al. (2010). Perfil de prescrições e uso de antibióticos em infecções comunitárias. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 43(1), pp.68-72.
- Fischbach, M. A. e Walsh, C. T. (2009). Antibiotics for Emerging Pathogens. *Science*, 325(5944), pp.1089-1093.
- Fisher, K. e Philips, C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, 155, pp.1749-1757.
- Fracalanza, S.A.P. et al. (2007). Antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from poultry meat and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102(7), pp.853-859.
- Freitas, M. C. S. et al. (2006). Prevalence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* colonization among kidney transplant patients. *BMC Infectious Diseases*, 6(133), pp.1-7.
- Fonseca, M. et al. (2008). Photodynamic therapy for root canals infected with *Enterococcus faecalis*. *Photomed Laser Surgery*, 26(3), pp.209-213.
- Foulquié Moreno, M. et al. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 106, pp.1-24.
- Gilmore, M.S. Kobayakawa, S. e Jett, B.D. (2005) .Biofilm formation by *Enterococcus faecalis* on IOLS. *Current Eye Research*, 30, pp.741-745
- Gomes, B. P. F.A. et al. (2008). Microbial Analysis of Canals of Root-filled Teeth with Periapical Lesions Using Polymerase Chain Reaction. *Journal of Endodontics*, 34(5), pp.537-540.
- Gómez-Gil, R. et al. (2009). Nosocomial outbreak of linezolid-resistance *Enterococcus faecalis* in a tertiary care hospital. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 65, pp-175-179.
- Goodman, L. S. Brunton, L. L. e Lazo, J. S. (2006). *Goodman e Gilman As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. Rio de Janeiro, Ed. McGraw-Hill.

- Guimarães, D. O. Momesso, L. S e Pupo, M. T. (2010). Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para adescoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Quim.Nova*, 33(3), pp.667-6679.
- Hermann, T. (2005). Drugs targeting the ribosome. *Current Opinion in Structural Biology*,15(3), pp.355–366.
- Hendrix, A.P.A. et al. 2009. LPxTG surfasse proteins of enterococci. *Trends in Microbiology*, 17(9), pp. 423-430.
- Hidron, A.I. (2008). Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: anual summary of data reported to the national healthcare safety network at the centres for disease control and prevention. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 29(11), pp.996-1011.
- Hynes, W. e Walton, S. (2000). Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Lett*,183, pp.201-207.
- Ishikawa, K. et al. (2011). The nationwide study of bacterial pathogens associatedwith urinary tract infections conducted by the Japanese Society of Chemotherapy. *J. Infect. Chemotherapy*, 17, pp.126–138.
- Izumi, E. et al. (2005). Hemagglutinating and hemolytic activities of *Enterococcus faecalis* strains isolated from diferente human clinical sources. *Research in Microbiology*, 156, pp.583-587.
- Johansson, D. e Rasmussen, M. (2012). Virulence factos in isolates of *Enterococcus faecalis* from infective endocarditis and from the normal flora. *Microbial Pathogenesis*, 55, pp.28-31.
- Kayaoglu, G. e Orstavik, D. (2004). Virulence factos of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, 15, pp.308-320.
- Klein, G. (2003). Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and gastro-intestinal tract. *International Journal of Food Microbiology*, 88, pp. 123-131.
- Kainer, P. et al. (2007). Response to emerging infection leading to outbreak of linezolid-resistant enterococci. *Emerg Infect Dis*,13, pp.1024-1030.

