

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico Faculdade de Ciências Médicas

Beatriz Nascimento Monteiro da Silva

Propriedades fenotípicas e moleculares associadas aos aspectos evolutivos de*Enterococcus faecium*: análise comparativa de estratégias de um patógeno oportunista

Rio de Janeiro 2017 Beatriz Nascimento Monteiro da Silva

Propriedades fenotípicas e moleculares associadas aos aspectos evolutivos de*Enterococcus faecium*: análise comparativa de estratégias de um patógeno oportunista

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor,ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Orientadoras: Prof.^a Dra. Vânia Lúcia Carreira Merquior Prof.^a Dra. Lúcia Martins Teixeira Coorientadora: Prof.^a Dra. WâniaFerraz PereiraManfro

CATALOGAÇÃO NA FONTE UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S586 Silva, Beatriz Nascimento Monteiro da. Propriedades fenotípicas e moleculares associadas aos aspectos evolutivos de Enterococcus faecium: análise comparativa de estratégias de um patógeno oportunista / Beatriz Nascimento Monteiro da Silva. - 2017. 153 f. Orientadoras: Vânia Lúcia Carreira Merquior, Lúcia Martins Teixeira. Coorientadora: Wânia Ferraz Pereira Manfro. Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Microbiologia. 1. Enterococcus faecium - Teses. 2. Biofilme - Teses. 3. Virulência (Microbiologia) - Teses. 4. Genética humana - Variação - Teses. 5. Genoma Bacteriano. 6. Elementos de DNA Transponíveis. I. Merquior, Vânia Lúcia Carreira. II. Teixeira, Lúcia Martins. III. Manfro, Wânia Ferraz Pereira. IV. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. V. Título.

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Beatriz Nascimento Monteiro da Silva

Propriedades fenotípicas e moleculares associadas aos aspectos evolutivos de*Enterococcus faecium*: análise comparativa de estratégias de um patógeno oportunista

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Aprovada em 11 de maio de 2017.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Vânia Lúcia Carreira Merquior (Orientadora) Faculdade de Ciências Médicas- UERJ

Prof.^a Dra. WâniaFerraz PereiraManfro (Coorientadora) Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. Raphael do Carmo Valente Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof. Dr. Alex Guerra Ferreira Colégio Militar do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Giovani Carlo Veríssimo da Costa Universidade Federal do Rio de Janeiro

> Rio de Janeiro 2017

AGRADECIMENTOS

A Deus pela infinita misericórdia na direção da minha vida. Somente Ele tornou e torma tudo possível em meio a tantos obstáculos.

À minha família, principalmente à minha mãe Cristina, que sempre me incentivou em todos os momentos e sempre foi o alicerce que me permitiu concluir todas as etapas.Se não fosse por todo esforço dela com certeza eu não teria chegado até aqui;ao meu pai Antônio por me tornar cada vez mais forte e por me incentivar a seguir estudando sempre; à minha irmã Bianca pelo companheirismo, incentivo e exemplo de perseverança; ao meu irmão Bruno pela força, parceria e por estar sempre comigo me aconselhando e apoiando em todos os momentos.

Ao meu namorado Marcos Blanco pelo apoio, incentivo, compreensão, por tornar essa caminhada mais leve e agradável com seu senso de humor e principalmente pela parceria em todos os momentos. Seu cuidado e carinho comigo são fonte renovadora para minha mente e meu espírito.

À professora Vânia Merquior, que desde o início foi uma mãe científica, me conduzindo, orientando e principalmente acreditando na minha capacidade. Sua orientação me lapidou e foi crucial para a construção de uma profissional que tem em você um exemplo a seguir.

À professora Lúcia Teixeira da Universidade Federal do Rio de Janeiro, orientadora deste estudo, pela acolhida em seu laboratório e oportunidade de crescer cientificamente.

A todos os professores da microbiologia UERJ que transmitem seu amor pela profissão e contagiam os pequenos cientistas desde o primeiro contato com o universo da microbiologia.

À professora Wânia Manfro da Universidade do Estado do Rio de Janeiro que foi uma professora/amiga/parceira fundamental na conclusão dessa etapa. Sempre com toda paciência para me ensinar e estar comigo durante experimentos exaustivos,que muitas vezes nos levavam a sair tarde do laboratório.

À professora Regina Peralta da Universidade Federal Fluminense, que teve o maior carinho e atenção em me ajudar nas etapas com Real time. Acreditou em mim e me deu força para seguir com meus resultados. Sempre disponível para me tirar dúvidas e ajudar na elaboração de experimentos.

Ao professor Giovani Veríssimo da Universidade Federal do Rio de Janeiro, que me ensinou a trabalhar com espectrometria de massas, me proporcionouum experiência enriquecedora. Sua ajuda e incentivo também foram fundamentais para conclusão dessa etapa.

À minha amiga Adriana Faria pelo companheirismo, incentivo, troca de conhecimento e principalmente pela boa vontade e disponibilidade em ajudar. Sua ajuda e força nesse momento final foram imprescindíveis para a coclusão desse trabalho.

Aos meus amigos Sandrine, Jessyka e Guilherme pelos momentos de apoio e descontração.

As minhas amigas da Graduação que permanecem até hoje me incentivando e apoiando. Principalmente à Carla e Camila, que na alegria ou tristeza sei que posso contar com vocês, pois compartilhamos de muitos momentos que somente nós sabemos e sentimos as dificildades e alegrias que passamos. Tudo só fortaleceu nossa amizade.

Aos colegas e amigos dos laboratórios 27 e 46 do Instituto de Microbiologia da UFRJ que sempre se mostraram muito dispostos a me ajudar e a me ensinar mesmo na correria do dia a dia. Principalmente ao Mauro, Flávia e Susie que muitas vezes paravam o que estavam fazendo para me ajudar e com boa vontade. Isso é raro e não tem preço.

A todos os profissionais que contribuíram de alguma forma durante o desenvolvimento deste trabalho.

As agências de fomento CAPES, CNPq e FAPERJ pelo apoio financeiro à realização desta proposta.

Aqueles que se sentem satisfeitos sentam-se e nada fazem. Os insatisfeitos são os únicos benfeitores do mundo.

Walter S. Landor

RESUMO

Monteiro da Silva, Beatriz. **Propriedades fenotípicas e moleculares associadas aos aspectos evolutivos de***Enterococcus faecium*: análise comparativa de estratégias de um patógeno oportunista.2017. 153 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) -Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Enterococcus faecium se destaca como uma espécie bacteriana frequentemente multirresistente aos antimicrobianos, associada à infecções hospitalares em todo o mundo. O objetivo deste estudo foi investigar comparativamente as características de duas amostras de E. faecium: SS-1274 (derivada da amostra tipo da espécie) e CL-6729 (amostra clínica proveniente de infecção urinária de origem hospitalar). Estas amostras foram caracterizadas quanto à susceptibilidade aos antimicrobianos, presença de determinantes genéticos de resistência e de virulência e métodos de tipagem molecular PFGE, MLVA e MLST. Foi também avaliada a capacidade de formação de biofilmes e as características associadas a sua arquitetura, por microscopia confocal a laser (CLSM). A resposta de macrófagos da linhagem J.774 às células planctônicas e aos biofilmes foi identificada por quantificação das citocinas TNF-α, IFN-γ, IL-6 e IL-10 (através de ensaio imunoenzimático), dosagem de óxido nítrico e CLSM. Avaliações por ESI-Q-TOF foram empregadas para determinação do perfil proteômico de biofilmes e do crescimento planctônico, a partir de resultados prévios obtidos por SDS-PAGE. Foi também realizado o sequenciamento do genoma completo (WGS) da amostra clínica CL-6729 com auxílio da plataforma Illumina Hiseq e anotação dos genes pela PATRIC 3.2.75. Nossos resultados demonstraram que CL-6729 é multirresistente e alberga os genes vanAe esp; é pertencente ao MT-12 e ao ST-78, consequentemente faz parte do complexo clonal 17 (CC17). Esta amostra apresentou resistência constitutiva à vancomicina. Análises da integridade do Tn1546 revelaram a presença de IS19 inserida no gene vanS. Pela reunião de dados obtidos por qPCR e sequenciamento parcial dos genes envolvidos, a presença de IS19 parece estar influenciando direta ou indiretamente na alteração da expressão da resistência. A expressão constitutiva da resistência à vancomicina foi detectada tanto para o cultivo planctônico como em biofilmes. Biofilmes de E. faecium apresentaram biomassa rica em proteína após 24 h de incubação e em DNA após 72 h. Dados relativos à interação por 24 h de CL-6729 macrófagos J.774 demonstraram uma modulação negativa da produção de nitrito pelos macrófagos. Por outro lado, em relação ao estímulo à produção de citocinas, os dados sugerem uma indução na produção das citocinas, TNF-α, IFN-γ, IL-6 e IL-10, tanto por biofilmes quanto células planctônicas de ambas as amostras bacterianas. Além disso, CLSM revelou que macrófagos são capazes de penetrar na estrutura dos biofilmes. Os resultados relativos à espectrometria de massa sugerem que células de biofilmes de E. faeciumparecem estar ativas, diante da identificação de um considerável número de proteínas relacionadas ao metabolismo e divisão celular. Análises por WGS revelaram um tamanho de 2,9 Mb, com 3.125 genes preditos, dentre os quais cerca de 2.000 genes estão associados ao metabolismo de carboidratos e de ácidos núcleicos e à divisão celular. Foram anotados genes associados à resistência aos antimicrobianos, virulência, sequências de inserção, fagos e plasmídeos. Nossos dados apontam para um processo evolutivo dinâmico e especializado, que indica alterações significativas entre amostras de uma mesma espécie. Tais alterações demonstram capacitar esta espécie, anteriormente identificada como patógeno de baixo potencial de virulência, ao status de um microrganismo capaz de atingir gravemente a saúde humana. Consideramos que nossos resultados agregam informações que reafirmam a necessidade do acompanhamento contínuo das infecções causadas por microrganismos desta espécie, diante de suas habilidades de adaptação e persistência.

