

***Enterococcus faecium*: ALTERAÇÕES GENÉTICAS E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA**

YURI PERINI BEUREN¹

MELISSA DE FREITAS CORDEIRO SILVA^{1*}

1 Centro Universitário Salesiano, Vitória, Espírito Santo, Brasil.

*** Autor correspondente: Melissa De Freitas Cordeiro Silva
mcordeiro@salesiano.br**

RESUMO

Enterococcus faecium são microrganismos capazes de viver de forma comensal em no sistema gastrointestinal, entretanto, em situações oportunistas podem ser altamente patogênicos e causarem problemas gastrointestinais, respiratórios e urinários. Suas defesas têm evoluído de forma rápida e eficiente trazendo assim resistências à vários fármacos utilizados no tratamento contra bactérias gram-positivas. O presente trabalho é uma revisão de literatura com o objetivo de demonstrar como ocorreu a evolução genômica de resistência a antimicrobianos da *E. faecium*, bem como os métodos utilizados para tentar combater essa infecção. Ao desenvolver e adquirir genes como *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanM*, *vanN*, *optrA*, *opxA*, alterar a sequência de aminoácidos de suas próprias células de defesa que conferem resistência a medicamentos de última instância que funcionam impedindo a ação total ou parcial de beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, glicopeptídeos e lipopeptídeos atuantes na inibição da constituição da parede de peptidoglicano, alterar o sítio de ligação de oxazolidinonas, aminoglicosídeos e estreptograminas. Através de transposon adquiridos de outras bactérias a *E. faecium* passar a entrar no âmbito de discussões entre cientistas e atuantes da saúde que buscam encontrar meios para inibir suas defesas.

ABSTRACT

Enterococcus faecium are microorganisms capable of living commensally in the digestive system, however, in opportunistic situations can be highly pathogenic and cause digestive, respiratory and urinary problems. Its defense has evolved quickly and

efficiently bringing resistance to a set of medicines utilized on the treatment against gram-positive bacteria. The present work is a literature review that aims to show how the bacteria evolved genomically to strive against anti-microbial of *E. faecium*, as well as the ways to try to fight this infection. By developing and acquiring of genes like *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanM*, *vanN* *optrA*, *opxtA* and alter the aminoacidic sequence of its own defense cells that give them the resistance against last instance drugs that work by stopping the complete or partial action of beta-lactams, aminoglycosides, glycopeptides and lipopeptides on the making of the peptidoglycan cell wall, alter the bidding site of oxazolidinones, aminoglycosides and streptogramins. Through transposon acquired from other bacteria, *E. faecium* starts being part of discussions among scientists and health care workers that strive to find ways to inhibit its defenses.

INTRODUÇÃO

A *Enterococcus faecium* é uma espécie de bactéria gram-positiva mundialmente estudada pela sua patogenia oportunista capaz de causar demasiado número de infecções relacionadas a altos níveis de mortalidade, principalmente em pacientes hospitalizados^[1]. A bactéria é conhecida por ser uma das causadoras de endocardite, doença fatal, se não tratada com antimicrobianos efetivos. *E. faecium* é uma bactéria anaeróbia facultativa oval que forma correntes de variados tamanhos, firmes e versáteis. Possui a capacidade de sobreviver a condições não favoráveis (ex. altas concentrações de sal) e em ambientes de baixa e alta temperatura (de 10° C à >45°C) ^[2].

As infecções causadas pelas bactérias do gênero *Enterococcus* são a quarta causa mais comum de morte por doença hospitalar adquirida e a terceira maior causadora de SEPSE nos EUA^[2]. A família *Enterococci* é geneticamente resistente a um elevado número de antimicrobianos e nas recentes décadas houve um crescente número de resistência microbiana adquirida. A combinação de antibióticos como penicilina com aminoglicosídeos ou glicopeptídeo costumam ser o tratamento escolhido para essa infecção, que, ao longo do tempo, resultou no desenvolvimento

de uma alta resistência a aminoglicosídeos e amoxicilina por evolução genética. Dados coletados de vários países demonstram a resistência da *E. faecium* isolada de 23,3% a 98,7% à amoxicilina. *E. faecium* foi considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) um fator de risco pois também apresentou resistência à vancomicina^[2], sendo considerado uma ameaça ao sucesso do tratamento.