- Kobayakawa, S. Jett, B.D e Gilmore, M.S. (2005). Biofilme formation of *Enterococcus faecalis* on intraocular lens material. *Current eye research*, 30(9), pp. 741-745.
- Koch, S. Hufnagel, M. Theilacker, C. e Huebner, J. (2004). Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine* 22(7), pp. 822–830.
- Kohanski, M. A. Dwyer, D. J. e Collins, J. J. (2010). How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*, 8, pp.423-435.
- Kollef, M.H. e Micek, S.T. (2005). Strategies to prevent antimicrobial resistance in the intensive care unit. *Crit Care Medical*, 33, pp.1845–1853.
- Kong, K. F. Vuong, C. e Otto, M. (2006). *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. *Int J Med Microbiol*, 296, pp.133-139.
- Lance, R. et al. (2010). Gelatinase Contributes to the Pathogenesis of Endocarditis caused by *Enterococcus faecalis*. *Infection and Immunity*, 78(11), pp.4936-4943.
- Lawrence, S. et al. (2007). *Clostridium difficile* in the intensive care unit: epidemiology, costs, and colonization pressure. *Infect Control Hosp Epidemiology*, 28. (2), pp.123-130.
- Lebreton, F. et al. (2009). Ace, Which encodes an adhesin in *Enterococcus faecalis*, is regulated by Ers and is involved in virulence. *Infection and Immunity*, 77(7), pp.2832-2839.
- Lepape, A. et al. (2009). Experience of European Intensive Care Physicians With Infections due to Antibiotic-Resistant Bacteria. *Eurosurveillance*, 14(45), pp.1-3.
- Lewis, K. (2001). Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 45(4), pp.999–1007.
- Lester, C. H. et al. (2006). In vivo transfer of the *vanA* resistance gene from an *Enterococcus faecium* isolate of animal origin to an *E. faecium* isolate of human origin in the intestines of human volunteers. *Antimicrob Agents Chemotherapy*, 50, pp.596-599.
- Livermore, D. M. et al. (2007). In vitro activity of oxazolidinone RWJ-416457 against linezolid-resistant and susceptible staphylococci and enterococci. *Antimicrobiol Agents Chemotherapy*, 51, pp.1112-1114.
- Long, K. S. e Vester, B. (2012). Resistance to linezolid caused by modifications at its binding site on the ribosome. *Antimicrobiol Agents Chemotherapy*, 56, pp.603-612.

- Lopes, M. F. S. et al. (2005). Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci. *International Journal of Food Microbiology*, 103, pp.191-198.
- Lopes, M. F. S. et al. (2006) Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci. *International Journal of Food Microbiology*, 112, pp.208-214.
- Lopes, M. F. S. et al. (2009). Detection of VanA and VanB2- containing enterococci from food samples in Spain, including *Enterococcus faecium* strains of CC17 and the new singleton ST425. *International Journal of Food Microbiology*, 133, pp.172-178.
- Macbride, S. M. et al. (2007). Genetic Diversity among *Enterococcus faecalis*. *Plos One*, 2(7), pp.1-22.
- Macbride, S. M. et al. Genetic variations and evolution of the pathogenicity Island of *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*, 191(10), pp.3392-3402.
- Mandlik, A. et al. (2008). Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development. *Trends Microbiol*, 16(1), pp.33–40.
- Marothi, Y. Agnihotri, H. e Dubey, D. (2005). Enterococcal resistance – an overview. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 23(4), pp.214-219.
- Marinho, R.A. Martins, D.P. Ditmen, E.M. Azevedo, P.A. Frazzon, J. Van Der Sand, S.T. Frazzon, A.P.G. (2013). Biofilm formation on polystyrene under different temperatures by antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from food. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, pp.423-426.
- Martin, B. Corominas, L. Garriga, M. e Aymerich, T. (2008). Identification and tracing of *Enterococcus* spp. By RAPD-PCR in traditional fermented sausages and meat environment. *Journal Appl Microbiology*, 106, pp.66-77.
- Mandel, G. L. Bennett, J. E e Dolin, R. (2009). *Principles and practice of Infectious Diseases*, Philadelphia, Ed. Churchill Livingstone.
- Michalopoulos, A. et al. (2006). Frequency, characteristics, and predictors of microbiologically documented nosocomial infections after cardiac surgery. *Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 29, pp.456-470.

Mohamed, J.A. e Huang, D.B. (2007). Biofilm formation by enterococci. *Journal of Medical Microbiology*, 56, pp.1581-1588.

Mohamed J.A. e Huang, D.B. (2007). The enterococcal surface protein, Esp, is involved in a *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Journal of Medical Microbiology*, 56, pp.1581-1588.

Mundy, L. M. Sahm, D. F. e Gilmore, M.S. (2000). Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 13, pp.513-522.

Murray, B. E. (2000). Vancomycin-Resistant Enterococcal Infections. *The New England Journal of Medicine*, 342, pp.710-721.