Palavras-chave: *Enterococcus faecium*. Biofilmes.Virulência. Tn1546. Diversidade genética. Genoma *E. faecium*.

ABSTRACT

Monteiro da Silva, Beatriz. **Phenotypic and molecular properties associated with evolutionary aspects of** *Enterococcusfaecium*: **comparative analysis of the strategies of an opportunistic pathogen**.2017. 153 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Enterococcus faecium stands out as a bacterial species that have been often associated with hospital-acquired infections around the world. The aim of this study was to compare the characteristics of two E. faecium strains SS-1274 (type strain) and CL-6729 (clinical isolate from nosocomial urinary tract infection). The bacterial strains were characterized by antimicrobial susceptibilities, presence of genetic determinants of virulence and resistance and molecular typing methods as PFGE, MLVA, and MLST. It was also evaluated the biofilm formation and architecture by confocal laser scanning microscopy (CLSM). The response of macrophages J.774 to biofilms and planktonic growth was identified by enzyme-linked immunosorbent assay quantification of cytokines TNF- α , IFN- γ , IL-6 and IL-10, determination of nitric oxide concentration and CLSM. Proteomic profiles of the bacterial cells from biofilms and planktonic growth were carried out by ESI-Q-TOF mass spectrometry methodology from prior results achieved by SDS-PAGE. It was also investigated the whole genome sequencing (WGS) of CL-6729 using Illumina Hiseq platform and genes annotation was performed on PATRIC 3.2.75. Our results showed that CL-6729 is multi-drug resistant and harbored the genes vanA and esp. This isolated was molecular typed as MT-12 and ST-78, therefore belonging to the clonal complex 17 (CC17). This isolate also showed constitutive resistance to vancomycin, an unusual characteristic for the species. Analysis of Tn1546 revealed the presence of IS19 inserted into the gene vanS. According to the data obtained from qPCR and partial sequencing of the genes involved with vancomycin resistance, the presence of IS19 seemed to be influencing directly or indirectly on the changes of the resistance mechanisms expression as was identified from both biofilms and planktonic growing. Biofilms of E. faecium showed protein-rich and DNA-rich biomass after 24 h and 72 h of formation, respectively. Interaction assays demonstrated a negative modulation of nitrite production by macrophages J.774. On the other hand, the data suggest ainduction of cytokines production, TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-10, by biofilms and planktonic cells from both E. faecium strains. In addition, CLSM has shown that macrophages were able to penetrate the biofilms structure. The results relating to mass spectrometry suggest that biofilm cells of E. faecium had seemed to be metabolicaly active, according to the identification of a significant number of proteins related to metabolism and cell division. WGS revealed a 2.9 Mb size, with 3,125 predicted genes, among which about 2,000 genes are associated with the carbohydrates and nucleic acids metabolisms, and cell division. Genes associated with antimicrobial resistance, virulence, insertion sequences, phage and plasmids were annotated. Our data point to a dynamic and evolutionary process, indicating significant changes between samples of the same species. These data highlights the continuous evolution process of this species that changes the concept from an ordinary opportunistic pathogen with low virulence potential to a severely problem to human health. We believe that our results reaffirm the need of continuous monitoring the infections caused by these microorganisms, considering their skills of adaptation and persistence.

Keywords: *Enterococcus faecium*. Biofilms. Virulence. Tn1546. Genetic diversity.*E. faecium* whole-genome sequence.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Esquema representativo das regiões de anelamento dos 24	
	oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR de	
	sobreposição para a caracterização dos tipos de	
	Tn1546	48
Figura 2 -	Dendrograma representativo do arranjo obtido pela metodologia de	
	PFGE1, reunindo dados adicionais de tipagem por MLVA e MLST,	
	susceptibilidade à vancomicina e ano de isolamento das amostras	
	clínicas de Enterococcus faecium	69
Figura 3 -	Diagrama representativo do relacionamento filogenético dos tipos	
	determinados por metodologia de tipagem por sequenciamento	
	multilocus (MLST), localizando os ST 78 (sequence type 78) associados	
	às amostras de pacientes hospitalizados da América do Sul	70
Figura 4 -	Géis representativos dos produtos de amplificação obtidos dos genes que	
	compõem o conjunto gênico vanA em Tn1546 das amostras E. faecium	
	CL-6729 e E. faecalisA256 (amostra controle)	71
Figura 5 -	Gel representativo dos produtos da amplificação obtidos com a	
	composição de oligonucleotídeos iniciadores com a finalidade de	
	detectar alterações em regiões intergênicas no conjunto gênico vanA em	
	amostras de Enterococcus(CL-6729 e A256)	72
Figura 6 -	Gel representativo da detecçãode IS19 associada ao gene vanS na	
	amostra de <i>E. faecium</i> CL-6729	73
Figura 7 -	Alinhamento das sequênciasde referência M97297.1 (vanS Tn1546) e	
	AF169285.1 (IS19) obtidas do GenBank com a sequência do segmento	
	obtido da amostra <i>E. faecium</i> CL-6729	74
Figura 8 -	Predição dos valores de hidrofobicidade indicativos de domínios	
	transmembrana ao longo da sequência de aminoácidos da proteína vanS	
	sem alteração (A) e com inserção de IS19 (B) como evidenciado na	
	amostra E. faecium CL-6729	76

Predição da organização estrutural da modelagem da proteína VanS sem	
alterações (A) e com a inserção de IS19 (B) na amostra de E. faecium	
CL-6729, indicando o índice de confiança da predição, a presença de	
alfa-hélices, folhas-beta e alças nos modelos de estrutura secundária	
definida com auxílio do aplicativo PSIPRED	77
Níveis de expressão do gene vanA nas amostras E. faecium CL-6729 e	
E. faecalis A256 (controle) na forma planctônica e em biofilmes e na	
presença e ausência de vancomicina	78
Níveis de expressão dos genes vanS(A) e vanR (B) nas amostras E.	
faecium CL-6729 e E. faecalis A256 (controle) na forma planctônica e	
em biofilme e na presença e ausência de vancomicina	79
Curvas de formação de biofilmes pelas amostras de E.faecium SS-1274	
(A) e CL-6729 (B)	80
Biofilmes formados pelas amostras de E. faecium com 72 h de	
formação, corados com os fluorocromos Syto9 (específico para DNA) e	
SYPRO Ruby Protein (específico para proteínas) e visualizados por	
microscopia confocal a laser	81
Concentração de nitrito (NO2) presente no meio de cultura, após ensaio	
de interação entre as amostras de E. faecium CL-6729 (A) ou SS-1274	
(B) com macrófagos pertencentes à linhagem J.774	82
Concentração de TNF-a presente no meio após ensaio de interação entre	
macrófagos da linhagem J.774 e biofilmes ou células planctônicas das	
amostras de <i>E. faecium</i> CL-6729 (A, C e E) e SS-1274 (B, D e F)	84
Concentração de INF-y presente no meio após ensaio de interação entre	
macrófagos da linhagem J.774 e biofilmes ou células planctônicas das	
amostras de <i>E. faecium</i> CL-6729 (A, C e E) e SS-1274 (B, D e F)	85
Concentração de IL-6 presente no meio após ensaio de interação entre	
macrófagos da linhagem J.774 e biofilmes ou células planctônicas das	
amostras de <i>E. faecium</i> CL-6729 (A, C e E) e SS-1274 (B, D e F)	87
Concentração de IL-10 presente no meio após ensaio de interação entre	
macrófagos da linhagem J.774 e biofilmes ou células planctônicas das	
amostras de E. faecium CL-6729 (A, C e E) e SS-1274 (B, D e F)	88
	Predição da organização estrutural da modelagem da proteína VanS sem alterações (A) e com a inserção de IS <i>I9</i> (B) na amostra de <i>E. faecium</i> CL-6729, indicando o índice de confiança da predição, a presença de alfa-hélices, folhas-beta e alças nos modelos de estrutura secundária definida com auxílio do aplicativo PSIPRED

Figura 19 -	Imagens representativas das análises por microscopia confocal de	
	varredura a laser da interação entre biofilmes de E. faecium (amostra CL-	
	6729) e macrófagos da linhagem J.774	89
Figura 20 -	Mapa circular do genoma da amostra CL-6729 de E. faecium	95

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Genes e oligonucleotídeos iniciadores utilizados no esquema de tipagem	
	por MLSTpara amostras de Enterococcus faecium	43
Quadro 2 -	Características dos loci que compõem a metodologia de análise do	
	polimorfismo numérico de segmentos repetitivos em múltiplos loci	
	(MLVA) e sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas	
	reações de amplificação em cadeia da polimerase (PCR)	45
Quadro 3 -	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR por	
	sobreposição (overlapping PCR) para a caracterização de polimorfismos	
	em Tn <i>1546</i>	47
Quadro 4 -	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na detecção de sequências de	
	inserção	49
Quadro 5 -	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para detecção da expressão dos	
	genes vanA, vanS, vanR e rrs	53
Quadro 6 -	Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores e tamanhos dos produtos	
	obtidos nas reações de PCR multiplex para caracterização de fatores de	
	virulência em Enterococcus	54
Quadro 7 -	Características fenotípicas e genotípicas das amostras de Enterococcus	
	faecium utilizadas neste estudo	68
Quadro 8 -	Caracterização das proteínas de amostras de Enterococcus faecium,	
	provenientes de células planctônicas e biofilmes, após separação por	
	SDS-PAGE e identificação por espectrometria de massas (ESI-Q-TOF)	91
Quadro 9 -	Profagos identificados no genoma da amostra CL-6729 de E. faecium	96
Quadro 10 -	Sequências de Inserção (IS) identificadas no genoma da amostra CL-	
	6729 de <i>E. faecium</i>	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
AFLP	amplified fragment length polymorphism
AS	aggregation substance
asa1	substância de agregação
AtlA	autolisina A
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion Broth
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
С	Citosina
CC	Complexo Clonal
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CLSI	Clinical and Laboratory Standard Institute
CLSM	confocal laser scanning microscopy
CIM	Concentração InibitóriaMínima
Ct	cycle threshold
cylA	Citolisina
D-Ala	D-alanina
D-Ala-D-Ala	D-alanina-D-alanil
D-Lac	D-lactato
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
D-Ser -	D-serina
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetracético
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMAs	enzimas modificadoras de aminoglicosídeos
EPS	extracellular polymeric substance
ESI-Q-TOF MS	ElectroSpray Ionisation-Time-of-Flight Mass Spectrometry
esp	proteína de superfície de enterococos
EUA	Estados Unidos da América