Os primeiros relatos de Enterococos resistentes a vancomicina (Vancomycin resistant Enterococcus – VRE) no Brasil ocorreram em Curitiba (1996), posteriormente em São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais^[3]. Em 2005 já se falava em acompanhamentos científicos sobre o assunto, pois faltavam orientações em relação às medidas de controle e prevenção em caso de tais infecções. Os números de internações eram crescentes e traziam preocupação para as equipes multiprofissionais. A presença das VREs trazia implicações sociais e econômicas pois, por falta de orientações diretas, o tratamento se mostrava altamente mais caro em relação a *Enterococcus* sensíveis à vancomicina aumentando também as taxas de mortalidade . O estudo da evolução da *E. faecium* abrange os diferentes indicadores de resistência a antimicrobianos e diversos fatores de virulência que os garantem severas vantagens seletivas sob condições não favoráveis^[4]

A *E. faecium* pode ser dividida em dois grupos genomicamente distinguíveis, referenciados na literatura como “lineages” ou “clades” uma linhagem associada a hospitais (clado A) e uma linhagem associada a comunidade (clado B). O clado A é dividido também em clado A1 e clado não A1 que são respectivamente representados por casos clínicos humanos isolados e severos sub-clados, que, juntamente ao clado B são raramente encontrados em âmbito hospitalar. Estudos revelam níveis substanciais de plasticidade genômica e a escala mundial dos padrões de evolução de A1 se tornam mais complexos^[5].

Esta pesquisa teve como intuito englobar informações relacionadas à evolução genômica de resistência a antimicrobianos da *E. faecium*, bem como os métodos utilizados para tentar combater essa infecção.

METODOLOGIA

Trata-se de revisão de literatura narrativa que não utiliza critérios explícitos e sistemáticos para busca e análise, o que torna a interpretação das informações adquiridas sujeitas a subjetividade do autor^[6]. A pesquisa teve como início os primeiros artigos documentados em relação à evolução da bactéria *Enterococcus faecium* até o presente momento (1993-2022). Os dados foram coletados de fontes de informações científicas como PubMed, BVS, Scielo e também repositório de universidades (artigos científicos e teses de doutorado) nos idiomas inglês, português e espanhol. Foram encontrados 46 artigos relacionados a evolução da bactéria, entretanto, após leitura dos 46, 20 foram excluídos e os outros 26 foram discutidos no presente trabalho.

Palavras-chaves utilizadas foram: evolução bacteriana, *Enterococcus faecium*, genoma, resistência aos antimicrobianos, com respectivas traduções para os idiomas inglês e espanhol.

DESENVOLVIMENTO

A vancomicina e a teicoplanina possuem o mesmo mecanismo de ação, que envolve ligar-se ao terminal D-alanina-D-alanina das paredes celulares com a intenção de inibir a formação de peptidoglicanos. A *E. faecium* evoluiu ao ponto de desenvolver uma modificação em seu sítio de conexão de D-alanina-D-alanina, formando D-alanina-D-lactato (versões com alta resistência) ou D-alanina-D-serina (versões com baixa resistência) ^[7]. Os genes que exercem resistência a estes antimicrobianos são vanA, vanB, vanC, vanD, vanE, vanG, vanL, vanM e vanN. Em relação a *E. faecium* estudos comprovam resistência gerada pelos genes vanA, vanB, vanD, vanM, vanN (tabela 1).

Tabela 1 - Sumário das características do fenótipo e genótipo do alfabeto de operons VREs.

OPERONS	Espécie portadora	Expressão fenotípica	Local	Transferibilidade
vanA	<i>E.faecium</i> <i>E.faecalis</i>	Induzível	Cromossomo	Transferível
vanB	<i>E.faecium</i> <i>E.faecalis</i>	Induzível	Cromossomo	Transferível
vanD	<i>E.faecium</i> <i>E.flavescens</i>	Induzível constitutiva	Cromossomo	Não transferível
vanM	<i>E.faecium</i>	Induzível	Não estabelecido	Transferível
vanN	<i>E.faecium</i>	Constitutiva	Plasmídeo	Transferível

Fonte: Adaptado de^[8].