Nacif, M. C. A. M. e Alves, F. R. F. (2010). *Enterococcus faecalis* na Endodontia: um desafio ao sucesso. *Revista brasileira de odontologia*, 67(2), pp.209-214.

Nakayama, J.et. al. (2002). Description of a 23.9-Kilobase chromosomal deletion containing a region encoding *fsr* genes which mainly determines the gelatinase-negative phenotype of clinical isolates of *Enterococcus faecalis* in urine. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), pp.3152-3155.

Nakajo, K. et al. (2006). Resistance to acidic and alkaline environments in the endodontic pathogen *Enterococcus faecalis*. *Oral Microbiol Immunol*, 21(5), pp.283-288.

Nallapareddy, S. R. et al. (2006). Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*. *J Clin Invest*, 116(10), pp.2799–2807.

Nash, K. Hafeez, A. e Hou, S. (2009). Hospital-acquired renal insufficiency. *Am Journal Kidney Diseases*, 39(5), pp.930-936.

Nicolaou, K. C. et al. (2009). Recent Advances in Chemistry and Biology of Naturally occurring Antibiotics. *Angew Chem Int ed Engl*, 48(4), pp.660-719.

Ogier, J.C. e Serror, P. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126, pp. 291-300.

Omar, B.N. et al. 2004. Functional and safety aspects of enterococci isolated from different Spanish foods. *Syst Appl Microbiol*, 27, pp.118-130.

- Onodera, Y. Okuda, J. Tanaka, M. e Sato, K. (2002). Inhibitory activities of quinolones against DNA gyrase and topoisomerase IV of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemotherapy*, 46, pp.1800-1804
- Ortega, M. et al. (2013). Epidemiology and prognostic determinants of bacteraemic catheter-acquired urinary tract infection in a single institution from 1991 to 2010. *Journal of Infection*, 67, pp.282-287.
- Palazzo, I. C. V. et al. (2006). Evaluation of clonality in enterococci isolated in Brazil carrying Tn1546 –like elements associated with vanA plasmids. *FEMS Microbiology Letters*, 258(1), pp.29-36.
- Paradella, T. C. Koga-Ito, C.Y. e Jorge, A.O.C. (2007). *Enterococcus faecalis*: considerações clínicas e microbiológicas. *Revista de Odontologia da UNESP*, 36(2), pp.163-168.
- Pillai, S. K. et al. (2004). Effects of glucose on *fsr*-mediated biofilm formation in *Enterococcus faecalis*. *J Infect Dis*, 190, pp.967–970.
- Pina, E. Ferreira, E. Marques, A. e Matos, B. (2010). Infecções associadas aos cuidados de saúde e segurança do doente. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*, 10, pp.27-39.
- Pittet, D. et al. (2008). Infection control as a major World Health Organization priority for developing countries. *J Hosp Infectious*, 68(4), pp.285-292.
- Poly, A. et al. (2010). Efeito antibacteriano dos lasers e terapia fotodinâmica contra *Enterococcus faecalis* no sistema de canais radiculares. *Revista de Odontologia da UNESP*, 39(4), pp.233-239.
- Portenier, I. Waltimo, T. e Haapasalo, M. (2003). The root canal survivor and Star in Post- treatment disease. *Endodontic Topics*, 6, pp.135-139.
- Poeta, P.D. et al. (2005). Characterization of antibiotic resistance genes and virulence factors in faecal enterococci of wild animals in Portugal. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 52(9), pp.396-402
- Pourakbari, B. et al. (2012). High Frequency of Vancomycin- Resistant *Enterococcus Faecalis* in an Iranian Referral Children Medical Hospital. *Journal of Clinical Medicine*, 7(3), pp.201-204.