G	Guanina
gelE	Gelatinase
HLAR	high-level aminoglycoside resistance
HLGR	high-level gentamicin resistance
HLSR	high-level streptomycin resistance
hyl	Hialuronidase
IL	Interleucina
IFN	Interferom
IrAS	infecções relacionadas à assistência em saúde
IR	Sequências Invertidas Repetidas
IS	Sequência de Inserção
LAP	L-leucina-β-naftilamida
LPXTG	Leu-Pro-X-Thr-Gly
MHA	Müeller-Hinton Agar
MHB	Müeller-Hinton Broth
μ	Micro
mL	Mililitro
MLST	multilocus sequence typing
MLVA	multiple-locus variable number of tandem repeats
MØ	Macrófagos
MSCRAMMs	Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules
MT	MLVA Type
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCTC	National Counterterrorism Center
NHSN	National Healthcare Safety Network
NIH	National Institutes of Health
NNISS	National Nosocomial Infections Surveillance System
ORF	Open Reading Frame
pb	Pares de bases
PBPs	penicillin-binding proteins
PBS	fosfato de sódio monobásico
PCR	Polimerase Chain Reaction
PFGE	pulsed-field gel electrophoresis

pg	Picograma
PMN	Polimorfonucleares
PYR	L-pirrolidonil-β-naftilamida
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
ROI	intermediários reativos de oxigênio
SS	Standard strain
ST	Sequence Type
Т	Timina
TNF	Fator de necrose tumoral
UEMP	Unidade de Espectrometria de Massas e Proteômica
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UTI	Unidades de Terapia Intensiva
UPGMA	Unweighted-Pair Group Method of Averages
VRE	vancomycin-resistant enterococci
VNTRs	Variable Number of Tandem Repeats
WGS	whole genome sequencing

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO
1	OBJETIVOS
2	MATERIAIS E MÉTODOS
2.1	Determinação de Aspectos Fenotípicos e Genotípicos de E. faecium:
	Características Gerais, Susceptibilidade aos Antimicrobianos e Tipagem
	Molecular
2.1.1	Testes fisiológicos convencionais
2.1.2	Avaliação da Susceptibilidade aos Antimicrobianos Através do Método de
	Disco Difusão (Kirby-Bauer, 1966)
2.1.3	Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM) para Vancomicina por
	Metodologia de Microdiluição em Caldo
2.1.4	Detecção dos Determinantes de Resistência à Vancomicina
2.1.5	Definição dos Perfis de Fragmentação do DNA Cromossômico por
	Eletroforese em Campo Pulsado – PFGE (pulsed-field gel electrophoresis)
2.1.6	<u>Tipagem por Sequenciamento de Multilocus – MLST (multilocus sequence</u>
	<u>typing</u>)
2.1.7	Análise do Polimorfismo Numérico de Segmentos Repetitivos em Múltiplos
	Loci – MLVA (multiple-locus variable number tandem repeat analysis)
2.1.8	Investigação Estrutural e Molecular de Tn1546
2.1.8.1	Determinação do Desenho Estrutural de Tn1546 através de Metodologia de
	PCR por Sobreposição
2.1.8.2	Detecção de Sequências de Inserção em vanS
2.1.8.3	Sequenciamento de vanS
2.1.8.4	Análise de Predição de Estruturas de Modelagem para a Proteína VanS
2.1.8.5	Análise por PCR em Tempo Real - qPCR da Expressão dos Determinantes de
	Resistência à Vancomicina vanA, vanR e vanS em Biofilmes e Células
	Planctônicas de <i>E. faecium</i> CL-6729
2.1.8.5.1	Obtenção de Células Planctônicas e de Biofilmes para Extração de RNA Total
2.1.8.5.2	Extração do RNA total
2.1.8.5.3	Expressão de vanA, vanS e vanR

2.2	Aspectos Relacionados à Virulência de E. faecium: Principais			
	Determinantes Genéticos e Formação de Biofilmes			
2.2.1	Caracterização do Genótipo de Virulência			
2.2.2	Curva de Formação de Biofilme			
2.2.3	Avaliação da Arquitetura do Biofilme por Microscopia Confocal de Varredura			
	a Laser (CLSM, confocal laser scanning microscopy)			
2.2.4	Interação de Macrófagos com Células Planctônicas e Biofilmes das Amostras			
	de <i>E. faecium</i>			
2.2.4.1	Obtenção dos Macrófagos			
2.2.4.2	Obtenção de Células Planctônicas			
2.2.4.3	Obtenção dos Biofilmes			
2.2.4.4	Padronização do número de unidades formadoras de colônias por mililitro			
	(UFC/mL)			
2.2.4.5	Ensaios de Interação com Macrófagos J.774			
2.2.4.5.1	Dosagem de Óxido Nítrico			
2.2.4.5.2	Avaliação da Resposta de Macrófagos J.774 Após Interação com Células			
	Planctônicas e Biofilmes de <i>E. faecium</i>			
2.2.4.5.3	Análises Estatísticas			
2.2.4.5.4	Avaliação por CLSM da Interação entre Biofilmes e Células Planctônicas de E.			
	faeciumCL-6729 com Macrófagos J.774			
2.3	Panoramas Proteico e Genômico de <i>E. faecium</i>			
2.3.1	Análise dos Perfis Protéicos de Biofilmes e Células Planctônicas de E. faecium.			
2.3.1.1	Extração das Proteínas Totais			
2.3.1.2	SDS-PAGE			
2.3.1.3	Análise das Proteínas por Espectrometria de Massas - ESI-Q-TOF MS			
	(electrospray ionisation time-of-flight mass spectrometry)			
2.3.2	Sequenciamento do Genoma Completo (WGS – whole genome sequencing) da			
	Amostra E. faeciumCL-6729			
3	RESULTADOS			
3.1	Determinação de Aspectos Fenotípicos e Genotípicos de E. faecium:			
	Características Gerais, Susceptibilidade aos Antimicrobianos e Tipagem			
	Molecular			

3.2	Aspectos Relacionados à Virulência de E. faecium: Principais	
	Determinantes Genéticos e Formação de Biofilmes	80
3.3	Panoramas Proteico e Genômico de <i>E. faecium</i>	89
4	DISCUSSÃO	98
	CONCLUSÃO	119
	REFERÊNCIAS	121

INTRODUÇÃO

O gênero *Enterococcus*, descrito por Schleifer & Klipper-Balz, em 1984, consiste de cocos Gram-positivos, catalase negativa, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos, que ocorrem dispostos isolados, aos pares ou em cadeia curtas, apresentando comumente morfologia ovóide e as colônias são, em geral, não hemolíticas. Além disso, destacam-se por: crescer em uma faixa de temperatura de 10°C a 45°C, em meio contendo concentrações elevadas de cloreto de sódio (6,5% de NaCl) e em caldo com pH ajustado para 9,6; resistir à temperatura de 60°C por 30 minutos; possuir a capacidade de hidrolisar a esculina em presença de sais biliares; e produzir as enzimas pirrolidonilarilamidase (que hidrolisa o substrato L-pirrolidonil- β -naftilamida - PYR) e também leucina aminopeptidase (que hidrolisa L-leucina- β -naftilamida - LAP) (RAMSEY; HARTKE; HUYCKE, 2014; TEIXEIRA et al., 2015).

Estes microrganismos estão amplamente distribuídos na natureza, isto porque uma variedade de características intrínsecas favorece que cresçam e sobrevivam em diferentes condições (mesmo que aparentemente adversas). Por apresentarem esta distribuição ubiquitária,são encontrados no solo, alimentos, água e em diversos hospedeiros animais. Em seres humanos fazem parteda microbiota do trato gastrointestinal, bem como geniturinário e cavidade oral (TEIXEIRA et al., 2015).

Atualmente, de acordo com Euzéby J.P. no sítio *List of Procaryotic Names with Standing in Nomeclature*(http://www.bacterio.cict.fr; acesso em março de 2017), o gênero *Enterococcus*conta com 50 espécies e duas subespécies. *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* se destacam em frequência tanto como colonizadores, quanto agentes de infecções endógenas ou exógenas (KAISER, 2003; SOOD et al., 2008). Outras espécies, incluindo *Enterococcus avium, Enterococcus gallinarum, Enterococcus casseliflavus, Enterococcus hirae, Enterococcus durans, Enterococcus mundtii* e *Enterococcus raffinosus,* também tem sido isoladas de infecções humanas (ALOTAIBI; BUKHARI, 2017; CELIK; CAKIRLAR; TORUN OKADA, 2014; HANGAI; ODA, 2015; SHARIFI-RAD et al., 2016).

A expressão de resistência intrínseca a uma gama de antimicrobianos, comumente empregados no tratamento de infecções causadas por Gram-positivos(tais como, cefalosporinas, lincosaminas, trimetoprim-sulfametoxazol, beta-lactâmicos e aminoglicosídeos), também é característica do gênero *Enterococcus*. Adicionalmente, esses microrganismos ainda exibem a habilidade de adquirir elementos genéticos móveis, que

carreiam genes de resistência aos antimicrobianos. Mecanismos adquiridos decorrentes da aquisição de DNA extracromossômico, como plasmídeos e transposons, além de mutações, induzem resistência a níveis elevados de uma variedade de antimicrobianos, principalmente aminoglicosídeos (comogentamicina e estreptomicina), beta-lactâmicos, clindamicina, cloranfenicol, eritromicina, fluoroquinolonas, glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina) e tetraciclina. Esse perfil flexível de aquisição de determinantes genéticos de resistência, que permeia as várias classes de antimicrobianos, contribui para o desafio do controle da disseminação de amostras multirresistentes, que nos últimos 20 anos vêm se impondo com reconhecido impacto no cenário hospitalar em todo o mundo(BAYLAN et al., 2011; CATTANEO et al., 2010; CERCENADO, 2011; CHOU et al., 2008; FACKLAM et al., 2002; FAKIH et al., 2017; KAK; CHOW, 2002; GAWRYSZEWSKA et al., 2017; KLARE et al., 2003; KWON et al., 2012; MURRAY, 1998; RUDY et al., 2004, VALDEZATE et al., 2009; YAZGI et al., 2002).