Operons induzíveis indicam operons que podem ser adquiridas em trocas de genes entre bactérias, já as constitutivas são parte do seu sistema de defesa, porém, se encontram inativas até que haja necessidade de sua ação. O local indica em qual parte da bactéria se encontra o gene de defesa e a sua transferibilidade indica se este gene pode ou não pode ser transferível em trocas genéticas.

Todos os operons citados na tabela conferem aspectos de defesa da família *Enterococcus*, porém, as de maior relevância para *E. faecium* são vanA, vanB, vanD, vanM, vanN pois estão relacionados à sua proteção contra antibióticos de primeira, terceira e quarta geração. Suas defesas podem ser induzidas (vanA, vanB e vanM) , constitutivas (vanN) ou ambas (vanD)^[9]

O operon vanA está associado à família de transposon tn3, mais especificamente ao transposon Tn1546, que é comumente encontrado em plasmídeos. Transposons codificam todas as informações de conjugação e integração, transferem plasmídeos ou grandes fragmentos cromossômicos, e estes genes transferidos contribuem para a variação fenotípica e plasticidade, por mediarem rearranjos cromossômicos e alterarem as expressões de certos genes^[9]

Citando de uma forma global, os operons mais prevalentes são vanA e vanB, tendo sido encontrados em toda a Europa e também em abundância na Austrália. Ambos operons estão associadas a transferência de genes por conjugação

bacteriana (MGE - mobile genetics elements in *E. faecium*) o que pode ser o motivo pela alta prevalência de ambas em relação às outros operons. O operon vanB está localizado em sua maioria no elemento integrativo Tn 1549 que podem ser encontrados em ambos os cromossomos ou plasmídeos da *E. faecium*^[9]

O genótipo vanB é encontrado em menos países, sendo alguns deles Austrália, Suécia e Alemanha, já o genótipo vanA é comumente encontrado mundialmente tanto em humanos quanto em animais, tal variedade tem sido vinculada aos diferentes padrões de antibióticos usados em diferentes países. Como resultado disso tem-se dados do operon vanB relatado em casos de humanos na Austrália, porém, não se encontra a mesma incidência em animais ^[8].

A *E. faecium* é pertencente a um grupo de bactérias multirresistentes causadoras de infecções nosocomiais agrupadas pelo acrônimo ESKAPE, juntamente à *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*. Compostos que inibem a síntese da parede celular bacteriana, são frequentemente somente bacteriostáticos em enterococci, por adquirirem resistência intrínseca a antimicrobianos com o passar dos anos conforme é ilustrado na figura 1.