- Qin, X. Singh, K. V. Weinstock, G. M. e Murray, B. E. (2001). Characterization of *fsr*, a regulator controlling expression of gelatinase and serine protease in *Enterococcus faecalis* OG1RF. *J Bacteriology*, 183, pp.3372–3382.
- Raad, I. I. et al. (2004). Clinical use associated decrease in susceptibility of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* to linezolid : a comparison with Quinupristin-Dalfopristin. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 48(9), pp.3583-3585.
- Rice, L. e Bonomo, R. (2005). Genetic and Biochemical mechanisms of bacterial. Nova Iorque, Ed. Victor Lorian.
- Richards, M. J. et al. (2000). Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. *Infect Control Hosp Epidemiology* , 21, pp.510-515.
- Richards, M. Thursky, K. e Buising, K. (2003). Epidemiology, Prevalence, and Sites of Infections in Intensive Care Units. *Respiratory and Critical Care Medicine*, 24(1), pp.3-22.
- Rivero, M. O. M. (2007). Synercid : una combinación de estreptograminas A y B para el tratamiento de patógenos grampositivos multirresistentes. *Revista Cubana de Farmacia*, 41(1), pp.1-3.
- Roberts, M. C. (2011). Environmental macrolide-lincosamide-streptogramin and tetracycline resistant bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 2(4), pp.1-8.
- Roriz-Filho, J. S. et al. (2010). Infecção do trato urinário. *Medicina*, 43(2), pp.118-125.
- Rosenthal, V. D. et al. (2005). The attributable cost and length of hospital stay because of nosocomial pneumonia in intensive care units in 3 hospitals in Argentina: a prospective, matched analysis. *Am J Infect control*, 33, pp.157-161.
- Rosenthal, V.D. et al. (2008). International Nosocomial Infection Control Consortium report. *Am.J.Infect.Control*, 36, pp.627-637.
- Rossi, F. (2011). The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. *Clinical Infectious Diseases*, 52 (9), pp.1138-1143.
- Sava, I. G. Heikens, E. e Huebner, J. (2010). Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. *Clinical Microbiology Infection*, 16, pp.533-540.

- Schleifer, K.H. e Klein, G. (2002). Ecology, taxonomy and physiology of enterococci. Symposium on Entorococci in Foods, 31, p.17.
- Schmieder, R. e Edwards, R. (2012). Insights into antibiotic resistance through metagenomic approaches. *Future Microbiology*, 7(1), pp-73-89.
- Schwartz, T. Kohnen, W. Jansen, B. e Obst, U. (2003). Detection of antibiotic- resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surfasse water and drinking water biofilms. *FEMS Microbiology Ecology*, 43, pp.325-335.
- Sedgley, C.M. Lennan, S.L. Clewell, D.B. (2004). Prevalence,, phenotype and genotype of oral enterococci. *Oral Microbial Immunol*, 19, pp.95-101.
- Sefton, A. M. (2002). Mechanisms of antimicrobial resistance: their clinical relevance in the new millenium. *Drugs*,62, pp.557-566.
- Semedo, T. et al. (2003). Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and accurence of cyl operon in Enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(6), pp.2569-2576.
- Shankar, N. et al. (2004). Enterococcal cytolysin: activities and association with other virulence traits in a pathogenicity Island. *International Journal of Medical Microbiology*, 293(8), pp.609-618.
- Silva, N. S. et al. (2014). Identification of temporal clusters and risk factos of bacteremia by nosocomial vancomycin-resistant enterococci. *American Journal of Infection Control*, 42, pp.389-392.
- Silva, J. et al. (2013). Detección de genes de virulencia en cepas de *Enterococcus faecalis* susceptibles y resistentes a aminoglucósidos. *Rev Chilena Infectol*, 30(1), pp.17-22.
- Singh, K. Nallapareddy, S. Sillanpää, J. e Murray, B. (2010). Importance of the Collagen Adhesin Ace in Pathogenesis and Protection against *Enterococcus faecalis* Experimental Endocarditis. *PLoS Pathogens*, 6(1), pp.1-13.
- Singh, K. e Murray, B. (2012). *Enterococcus faecalis* in a murine urinary efficacy of Ceftobiprole Medocaril against tract infection model. *Journal Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 556(6), pp.3457-3460.