Amostras exibindo resistência a níveis elevados de aminoglícosídeos (fenótipo HLAR, high-level aminoglycoside resistance) e/ou resistência aos glicopeptídeos reconhecidamente retratam os principais dilemas para o tratamento das infecções enterocócicas (ASLANGUL et al., 2005; BAYLAN et al., 2011;CERCENADO, 2011; FILIPOVÁ et al., 2005;KLARE et al., 2003; KWON et al., 2012). Em parte, isso se deve ao fato de que a combinação de um agente ativo contra a parede celular (normalmente ampicilina) e um aminoglicosídeo (como gentamicina) é o esquema terapêutico indicado para o tratamento das enterococcias graves, como bacteremias acompanhadas ou não de endocardite. O uso desta associação está fundamentado na resistência intrínseca que esses microrganismos apresentam para as duas classes de antimicrobianos, devido a um defeito na energização oxidativa da membrana celular bacteriana, resultando em uma redução da permeabilidade para os aminoglicosídeos, e na presença constitutiva proteínas ligadoras de penicilina (PBPs, *penicillin-binding proteins*) de baixa afinidade (por exemplo, PBP5) (CERCENADO, 2011; FONTANA et al., 1996; ZAPUN et al., 2008). O emprego concomitante de ambas as classes, se sobrepõe à resistência intrínseca e resulta em efeito sinérgico de baixa toxicidade e eficaz (CHOW, 2000; KLARE et al., 2003).

Por outro lado, a resistência adquirida é na maioria das vezes decorrente da expressão de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs, codificadas por elementos genéticos extracromossômicos) ou mutações nos sítios alvo. Portanto, as infecções causadas por amostras que exibem resistência adquirida a níveis elevados desses antimicrobianos são refratárias ao tratamento usual, e nesses casos, na maioria das vezes o emprego de vancomicina passa a ser o preconizado (ASLANGUL et al., 2005; BAYLAN et al., 2011; CHOW, 2000; FILIPOVÁ et al., 2005; KLARE et al., 2003).

Entretanto, amostras de enterococos exibindo mecanismos de resistência adquirida à vancomicina - VRE (do inglês vancomycin-resistant enterococci), vêm sendo relatadas em frequência elevada. Amostras VRE, cuja emergência se deu na segunda metade dos anos 1980 (LECLERCQ et al., 1988; UTTLEY et al., 1988), demonstram elevada capacidade de disseminação, sendo rapidamente transmitidas de paciente para paciente, configurando situações de surto e/ou endemicidade, em várias instituições de todo o mundo (CHOTIPRASITSAKUL et al., 2016; HAMMOND et al., 2016; HENSEL et al., 2017; HERRERA et al., 2017; JOLIVET et al., 2016; LAI et al., 2017; MCGOWAN, 2004).

A prevalência de VRE tem aumentado drasticamente desde os anos 90. Dados do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, Atlanta, GA, EUA) mostraram um aumento de 0,3% em 1989 para mais de 25% em 1999 (Kurup et al., 2008). Aproximadamente, 25% das infecções enterocócicas em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) foram relacionadas à VRE (LEE et al., 2016; MAZZEFFI et al., 2017; NNISS, 2003; RICE et al., 2004; SABOUNI et al., 2017).

No Brasil, os primeiros relatos de isolamento de amostras VRE portadoras de vanA ocorreram em 1997, em São Paulo (ZANELLA et al.,1999). Em 2000, nosso grupo descreveu o primeiro caso em nosso Estado (ALBUQUERQUE, 2000). Logo em seguida, ocorreram relatos no Rio Grande do Sul (D'AZEVEDO; DIAS; TEIXEIRA, 2006). O surgimento e disseminação dessas amostras no Sul e Sudeste foram precoces em relação às demais regiões do país. Entretanto, a presença de amostras VRE já foi identificada nos estados das diversas regiões brasileiras (CORREA et al., 2015; COSTA, 2012; PALAZZO et al., 2011; RESENDEet al., 2014;RIBAS et al., 2007;VILELA et al., 2006)

Os glicopeptídeos atuam ligando-se com alta afinidade ao pentapeptídeo precursor do peptideoglicano, componente básico da parede celular, especificamente na porção C-terminal do dipeptídeo D-alanina-D-alanil (D-Ala-D-Ala). Sendo assim, bloqueia a transglicosilação dos demais precursores à cadeia de peptideoglicano nascente; e evita a subsequente ligação cruzada, através de transpeptidação, para a formação da parede celular. A resistência é devido à presença de genes que codificam enzimas para a síntese de precursores com baixa afinidade pelo antimicrobiano, nos quais o resíduo C-terminal D-Ala é substituído por D-lactato (D-Lac) ou D-serina (D-Ser), modificando, portanto, o sítio de ligação da vancomicina (COURVALIN, 2006).

Os fenótipos de resistência já descritos são: VanA, VanB, VanD e VanM caracterizados pela síntese de D-Lac como principal precursor do peptídeoglicano; além de VanC, VanE, VanG, VanL e VanN que produzem D-Ser. Estes fenótipos determinam níveis variados de resistência aos glicopeptídeos, sendo VanA e VanB os mais amplamente estudados.(HEGSTAD et al., 2010; KLARE et al., 2003; LEBRETON et al., 2011; WERNER et al., 2008; XU et al., 2010). Em geral, dentre os fenótipos de resistência adquirida aos glicopeptídeos, VanA é o mais difundido entre os enterococos, tendo como principal reservatório a espécie *E. faecium*. Éresponsável pela resistência induzida a níveis elevados de vancomicina (concentração inibitória mínima - CIM > $64\mu g/mL$) e de teicoplanina (CIM > $8-32\mu g/mL$) (COURVALIN, 2006; KLARE et al., 2003; LANDERSLEVet al., 2016; VAN HAL et al., 2016; WARDAL et al., 2017).

O fenótipo VanA é codificado por um conjunto de sete genes, denominado conjunto gênico vanA (vanSRHAXYZ), normalmente presentes no transposon Tn1546 ou relacionados, localizados em um plasmídeo de alta frequência de transferência (ARTHUR; QUINTILLIANI, 2001; DEPARDIEU et al., 2007; KOTEVA et al., 2010; TALEBI et al., 2008). Os setes genes que participam da expressão deste fenótipo estão divididos em três grupos funcionais: (i) os genes vanS e vanR participam da regulação da resposta e são os responsáveis pela expressão de proteínas relacionadas à detecção da presença do antimicrobiano no meio extracelular e na sinalização intracelular; (ii) os genes vanH, vanA e *vanX* participam do mecanismo efetor da resistência; e *vanY* e *vanZ* são considerados genes acessórios, cuja função de seus produtos ainda não está bem definida (ARTHUR; QUINTILLIANI, 2001; KOTEVA et al., 2010). A proteína quinase VanS reconhece o estímulo que sinaliza a presença de vancomicina no ambiente acarretando na autofosforilação de um resíduo de histidina na porção citoplasmática da proteína. A porção fosforilada, por sua vez, transfere o grupo fosforil para um resíduo de aspartato presente na proteína reguladora VanR, o qual se dimeriza, aumentando a ligação aos dois promotores localizados no lócus van e consequente aumento da transcrição de ambos – genes de resistência e reguladores (DEPARDIEU; COURVALIN; KOLB, 2005).

Adicionalmente, há substanciais evidências que VanS funciona como uma fosfatase para VanR sob condições não indutoras, como uma forma de prevenção da ativação da expressão pela fosforilação da proteína VanR por outras quinases presentes na célula ou via autofosforilação a partir do grupamento acetil-fosfato (DEPARDIEU; COURVALIN; KOLB, 2005). Como resultado, a atividade de fosfatase da proteína VanS é crítica na manutenção da via sinalizadora, quando na ausência do antibiótico indutor. Mutações que danificam a atividade de VanS (ou inativam a proteína completamente) levam a expressão constitutiva dos genes de resistência (ARTHUR; QUINTILIANI, JR., 2001; DEPARDIEU et al., 2004; PANESSO et al., 2010).

Enterococcus podem causar diversas infecções monomicrobianas e polimicrobianas, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Nos últimos vinte anos, estes microrganismos têm atingido destaque significativo como agentes de infecções relacionadas à assistência em saúde (IrAS), particularmente as hospitalares. As espécies *E. faecalis* e *E. faecium* são globalmente reconhecidas como prevalentes em infecções humanas, contribuindo com 80%-90% e 5%-10% dos casos, respectivamente. Com relação às infecções causadas por VRE, estas têm sido consideradas como endêmicas na maioria dos hospitais e a sua prevalência, entre as enterocococcias, já chegou a atingir patamares em torno de 28% nos EUA e superiores a 40% na Europa (ABELE-HORN et al., 2006; DESHPANDEet al., 2007; EARSS 2006; FREITAS et al., 2016; HARTHUG et al., 2002; HOGARDTet al., 2015; LEAVIS et al., 2006; MENDES et al., 2016; MONTESERIN et al., 2016; SIEVERT et al., 2013; TORELL et al., 2003; TREITMAN et al., 2005).

Entretanto, um fato curioso é que tem sidoevidenciado um aumento considerável na participação da espécie *E. faecium* em IRAS nas últimas duas décadas. Alguns estudos já reportaram que em unidades complexas, como a de UTI, e naquelas que atendem a pacientes especiais, como hemodiálise, pediatria e hematologia oncológica, a quase totalidade das infecções foram atribuídas à espécie *E. faecium* (AKTÜRK et al., 2016;BILLSTRÖM et al., 2008; CILO et al., 2014; GALLOWAY-PEÑAet al., 2009; HIDRON et al., 2009; KUZDANet al., 2014; LARRU et al., 2016; LEAVIS et al., 2006; LESTER et al., 2008; RENK et al., 2015; TOP et al., 2008; 2012; YAMAMOTO et al., 2015).