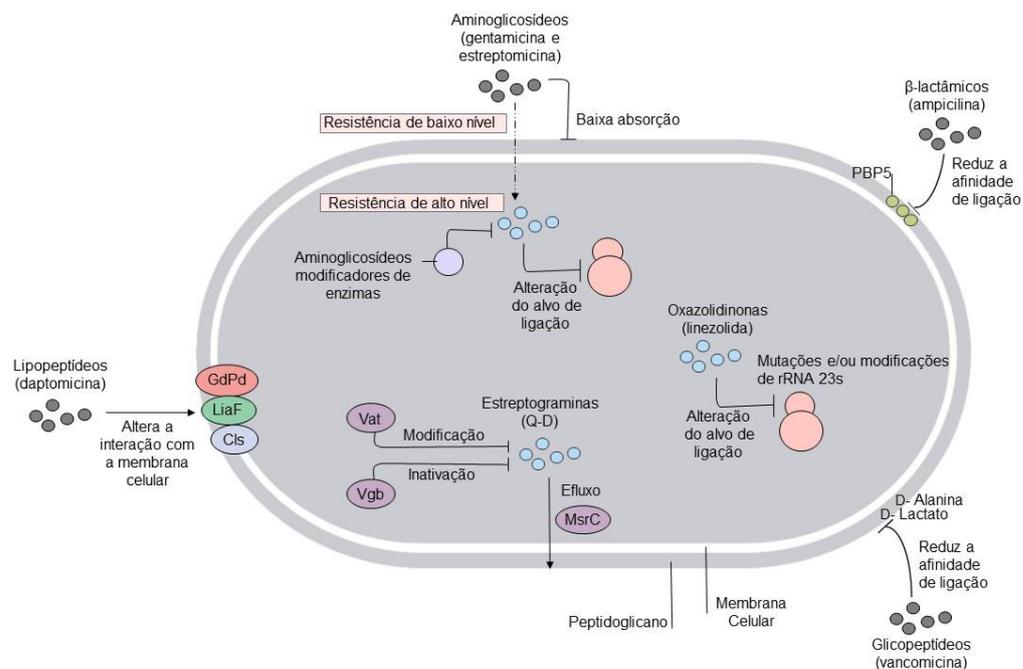


Figura 1 – Desenho ilustrativo das adaptações de defesa da bactéria *Enterococcus faecium*.

Fonte: adaptado de^[9]

Ademais, sua resistência é dada por uma série de fatores evolutivos adquiridos durante a sua existência, interferindo no funcionamento efetivo de variados antibióticos. A linezolida, antibiótico utilizado para infecções teciduais e pneumonias nosocomiais, é bastante recomendada a casos de infecção ou coinfeção por *E. faecium* pois liga-se ao sítio do rRNA 23s que, se encontra na subunidade ribossomal 50S, inibindo a síntese proteica da bactéria^[10]. Entretanto, mutações gênicas nas proteínas L3 e L4 do rRNA 23S geram resistências por formarem *optrA* e *poxA* (transposons Tn 6674) que impedem a ligação do fármaco no sítio do rRNA. Casos de resistência a oxazolidinonas são recentes e têm sido reportados somente na Grã-Bretanha e Irlanda^[11,12].

Tem-se também como forma de defesa contra *E. faecium* o uso de estreptograminas (Q/D) formada a partir da combinação de estreptogramina B (quinupristina) com a estreptogramina A (dalfopristina) na proporção 30:70. Quando usados separadamente tem ação bacteriostática, porém, a sinergia quando aplicados juntos os tornam altamente bactericidas contra bactérias gram-positivas. O uso de estreptograminas junto a altas doses de ampicilinas tem sido a saída encontrada para o controle de VRE, contudo, resistência a esta combinação tem sido reportada em vários países como Estados Unidos, Coreia do Sul e Alemanha ^[13-15]. A resistência está associada à transformação enzimática do antibiótico, efluxo mediado por proteína ligada a molécula de ATP ou alteração do sítio de ligação. É necessário a presença do gene que gera resistência, no caso da estreptogramina A, *vat* ou *vga*. Estão presentes em VRE os genes *vatD* e *vatE* contendo acetiltransferases que, ao interagir com a dalfopristina, a inativam, abolindo assim a sinergia com a quinupristina. A resistência à quinupristina é conferida pelos genes *erm* (*ermA*, *ermB*, *ermC*) que também apresentam resistência a macrolídeos e lincosamida. O gene atua removendo grupos metil das proteínas, em específico a adenina, diminuindo a ligação dos fármacos ao seu sítio ^[16].

Outros fármacos, além da vancomicina e teicoplanina, também atuam na membrana de peptideoglicano (PG) das bactérias gram-positivas. A daptomicina é um antibiótico pertencente à classe dos lipopeptídeos e sabe-se que sua atuação é dependente da presença de Ca^{2+} para que possa associar-se a camada de peptideoglicano. Após, a daptomicina fica ligada ao septo de divisão celular no sítio

de produção de PG e lipídeo II inibindo sua reconstituição [14,17,18]. Os genes envolvidos na resposta ao estresse e no controle da homeostase da parede celular são *liaFSR* e *yyFGHIJ*. O sistema *liaFSR* é formado por três componentes, o gene é LiaF responsável pela inibição da interação do LiaR com LiaS na ausência de estresse de membrana. O LiaS funciona como uma proteína sensorial que responde ao estresse induzido pela daptomicina e outros agentes ativadores da membrana^[19,20]. Estudos realizados em ambos os genes indicam mutações no sistema LiaFSR no gene *liaR* pela deleção de Trp73cys e inserção dos aminoácidos *met-pro-leu* no gene *liaS*^[19,21].