- Siqueira, J. F. et al. (2009). Bacteria in the apical root canal of teeth with primary apical periodontitis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*, 107(5), pp.721-726.
- Solway, S. L. et al. (2003). Isolation of streptogramin-resistant *Enterococcus faecium* from human and non-human sources in a rural community. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(4), pp.707-710.
- Sood, S. Malhotra, B.K. e kapil, A. (2008). Enterococcal infections and antimicrobial resistance. *Indian J Med Res*, 128, pp.111-121.
- Sousa, J. (2005). *Manual de Antibióticos Antibacterianos*. Porto, Ed Universidade Fernando Pessoa.
- Sreedhar, R. et al. (2006). Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*. *The Journal of clinical Investigation*, 116(10), pp.2799-2807.
- Stuart, C.H. (2006). *Enterococcus faecalis* : Its role in Root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *Journal Endodontic*, 32(2), pp.93-98.
- Steck, N. et al. (2011). *Enterococcus faecalis* Metalloprotease Compromises Epithelial Barrier and Contributes to Intestinal Inflammation. *Gastroenterology*, 141, pp.959-971.
- Tavares, W. (2000). Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 33(3), pp.281-301.
- Tendolkar, P. M. et al. (2004). Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun*, 72, pp.6032-6039.
- Tendolkar, P.M. Baghdayan, A.S. e Shankar, N (2006). Putative surface proteins encoded within a novel transferable locus confer a high-biofilm phenotype to *Enterococcus faecalis*. *Journal Bacteriology*, 188, pp.2063–2072.
- Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *The American Journal of Medicine*, 119(6), pp.3-10.
- Thomas, V. C. Thurlow, L. R. Boyle, D. e Hancock, L. E. (2008). Regulation of autolysis-dependent extracellular DNA release by *Enterococcus faecalis* extracellular proteases influences biofilm development. *J. Bacteriol*, 190, pp.5690–5698.

- Toledo-Arana, A. et al. (2001). The enterococcal surfase protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10), pp.4538-4545.
- Top, J. Willems, R. e Bonen, M. (2008). Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from comensal to hospital-adapted pathogen. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 52(3), pp.297-308.
- Tunger, O. et al. (2009). Rational antibiotic use. *Journal Infect Develping Countries*, 3(2), pp.88-93.
- Valenzuela, A. S. et al. (2009). Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in enterococci from artisan foods of animal origin. *Food Control*, 20(4), pp.381-385.
- Verneuil, N. et al. (2005). Implication of hypR in virulence and oxidative stress response of *Enterococcus faecalis*. *FEMS Microbiology Letters*, 252, pp.137–141.
- Vignaroli, C. Zandri, G. Aquilanti, L. Pasquaroli, S. e Biavasco, F. (2011). Multidrug-resistant enterococci in animal meat and faeces and co-transfer of resistance from an *Enterococcus durans* to a human *Enterococcus faecium*. *Curr Microbiology*, 62, pp.1438–1447.
- Wang, J. T. et al. (2013). High rates of multidrug resistance in *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* isolated from inpatients and outpatients in Taiwan. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 75, pp.406–411.
- Wang, L. et al. (2014). Investigation of mechanism and molecular epidemiology of linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* in China. *Infection, Genetics and Evolution*, 26, pp.14-19.
- Werner, G. et al. (2008). Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Eurosurveillance*, 13(47), pp.1-11.
- WHO (2002). Prevention of hospital-acquired infections. [Em linha]. Disponível em <<http://www.who.int/csr/resources/publications/whocdscsreph200212.pdf>>.
[Consultado em 12/07/14].
- Willems, R. J. e Bonten, M. J. (2007). Glycopeptide-resistant enterococci: deciphering virulence, resistance and epidemicity. *Curr Opin Infect Diseases*, 20, pp.384–90.

Worth, L. J. et al. (2008). Virulence determinants in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* vanB: clonal distribution, prevalence and significance of esp and hyl in Australian patients with haematological disorders. *Journal of Hospital Infection*, 68, pp.137-144.

Zhanel, G. G. et al. (2004). The glycyclines: a comparative review with tetracyclines. *Drugs*, 64, pp.63-88.

Zarrili, R. et al. (2005). Molecular epidemiology of high-level aminoglycoside-resistant enterococci isolated from patients in a university hospital in Southern Italy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56, pp.827-835.

Zehnder, M. et al. (2006). Dentin enhances the effectiveness of bioactive glass S53P4 against a strain of *Enterococcus faecalis*. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*, 101(4), pp.530-535.

Zou, L. K. et al. (2011). Erythromycin resistance and virulence genes in *Enterococcus faecalis* from swine in China. *New Microbiology*, 34, pp.73-80.