A espécie *E. faecium* apresenta resistência intrínseca a um número maior de antimicrobianos do que *E. faecalis* (HOLLENBECK; RICE, 2012; AGUDELO HIGUITA; HUYCKE, 2014). Também, é reconhecido que a frequência de amostras clínicas de *E. faecium*apresentando características adquiridas de resistência à vancomicina, ampicilina e a níveis elevados de aminoglícosídeos é igualmente elevada em estudos de diferentes regiões do mundo, atingindo valores superiores a 50% (EMANEINI et al., 2016; MIRNEJAD et al., 2016; YIM et al., 2017). De certa forma, tais situações sustentariam em parte uma maior capacidade de sobrevivência, manutenção e disseminação de *E. faecium* nas condições adversas do ambiente hospitalar. Além disso, apesar da presença de resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos e aos macrolídeos também ser frequente entre amostras clínicas de *E. faecalis*, a quase totalidade das amostras clínicas desta espécie tem se mantido sensível à

vancomicina e à ampicilina, por razões que ainda não foram elucidadas (ARABESTANI et al., 2017; DJURIC et al., 2016; LEE et al., 2017; SHOKOUHIet al., 2017).

A estrutura populacional de amostras de *E. faecium* resistentes à vancomicina foi identificada em estudos que empregaram ferramentas moleculares em investigações epidemiológicas e permitiram caracterizar os padrões de descendência evolutiva desses microrganismos. Os dados obtidos apontaram a existência de uma subpopulação distinta, que passou a ser formalmente conhecida como linhagem C1, caracterizada em estudos iniciais pela metodologia de análise do polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP, *amplified fragment length polymorphism*). Com o emprego de técnicas mais modernas de tipagem molecular, como MLST (*multilocus sequence typing*), a linhagem descrita foi melhor caracterizada como um complexo clonal, denominado CC17 (CATTOIR; GIARD, 2014; GALLOWAY-PEÑA et al., 2012; KWON et al., 2012; LEAVIS et al., 2006; TOP et al., 2008; WERNER et al., 2010; WILLEMS et al., 2005; 2011).

O CC17 apareceu como responsável pela grande maioria das infecções nosocomiais e surtos causados por *E. faecium*. Logo após os estudos iniciais, que descreveram este complexo clonal, publicações adicionais confirmaram a presença desta subpopulação não apenas em hospitais dos EUA (país presumivelmente com maior número de infecções enterocócicas), mas disperso nos cinco continentes (AKPAKA et al., 2017; BONORA et al., 2004; 2007; KHAN et al, 2010; KO et al., 2005; KOH et al., 2006; LEAVIS et al., 2006; LOPEZ et al., 2009; PANESSO et al., 2010; SHOKOUHI et al., 2017; WERNER et al., 2008; WHELTON et al., 2016; WILLEMS et al., 2005; YANG et al., 2015).

O sucesso ecológico de CC17 no ambiente hospitalar está, em parte, relacionado com seus atributos de resistência aos antimicrobianos e de virulência. Amostras pertencentes a este complexo são resistentes à ampicilina e quinolonas e contam, também, com a presença de uma putativa ilha de patogenicidade. Esses dados apontam a dinâmica evolutiva das populações de enterococos associadas a infecções nosocomiais. Considera-se que modificações provavelmente cumulativas contribuíram para a predominância de subpopulações altamente especializadas. Estas são capazes de sobreviver e se disseminar, de forma mais eficiente, por ambientes que exigem adaptação contínua, como um hospital (CHANG et al., 2010; COQUE et al., 2002; LEAVIS et al., 2006; WILLEMS et al., 2005; 2009).

Complementar aos estudos utilizando MLST, as análises recentes de sequenciamento do genoma total têm permitidouma investigação da diversidade de *Enterococcus* a uma profundidade antes não atingida. No primeiro estudo baseado em genoma de *E. faecium*, sete isolados foram sequenciados. Com base numa análise filogenética dos alinhamentos

concatenados de 649 sequências de proteínas, foi demonstrado que a estirpe comensal humana estava distantemente relacionada com os outros seis isolados de *E. faecium*, o que sugeria a existência de uma divisão profundamente ramificada dentro da espécie (VAN SCHAIK et al., 2010).Curiosamente, uma divisão semelhante entre dois clades ou subpopulações principais dentro de *E. faecium* tinha sido previamente sugerida por estudos baseados em RAPD, AFLP e PFGE (VANCANNEYT et al., 2002, VANKERCKHOVEN et al., 2008). A divisão em dois cladestambém já foi encontrada em análises por MLST e em estudos adicionais baseados em sequenciamento do genoma (DE BEEN et al., 2013; GALLOWAY-PEÑA et al., 2011; 2012; PALMER, et al., 2012; QINet al., 2012; RAVEN et al., 2016). Lebreton e colaboradores (2013) descreveram as seguintes subpopulações de *E. faecium*:(i) cladeA1, a qual inclui a maioria dos isolados clínicos, os quais foram previamente classificados como pertencentes ao CC17; (ii) cladeA2, incluindo a maioria das amostras isoladas de animais; e (iii) cladeB, contendo amostras comensais humanas.

Apesar do conhecimento da virulência em *E. faecium* ainda ser limitado, estudos recentes indicam que estruturas de superfície associadas à formação de biofilmes poderiam estar contribuindo para a manutenção e disseminação dessas amostras no ambiente hospitalar (HEIKENS et al., 2007; HENDRICKX et al., 2009; NAGARAJANet al., 2016; SAVA et al., 2010; VAN WAMELet al., 2007; ZOU et al., 2016). A associação entre as infecções enterocócicas nosocomiais com a habilidade desses microrganismos em formar biofilmes é mais evidente quando há o envolvimento de dispositivos médicos (como cateteres venosos centrais, urinários e próteses). Por exemplo, o cateterismo vesical é um dos procedimentos mais comumente utilizado em pacientes hospitalizados. O risco de infecção associado a esses dispositivos está diretamente relacionado ao seu tempo de permanência que facilita o estabelecimento de comunidades de microrganismos e formação de biofilmes (AZEVEDO et al., 2016;BUIJSSEN et al., 2017; DONLAN; COSTERTON, 2002; KIRMUSAOGLU et al., 2017; SOOD et al., 2008).

No final dos anos 1980, Lemoine e Hunter (1987) notaram um aumento de 11% para 20% de isolamentos de enterococos a partir da urina de pacientes cateterizados, em um período de seis anos de análise. Dados do sistema NHSN (*National Healthcare Safety Network*, CDC), classificaram os enterococos como o terceiro patógeno mais frequente relacionado às infecções do trato urinário associadas a cateteres no período de 2006 a 2007, ficando atrás apenas de *E. coli* (21,4%) e *Candida sp.* (21%) (EDWARDS et al., 2009). Mais recentemente, estes microrganismos permanecem como importantes patógenos nessas

infecções, tendo sido relacionados a um percentual que pode variar de 15% a 30% das infecções urinária associadas a cateter (ROUSSEAU et al., 2016).

Além desses, os cateteres intravasculares e válvulas cardíacas protéticas, que permanecem em contato direto com o fluxo sanguíneo e passam a ser revestidos por plaquetas, plasma e proteínas de matriz extracelular como fibronectina, colágeno, fibrinogênio e lamininasão constantemente associados ao desenvolvimento de infecções como endocardites e bacteremias. A presença dessas proteínas do hospedeiro, associadas ao dispositivo, resulta na formação de um filme condicionante altamente propício à instalação de biofilmes (DONLAN, 2011; PRADEEP et al., 2013; SOOD et al., 2008; YOUSIF; JAMAL; RAAD, 2015; ZHANG et al., 2014; 2016). Em 2003, dados do NNISS (*National Nosocomial Infections Surveillance System*), pertencente ao CDC, indicaram que 13,5% das infecções sanguíneas associadas a cateteres intravasculares eram causadas por *Enterococcus*, representando um aumento de 8% em relação a dados anteriores de 1986 a 1989.

atualmente, que os biofilmes são Sabe-se. importantes reservatórios de microrganismos no ambiente hospitalar. Contudo, foram os estudos pioneiros de Costerton e colaboradores, em 1970 e 1980, que revelaram que os microrganismos podem aderir a superfícies e formar agregados celulares, diferentemente de conceitos anteriores onde se acreditava que cresciam somente em suspensão (apud COSTERTON, 1987). O conceito da existência dos microrganismos em forma de biofilmes mudou o paradigma da Microbiologia e revolucionou os estudos sobre as doenças infecciosas. Também, é reconhecido que os biofilmes sãoo formato preferencial de crescimento dos microrganismos na natureza (HALL; MCGILLICUDDY; KAPLAN, 2014; ORELL; FRÖLS; ALBERS, 2013). Adicionalmente, tem sido demonstrado que 80% de todas as doenças infecciosas estão relacionadas à presença de biofilmes, o que demonstra a importância dos estudos sobre este fenômeno microbiológico (DELCARU et al., 2016; DONLAN; COSTERTON, 2002; HUGHES; WEBBER, 2017; LEWIS, 2001; PERCIVAL, 2017; ROWSON & TOWNSEND, 2016).

Biofilmes consistem de células isoladas e microcolônias embebidas em uma espessa e hidratada matriz composta, predominantemente, de exopolímeros e aderidas a uma superfície biótica ou abiótica, ou mesmo a interfaces (DONLAN; COSTERTON, 2002). São encontrados sob diversas condições ambientais, do protegido e especializado ambiente dentro de hospedeiros mamíferos ao extremo de sobrevivência biológica (DE MULDER et al., 2016; KRISHNAN et al., 2017; O'TOOLE et al., 2000;PUZON et al., 2017; RASMUSSEN, 2000; WESTALL et al., 2001; WU et al., 2017).