Já o uso de beta-lactâmicos para inibição de crescimento bacteriano utiliza o método de ligação às proteínas (do inglês penicilin-binding proteins PBPs) que catalisam a ligação cruzada em cadeia das moléculas de peptidoglicano durante sua maturação. A resistência a este método se dá por duas ações: mudanças nas posições das proteínas constituintes da camada de peptidoglicano relacionadas a troca genética entre plasmídeos de VREs diferentes e também pela proteína de ligação de penicilina 5 (do inglês penicilin-binding protein 5 PBP5) que inibe a ligação da PBPs na parede de peptidoglicano^[22-25].

CONCLUSÃO

Portanto, evidencia-se que a bactéria *E. faecium* possui diversas maneiras de se defender contra tratamentos intensivos e não intensivos que envolvem a destruição de sua camada proteica protetora com o intuito de inibir a maturação, recepção de nutrientes, crescimento e proliferação, bem como aqueles que tem como objetivo atacar seus genes encontrados no ribossomo e no plasmídeo. A incidência da *E. faecium* resistentes a vancomicina VRE ainda não é alarmante no país, entretanto, sua incidência tem aumentado com o passar dos anos. Casos hospitalares de coinfeção são os mais graves devido a sua alta susceptibilidade ao desenvolvimento de resistência por meios de transferências de genes entre *E. faecium* e também entre *E. faecium* e outras bactérias. Os estudos relacionados à evolução de tais resistências devem continuar para que possa chegar a respostas 100% eficazes em seu

tratamento, a fim de combater coinfeccções graves e presença de superbactérias *in vivo*.

REFERENCIAS

1. Gorrie C, Higgs C, Carter G, Stinear TP, Howden B. Genomics of vancomycin-resistant enterococcus faecium. *Microb Genom* 2019;5(7).
2. Thouverez M, Talon D. Microbiological and epidemiological studies of *Enterococcus faecium* resistant to amoxicillin in a university hospital in eastern France. *Clinical Microbiology and Infection* [Internet] 2004;10(5):441–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.00849.x>
3. Rossini FAF, Fagnani R, Leichsenring ML, Dantas SRPE, Cardoso LGO, Levy CE, et al. Successful prevention of the transmission of vancomycin-resistant enterococci in a Brazilian public teaching hospital | Sucesso no controle da transmissão hospitalar de *Enterococcus* resistentes a vancomicina em um hospital universitário público brasileiro. *Rev Soc Bras Med Trop* 2012;45(2):184–8.
4. Renata Oliveira Soares. Epidemiologia Molecular e Expressão de Genes de Virulência de *Enterococcus* spp . Isolados de amostras clínicas no Sul do Brasil *Epidemiologia Molecular e Expressão de Genes de Virulência de Enterococcus spp . Isolados de amostras clínicas no Sul do Brasil*. 2018;
5. van Hal SJ, Willems RJL, Gouliouris T, Ballard SA, Coque TM, Hammerum AM, et al. The global dissemination of hospital clones of *Enterococcus faecium*. *Genome Med* 2021;13(1):1–12.
6. Mendes KDS, Silveira RC de CP, Galvão CM. Revisão integrativa: método de pesquisa para a incorporação de evidências na saúde e na enfermagem. *Texto & Contexto - Enfermagem* 2008;17(4):758–64.
7. Bender JK, Cattoir V, Hegstad K, Sadowy E, Coque TM, Westh H, et al. Update on prevalence and mechanisms of resistance to linezolid, tigecycline and daptomycin in enterococci in Europe: Towards a common nomenclature. *Drug Resistance Updates* 2018;40(October):25–39.
8. Ahmed MO, Baptiste KE. Vancomycin-Resistant Enterococci: A Review of Antimicrobial Resistance Mechanisms and Perspectives of Human and Animal Health. *Microbial Drug Resistance* 2018;24(5):590–606.
9. Wagner T. How to Be a Bad Bug: Virulence Determinants of *Enterococcus faecium*. 2018;(June). Available from: <https://munin.uit.no/handle/10037/14108>
10. Bi R, Qin T, Fan W, Ma P, Gu B. The emerging problem of linezolid-resistant enterococci. *J Glob Antimicrob Resist* [Internet] 2018;13:11–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2017.10.018>
11. Egan SA, Shore AC, O’Connell B, Brennan GI, Coleman DC. Linezolid resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from hospitalized patients in Ireland: High prevalence of the MDR genes *optrA* and *poxtA* in isolates with diverse genetic backgrounds. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2020;75(7):1704–11.
12. Biggel M, Nüesch-Inderbinen M, Jans C, Stevens MJA, Stephan R. Genetic context of *optrA* and *poxtA* in florfenicol-resistant enterococci isolated from flowing surface water in Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother* 2021;65(10):1–5.