A formação de biofilme ocorre em um processo sequencial de desenvolvimento, culminando em uma estrutura organizada. Todo processo é regulado por *quorum sensing*, que é determinado por moléculas sinalizadoras, chamadas autoindutores, que dirigem a expressão gênica em resposta à densidade populacional. Envolve adesão, interação célula a célula, formação de microcolônias, de um biofilme confluente e, por fim, de uma estrutura tridimensional (DONLAN, 2002; HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004; HOFER, 2016; KÅHRSTRÖM, 2012; O'TOOLLE et al., 2000).

O mecanismo de formação ocorre em eventos distintos. Inicialmente, têm-se organismos denominados colonizadores primários. Essa colonização inicial é mediada por interações físico-químicas com a superfície, geralmente contendo proteínas ou outros compostos orgânicos que formam um filme condicionante, facilitando a aproximação do microrganismo com o substrato. No entanto, a formação de estruturas maduras é dependente de condições ambientais, através de fatores e vias de regulação que afetam os elementos enzimáticos e estruturais, que são necessários para a formação e dispersão. Essas condições incluem temperatura, pH, níveis de oxigênio, hidrodinâmica, osmolaridade e presença de determinados íons, nutrientes e fatores derivados do meio biótico (COSTERTON et al., 1987; DUNNE Jr, 2002; GOLLER; ROMEO, 2008; LAPPIN-SCOTT; BASS, 2001).

Em condições adequadas, os colonizadores primários se desenvolvem originando microcolônias, que passam a atuar como substrato para a aderência dos secundários, formando verdadeiras comunidades bacterianas (RICKARD et al., 2003). De manera concomitante, ocorre o aumento da produção de uma substância polimérica extracelular (EPS, *extracellular polymeric substance*) para criar uma matriz em torno das células constituintes. Grupos de células são separados por canais, através dos quais há a passagem de nutrientes e íons necessários para o desenvolvimento do biofilme (STEWART; FRANKLIN, 2008).

Uma vez o microrganismo estando irreversivelmente aderido ao substrato, inicia-se o processo de maturação. A densidade dos grupos celulares e a complexidade aumentam, caracterizando os biofilmes. Esta população se expande até atingir o equilíbrio, onde as células mais externas começam a se destacar, o que determinará a colonização de outros substratos (DUNNE Jr, 2002; MARSHAL, 1992). Este destacamento pode ocorrer pelo fluxo de fluidos ou por um processo ativo por parte das bactérias que secretam enzimas que quebram a matriz estrutural (NADELL et al., 2009; TELGMANN et al., 2004).

A função da EPS ainda não foi bem esclarecida, mas parece promover a adesão e providenciar suporte estrutural. Mutantes deficientes para a produção de EPS não foram capazes de formar biofilmes (NADELL et al., 2009). As propriedades físicas e químicas das

substâncias poliméricas extracelulares podem variar. São predominantemente aniônicas, podendo ser compostas por íons metálicos, cátions divalentes e outras macromoléculas como proteínas, DNA e polissacarídeos (BRIANDET et al., 2001; DONLAN; CONSTERTON, 2002; DUNNE Jr, 2002; GHIGO, 2003).

Sabe-se que a formação de biofilmes não é um evento isolado dos demais fatores de virulência. Há uma série de interações entre a expressão de determinados fatores que juntos operam para o sucesso da "engenharia dos biofilmes" (DI ROSA et al., 2006; DWORNICZE et al., 2012; HANCOCK; PEREGO, 2004; MOHAMED; MURRAY, 2005; SANDOE et al., 2003; TENDOLKAR et al., 2004; TOLEDO-ARANA et al., 2001). Muitos dos fatores envolvidos na virulência de *Enterococcus* têm sido descritos como coadjuvantes no processo de desenvolvimento dos biofilmes. Dentre eles, adesinas, proteases, autolisinas, glicolipídios e ácidos lipoteicóicos contribuem direta ou indiretamente para a aderência inicial nos processos de formação e, possivelmente, nas interações intercelulares e com moléculas presentes no ambiente (BAO et al., 2015; BERNE et al., 2015; DEMUYSER; JABRA-RIZK; VAN DIJCK, 2014; FERNÁNDEZ et al., 2017; FONG & YILDIZ, 2015; KLEIN et al., 2015; PAGANELLI; WILLEMS; LEAVIS, 2012).

Dentre as adesinas de *Enterococcus* estudadas destaca-se Esp – do inglês, enterococcal surface protein – uma grande proteína ancorada na parede celular, com um peso molecular de aproximadamente 200 KDa (HENDRICKX et al., 2009). Foi detectada primeiramente em uma amostra da espécie *E. faecalis*, resistente a gentamicina e altamente virulenta e responsável por um grande surto hospitalar em meados dos anos 80, em Madison, nos EUA (SHANKAR et al., 1999). Esp está relacionada com a colonização e aderência às células epiteliais do trato urinário. Tem sido encontrada em uma frequência elevada de amostras de *E. faecalis* e *E. faecium* isoladas de infecções, quando comparadas às obtidas de colonização, reforçando sua importância na patologia das enterococcias (HEIKENS et al., 2007; SHANKAR et al., 1999).

Esp possui 1.873 aminoácidos e seu gene está localizado em uma ilha de patogenicidade inserida no cromossoma bacteriano. A região N-terminal (do aminoácido 50 ao 743) revela que os primeiros 49 aminoácidos servem como uma sequência sinal, direcionando a exportação da proteína madura. O domínio N-terminal não possui regiões repetidas e não apresenta similaridade com outras proteínas catalogadas em bancos de dados públicos. A região central (do aminoácido 744 ao 1665) é constituída de três domínios compostos de regiões repetidas em tandem, denominadas A, B e C e o número destas repetições varia entre amostras distintas. A região C-terminal de Esp (do aminoácido 1666 ao

1873) possui uma região hidrofóbica que contém [Y/F]PXTG, sendo uma variação do motivo âncora LPXTG (Leu-Pro-X-Thr-Gly, onde X é qualquer aminoácido seguido por um domínio hidrofóbico C-terminal e uma cauda de resíduos carregados positivamente em sua maioria) encontrado na maioria das proteínas ancoradas na superfície da parede celular. Este motivo serve como sítio de reconhecimento de uma sortase, que possui atividade de transpeptidase e atua no ancoramento de Esp na superfície das células de enterococos (HENDRICKX et al., 2009; SHANKAR et al., 1999; TOLEDO-ARANAet al., 2001).

Esp está associada com a formação de biofilmes por amostras das espécies *E. faecium* e *E. faecalis*, por auxiliar na adesão inicial ao substrato e contribuir com o aumento da hidrofobicidade da superfície celular (TENDOLKAR et al., 2004). Um estudo pioneiro para analisar esses fatores foi feito por Toledo-Arana e colaboradores (2001). Os autores detectaram a similaridade estrutural de Esp com uma proteína da superfície celular de *Staphylococcus aureus*, também envolvida com a formação de biofilmes, denominada Bap. Entretanto, os mesmos autores também observaram que, aparentemente, a formação de biofilmes pode ocorrer por mecanismos independentes da presença de Esp, que foram identificados em estudos empregando mutantes. A formação de biofilmes por vias independentes de Esp foi também demonstrada por Kristich et al. (2004).

Porém, a importância da participação de Esp na formação de biofilmes por enterococos foi referendada posteriormente por Tendolkar e colaboradores (2005), que demonstraram que mutantes que expressavam Esp com ausência da região N-terminal formavam quantitativamente menos biofilmes que amostras selvagens. Neste mesmo estudo, amostras que expressavam somente a região N-terminal acoplada a uma proteína heteróloga, para ancorar esta região na superfície celular, formavam biofilmes quantitativamente similares às amostras que possuíam o gene inalterado.

Adicionalmente, sabe-se que a persistência de enterococos no ambiente hospitalar, particularmente *E. faecium* VRE, tem sido associada à expressão de Esp (GALLOWAY-PEÑA et al., 2012; HARRINGTON et al., 2004; KWON et al., 2012; LEAVIS et al., 2006; TOP et al., 2008; WERNER et al., 2010; WILLEMS et al., 2005; 2011). Esta característica já foi apontada como um importante marcador de grupos clonais mais adaptados a uma determinada instituição, ou mesmo região geográfica, e potencialmente aptos a emergir em situações epidêmicas. A maioria absoluta das amostras pertencentes ao CC-17 apresenta o gene *esp*, sugerindo que esta seja uma das características que foram fundamentais à expansão global deste complexo clonal (LÓPES et al., 2012).

Amostras de *E. faecium*, são capazes de secretar fatores com atividade proteolítica contra diferentes células eucarióticas e bacterianas, também comuns a outras espécies do gênero como *E. faecalis*. Dentre os fatores já descritos destacam-se a gelatinase, que é uma zinco-metaloprotease extracelular e é reconhecida por contribuir potencialmente com a virulência, atuando na hidrólise de gelatina, caseína, colágeno, hemoglobina, componentes do sistema imune e outros compostos bioativos (JETT et al., 1994; QIN et al., 2000; THURLOW et al., 2010; VERGIS et al., 2002). Essa enzima foi caracterizada por Pirkko-Liisa Mäkinen e colaboradores, em 1988, e teve a sequência de seu gene, *gelE*, determinada por Su e colaboradores, em 1991. Na espécie *E. faecalis* a proteína GelE está amplamente distribuída tendo sida identificada em amostras obtidas de diferentes fontes, incluindo humanas, animais, de alimentos e de diversas fontes ambientais (ABRIOUEL et al., 2008; BARBOSA-RIBEIRO et al., 2016; CRETI et al., 2004;GULHAN et al., 2015; HEIDARI et al., 2017). Apesar de menos frequente, também já foi descrita em amostras de *E. faecium* diversas origens (FERGUSON et al., 2016; NIU et al., 2016;OLIVEIRA et al., 2016; STRATEVA et al., 2016; WU et al., 2016).