13. Werner G, Klare I, Spencker FB, Witte W. Intra-hospital dissemination of quinupristin/dalfopristin- and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a paediatric ward of a German hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003;52(1):113–5.
14. De U. INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS PAMELA IBETH HUANAMBAL ESQUÉN Estudo da glicosiltransferase LafB de. 2022;
15. Donabedian SM, Perri MB, Vager D, Hershberger E, Malani P, Simjee S, et al. Quinupristin-dalfopristin resistance in *Enterococcus faecium* isolates from humans, farm animals, and grocery store meat in the United States. *J Clin Microbiol* 2006;44(9):3361–5.
16. Wang S, Guo Y, Lv J, Qi X, Li D, Chen Z, et al. Characteristic of *Enterococcus faecium* clinical isolates with quinupristin/dalfopristin resistance in China. *BMC Microbiol* [Internet] 2016;16(1):1–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-016-0863-8>
17. Hachmann AB, Sevim E, Gaballa A, Popham DL, Antelmann H, Helmann JD. Reduction in membrane phosphatidylglycerol content leads to daptomycin resistance in *Bacillus subtilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55(9):4326–37.
18. Grein F, Müller A, Scherer KM, Liu X, Ludwig KC, Klöckner A, et al. Ca²⁺-Daptomycin targets cell wall biosynthesis by forming a tripartite complex with undecaprenyl-coupled intermediates and membrane lipids. *Nat Commun* [Internet] 2020;11(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-15257-1>
19. Jordan S, Rietkötter E, Strauch MA, Kalamorz F, Butcher BG, Helmann JD, et al. LiaRS-dependent gene expression is embedded in transition state regulation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology (N Y)* 2007;153(8):2530–40.
20. Miller WR, Bayer AS, Arias CA. Mechanism of action and resistance to daptomycin in *Staphylococcus aureus* and enterococci. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2016;6(11):1–16.
21. Ph D, Mojica MF, Sc M, Miller C, Diaz L, Sc B, et al. Genetic Basis for In Vivo Daptomycin Resistance in Enterococci. *New England Journal of Medicine* 2012;365(10):892–900.
22. Cercenado E. Enterococcus: resistencias fenotípicas y genotípicas y epidemiología en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet] 2011;29(SUPPL. 5):59–65. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0213-005X\(11\)70045-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0213-005X(11)70045-3)
23. Sarti M, Campanile F, Sabia C, Santagati M, Gargiulo R, Stefani A. Polyclonal diffusion of beta-lactamase-producing *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 2012;50(1):169–72.
24. Sacco E, Cortes M, Josseaume N, Rice LB, Mainardi JL, Arthur M. Serine/threonine protein phosphatase-mediated control of the peptidoglycan cross-linking L,D-transpeptidase pathway in *enterococcus faecium*. *mBio* 2014;5(4):1–9.
25. Galletti P, Bonofiglio L, García Gabarrot G, Kaufman S, Mollerach M, Vigliarolo L, et al. Resistance to β -lactams in enterococci. *Rev Argent Microbiol* [Internet] 2019;51(2):179–83. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.01.007>