O gene *gelE* juntamente com *sprE*, responsável por codificar uma serina protease, estão localizados em um único óperon (*gelE/sprE*), cuja ativação é regulada pelo sistema *quorum sensing* derivado do lócus *fsr* (*E. faecalis regulator*), que apresenta considerável homologia com o lócus *agr* (*accessory gene regulator*) de *S. aureus* (QIN et al., 2001).

Estudos têm revelado a influência da gelatinase na virulência de *Enterococcus*. Qin e colaboradores (2000) demonstraram que amostras que contém os genes *fsrABC*, modificados por mutação, foram significativamente menos virulentos em modelo animal (peritonite em ratos). Em outro estudo, mutantes para *fsrA*, *fsrC*, *gelE* e *sprE* apresentaram virulência atenuada, pela redução das taxas de morte do modelo *Caenorhabditis elegans* (SIFRI et al., 2002). É considerado, também, que a gelatinase e a serina protease exerçam um papel crítico no desenvolvimento de biofilmes por *Enterococcus*. Estudos anteriores demonstraram que mutantes para o lócus *fsr* apresentaram redução na capacidade de formação de biofilmes. Adicionalmente, a produção de biofilmes por mutantes defectivos nesse lócus foi restaurada, após adição de gelatinase purificada ao meio (HANCOCK; PEREGO, 2004; MOHAMED et al., 2004).

A participação de gelatinase e serina protease tem sido explicada através de um mecanismo denominado fratricídio, já observado em diversas espécies bacterianas. Em *E. faecalis*, a gelatinase ativa a lise de uma subpopulação de bactérias, catalisando a liberação de DNA genômico, um componente crucial da matriz dos biofilmes. Uma subpopulação é

considerada como a "população predadora" por produzir gelatinase, um efetor da morte bacteriana, sendo refratária em virtude da co-transcrição de serina protease; enquanto que, uma segunda população, considerada como a "população presa", é susceptível à lise por não produzir as duas proteases. Assim, em resposta ao aumento da concentração de GBAP, as "células predadoras" co-secretam gelatinase e serina protease. Neste sistema, a gelatinase possui como alvo a autolisina A (AtlA), uma N-acetilglicosaminidase, localizada na superfície celular, importante para a separação das células durante o processo de divisão celular. Essa autolisina, quando atingida, é liberada por proteólise dos domínios N e C-terminal, assumindo uma conformação ativa e capaz de levar a lise das células vizinhas. A subpopulação de "células predadoras" não sofre lise por AtlA, devido a expressão de serina protease, comumente considerada como um fator de "imunidade" (ECKERT et al., 2006).

Thomas et al. (2009) demonstraram que a serina protease modifica AtlA da "célula predadora", aumentando sua afinidade pela parede celular e, consequentemente, prevenindo contra proteólise pela gelatinase. Além disso, as formas solúveis de AtlA (ativas), provenientes das células presas, são susceptíveis a uma segunda proteólise por gelatinase, determinando um controle adicional para que as "células predadoras" não sofram lise. Em outro estudo, Guiton e colaboradores (2009) demonstraram que *E. faecalis* mutantes para AtlA apresentaram decréscimo na capacidade de formação de biofilmes, pela redução da liberação de DNA.

Este mecanismo foi também proposto para *E. faecium* em experimentos demonstrados por Paganelli e colaboradores (2013) que através da inativação da AtlA obtiveram significativa resistência à lise, redução da liberação de DNA extracelular, deficiente aderência celular, decréscimo da formação de biofilme e diminuição da hidrólise da parede celular quando comparados ao controle com o gene da autolisina intacto.

Há uma série de outros fatores de virulência já descritos com papel acessório no desenvolvimento dos biofilmes de *Enterococcus*, particularmente os que desempenham papel de adesinas (ARIAS; MURRAY, 2012). Um grupo de proteínas que tem sido muito estudado é a família de proteínas de substância de agregação (*aggregation substance proteins - AS proteins*). Essas proteínas são codificadas por plasmídeos, que também carreiam genes de resistência aos antimicrobianos, e que são responsivos a feromônios. Dentre os plasmídeos responsáveis pela expressão de substâncias de agregação, o pAD1, que carreia o gene *asa1* é o mais estudado. Sequências específicas, presentes na proteína ASA1, reconhecem receptores do tipo integrinas em células eucarióticas, e interage com fibrina, fibronectina, vitronectina,

colágeno do tipo I e trombospondina (HIRT et al., 2002; ROZDZINSKI et al., 2001; SCHLIEVERTet al., 2010;WIRTH, 2000).

As proteínas denominadas Ace e Acm, características de *E. faecalis* e *E. faecium* (NALLAPAREDDY et al., 2003), respectivamente, pertencem a subfamília de adesinas bacterianas designadas MSCRAMMs (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) um conjunto de proteínas que são consideradas importantes elementos nos estágios iniciais de infecção pois especificamente interagem com integrantes de matriz, como colágeno, fibronectina e laminina (DUPRÈ et al., 2003). Entretanto, a participação direta dessas adesinas na formação de biofilmes ainda não está definida.

Potencializando a participação dos fatores de virulência, mencionados na formação de biofilmes por enterococos, está a capacidade dessas estruturas de resistir à ação de antimicrobianos. Biofilmes maduros podem tolerar concentrações até 1.000 vezes superiores àquelas necessárias para matar as células planctônicas (BOUDJEMAA et al., 2016;CHUAet al., 2016; GARRISONet al., 2016; HOLMBERG; RASMUSSEN, 2016; LEWIS, 2001; URISHet al., 2016). Considera-se que um dos motivos para o aumento dos níveis de resistência aos antimicrobianos esteja relacionado à atividade metabólica reduzida que é admitida nas células que compõem essas estruturas. Como a maioria dos antimicrobianos age sobre moléculas envolvidas em processos de síntese, é plausível que o lento ou o não crescimento das células do biofilme as tornem menos susceptíveis a ação da droga (HØIBY et al., 2010; RANI et al., 2007). Adicionalmente, a natureza estrutural do biofilme também contribui para a maior resistência aos antimicrobianos. Para atingir as células alvo, os antimicrobianos encontram uma barreira difusional formada pela matriz extracelular, constituída de DNA, proteínas e polissacarídeos. Tais constituintes podem interagir com o antimicrobiano, influenciando sua atividade, ou mesmo limitar o seu acesso às células dentro do biofilme (DONLAN; COSTERTON, 2002). A interação dos componentes da matriz do biofilme com os antimicrobianos tem sido alvo de estudos. Como exemplo, pode-se citar a natureza aniônica do alginato, reconhecido constituinte majoritário do EPS de biofilmes de Pseudomonas aeruginosa, que retém antimicrobianos catiônicos interferindo em sua ação (ANDERSON; O'TOOLE, 2008).

Além disso, a estrutura do biofilme possibilita a aquisição de determinantes de resistência, por facilitar os processos de transferência de genes (DAVEY; O'TOOLE, 2000). Em biofilmes, a resistência aos antimicrobianos, decorrente das características inerentes à sua estrutura e às condições metabólicas das células, pode ser ainda mais significativa considerando-se o arsenal de determinantes genéticos frequentemente presentes

nessesmicrorganismos. Assim, a transmissão dos genes de resistência aos antimicrobianos, como também de virulência, entre os microrganismos que estejam coexistindo em uma mesma estrutura, particularmente em biofilmes mistos ou multiespecíficos, se traduz como uma preocupação adicional às ações terapêuticas e ao controle das IRAS (AZEVEDOet al., 2016; BHARDWAJet al., 2017; OBST et al., 2006;PEREZet al., 2014; ROBERTS; MULLANY, 2010;WEIGEL et al., 2007).

O entendimento do comportamento das células que constituem os biofilmes, particularmente em comparação àquelas em estado planctônico tem sido alvo de estudos que já envolveram diferentes espécies bacterianas (BOOTH et al., 2011; CABRAL et al., 2011;FLETCHER, 1991; GOODMAN; MARSHALL, 1995; JOUENNE et al., 2004; LATTIF et al., 2011;LEN et al., 2003; RATHSAM et al., 2005; SHIN et al., 2009; SILVA et al., 2011; WANG et al., 2012;WELIN et al., 2004). Esses estudos têm se preocupado em compreender o perfil de expressão gênica de células sésseis, a fim de elaborar estratégias de controle da formação e manutenção de biofilmes microbianos. Nesse sentido, o desenvolvimento e aplicação de metodologias de análise proteômica trouxeram importantes avanços ao estudo do conjunto de proteínas expresso pelas células, tornando-se ferramenta fundamental para a comparação das variadas nuances de expressão gênica entre o crescimento planctônico e em biofilmes (LIAO et al., 2016; MOCHE et al., 2015;MUKHERJEE; CHATTERJI, 2008; PARK et al., 2015; PHILLIPS; BOGYO, 2005; QAYYUM et al., 2016; STIPETIC et al., 2016; WANG et al., 2016).

Estudos de transcriptoma e proteômica têm demonstrado que genes e proteínas nas células dos biofilmes são expressos diferentemente da forma de crescimento planctônico (CABALLERO et al., 2013; DE ANGELIS et al., 2015; HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004; LOSENSKY et al., 2016; QAYYUM et al., 2016; SAUER, 2003; WANG et al., 2012; YI et al., 2014). Tais variações são previsíveis, pois biofilmes são regidos por uma interação complexa entre fatores físico-químicos e as propriedades fisiológicas e genéticas das células que o constituem. Em um biofilme, a densidade celular é substancialmente maior que em uma cultura com células planctônicas. A maioria das células constituintes encontra limitações de nutrientes e oxigênio, bem como altos níveis de metabólitos secundários e fatores secretados. Consequentemente, dentro de um biofilme são encontradas subpopulações localizadas em regiões diversas, que apresentam diferentes perfis de expressão gênica (SENEVIRATNE et al., 2012; SPORMAN, 2008). Essa expressão diferencial é causa, também, da própria heterogeneidade encontrada dentro de um biofilme, no que tange ao gradiente de difusão em microescalas e pode variar dependendo da espécie

bacteriana (STEWART; FRANKLIN, 2008). Por exemplo, em *Escherichia coli* já foi demonstrado que as vias da pentose fosfato e glicólise encontram-se reprimidas nas células de biofilmes (MUKHERJEE et al., 2011). Em contraste, em *S. aureus* as células permanecem metabolicamente ativas nas fases tardias do desenvolvimento do biofilme (RESCH et al., 2006).

Vários estudos têm investigado as interações entre os biofilmes e as células do sistema imune inato na tentativa de elucidar a capacidade de evasão e persistência dessas estruturas. Apesar de ainda pouco esclarecido, a resistência às células do sistema imune do hospedeiro tem sido explicada pelo paradigma de sua baixa penetração nessas estruturas e pela observação da aparente menor habilidade de fagocitar as bactérias, um processo que tem sido chamado de "fagocitose frustrada" (CASTRO et al., 2017; COSTERTON, 2001; HANKE et al., 2012; HØIBY et al., 2001; STEWART; GERTRUD et al., 2012; THURLOW et al., 2011).

A maioria dos estudos disponíveis foi realizada com amostras das espécies *P*. *aeruginosa*, *S. aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, que sobreviveram à ação bactericida das células do sistema imune. Nesses estudos foi observado que, apesar dos polimorfonucleares (PMNs) terem sido capazes de fagocitar as bactérias nos biofilmes, produziram espécies reativas de oxigênio em níveis reduzidos, quando comparado à resposta às células bacterianas planctônicas (JENSENet al.,1990;JESAITIS et al.,2003;KRISTIAN et al., 2008; MITTAL et al., 2004; WALKER et al., 2005). Este fato sustenta o interesse em avaliações que auxiliem o entendimento da resposta do hospedeiro à presença de biofilmes, particularmente quando se considera que PMNs possuem um potente arsenal de compostos bactericidas, incluindo defensinas, catelicidinas e lisozimas(NATHAN, 2006; NAUSEEF, 2007); além de uma atividade bactericida notável pela habilidade de produzir grandes quantidades de intermediários reativos de oxigênio (ROI), catalizados por NADPH oxidase. Em adição à produção de ROI, PMNs também secretam citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α e IL-1 β , bem como quimiocinas como CXCL-2, CXCL-1 e CCL3(NATHAN,2006; WITKO SARSATet al.,2000).

Da mesma forma, diversos estudos já sugeriram que biofilmes bacterianos são capazes de modular a resposta de macrófagos, levando a diferenciação em populações não eficazes na sua erradicação. Sabe-se que macrófagos, comparativamente aos PMNs, além de possuírem uma meia vida maior, produzirem níveis elevados de mediadores pró-inflamatórios, serem potentes células fagocíticas presentes virtualmente em todos os tecidos, exibem uma notável plasticidade e podem mudar sua fisiologia em resposta a estímulos diversos gerados após injúria ou infecção (DAVIES; TAYLOR, 2015; GINHOUX et al., 2014; GONZALEZ-MEJIA; DOSEFF,2009; SERBINA et al.,2008; SILVA; CORREIA-NEVES, 2012).

Tais estímulos são tipicamente produzidos por diferentes células do sistema imune inato. Apesar dos próprios macrófagos expressarem, também, muitos fatores que influenciam na sua própria morfologia, incluindo as alterações que ocorrem durante o processo de fagocitose. Essas estímulos originam um espectro de populações de células com funções distintas, representado em um extremo pela população de macrófagos designada de M1 e em outro M2 (MOSSER; EDWARDS, 2008). Nessa classificação, a designação M1 foi reservada para macrófagos classicamente ativados, através de receptores do tipo Toll e interferon- γ (IFN-y). Os macrófagos M1 são importantes efetores microbicidas que exercem suas funções, em parte, através da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, em adição à produção de citocinas pró-inflamatórias. Já a designação M2 é representada, particularmente, por aqueles alternativamente ativados por IL-4 ou IL-13, que expressam arginase-1 (Arg-1), receptores de manose e receptor-α de IL-4 (MOSSER, 2003). Contudo, a classificação de M2 foi expandida, passando a incluir essencialmente todos os outros tipos de macrófagos, mesmo sabendo-se que células com diferenças bioquímicas e fisiológicas significativas passaram a ser incluídas neste grupo (BRAGA et al., 2015; CHÁVEZ-GALÁN et al., 2015; COMALADA et al., 2012; EDWARDS et al., 2006; MARTINEZ et al., 2008; MOOSER; EDWARDS, 2008; NOVAK; KOH, 2012).

Todas as observações já relatadas a respeito das interações biofilme/resposta imune são decorrentes de modificações genéticas em ambas as células, bacterianas ou fagocíticas, em resposta à troca de informações enviadas pelos produtos secretados. Contudo, células bacterianas quando no estado de biofilmes já apresentam modificações na expressão de diversas proteínas se comparadas ao estado planctônico. Diante disso, Scherr e colaboradores (2013) demonstraram que macrófagos alteram o perfil de expressão gênica de biofilmes. Análise por transcriptoma de biofilmes de *S. aureus*após exposição a macrófagos revelaram uma baixa regulação de mais de 550 genes dentro de uma hora. Essa repressão transcricional foi atenuada após 24h, e foi explicada pelo significativo grau de morte dos macrófagos nesse intervalo. Em contraste, PMNs não foram capazes de alterar o transcriptoma dos biofilmes no mesmo período avaliado (SCHERR et al., 2013).

Existem poucas investigações sobre a resposta imune a biofilmes de *Enterococcus* e pode-se dizer que os estudos com *E. faecium* são praticamente inexistentes. Porém, em relação à espécie *E. faecalis*, Baldassari e colaboradores (2005) utilizando amostras isogênicas desta espécie e visando avaliar o papel dos exopolissacarídeos, concluíram que esses microrganismos na condição de biofilmes são capazes de sobreviver dentro de células fagocíticas. Da mesma forma, Mathew e colaboradores (2010) demonstraram que amostras de
E. faecalis recuperadas de biofilmes, formados em dentina, foram capazes de aderir e sobreviver dentro de macrófagos *in vitro*. Os autores relataram que os estas células infectadas com *E. faecalis* recuperados de biofilmes produziram quantidades baixas de citocinas próinflamatórias, quando comparados aos infectados com aquelas provenientes do cultivo planctônico. Mais recentemente, Daw e colaboradores (2012) investigaram a interação de macrófagos e células dendríticas com biofilmes e células planctônicas de *E. faecalisin vitro*. Os autores revelaram que macrófagos e células dendríticas foram tanto capazes de fagocitar os microrganismos na forma de biofilmes, quanto planctônica. Porém, as bactérias associadas aos biofilmes sobreviveram por mais tempo no interior dos macrófagos, que secretaram níveis baixos de citocinas pró-inflamatórias.

Assim, diante do exposto, torna-se claro que os membros do gênero *Enterococcus*,que foram reconhecidos durante muitos anos como microrganismos colonizadores do trato gastrointestinal de seres humanos e animais, têm se mostrado capazes de exibir atributos, que reunidos parecem ter favorecido sua persistência e adaptabilidade a diferentes condições ambientais e hospedeiros. Dessa forma, nas últimas décadas, os membros deste gênero têm recebido destaque especial dentre os mais importantes microrganismos resistentes a múltiplos antimicrobianos associados às IRAS (ARIAS; MURRAY, 2012; CATTOIR; LECLERCQ, 2013; JIMÉNEZ-ALCAIDE et al., 2015; LOBDELL; STAMOU; SANCHEZ, 2012; ORSI; CIORBA, 2013; VAN TYNE; GILMORE, 2014).

Particularmente amostras VRE pertencentes à espécie *E. faecium*, passaram a integrar recentemente uma lista de patógenos prioritários divulgada pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2017; disponível em http://www.who.int/medicines/ publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1 – acesso em Março, 2017), como microrganismos de alta prioridade, pelo elevado risco à saúde dos seres humanos, mesmo diante das mais recentes estratégias terapêuticas. Além de exibirem um variado elenco de genes de resistência e poderem estar munidos de diversos determinantes de virulência, albergam complexos clonais de dispersão global, que vem promovendo a sua escalada do anonimato comensal para o protagonismo nos quadros infecciosos. Também, já se mostraram exímios na formação de biofilmes, que contribui para sua persistência, impactando diretamente nas estratégias de controle e erradicação (particularmente do ambiente hospitalar), tanto nos casos de colonização quanto de infecção.

1 **OBJETIVOS**

O objetivo deste estudo foi avaliar comparativamente as diferentes características genotípicas e fenotípicas apresentadas por dois representantes da espécie *E. faecium*, sendo uma amostra de referência e sensível a diversos antimicrobianos, isolada em um período anterior à Era Antibiótica e uma amostra multirresistente, oriunda de infecção urinária e isolada de uma instituição hospitalar no Estado do Rio de Janeiro em um período de surto, no ano de 2005. Foi utilizada uma gama de metodologias moleculares e fenotípicas para investigar as peculiaridades que distinguem duas amostras pertencentes ao mesmo gênero obtidas em épocas bastante diversas. Assim, foram objetivos específicos deste estudo:

- a) empregar técnicas fenotípicas e genotípicas para a caracterização fisiológica da espécie, avaliação da susceptibilidade a 19 antimicrobianos e detecção do determinante genético envolvido na expressão da resistência aos glicopeptídeos (genes*van*);
- b) caracterizara amostra clínica de *E. faecium*, de acordo com metodologias de tipagem molecular como eletroforese em campo pulsado – PFGE, tipagem por sequência multilócus – MLSTe análise do polimorfismo numérico de segmentos repetitivos em múltiplos loci- MLVA;
- c) investigar determinantes genéticos de resistência aos antimicrobianos e de virulência através de metodologia de PCR;
- d) caracterizar elementos genéticos móveis associados à resistência a vancomicina e identificar aspectos evolutivos associados através da investigação da integridade estrutural desses elementos pelo emprego de metodologias de PCR de sobreposição e sequenciamento;
- e) avaliara formação de biofilmes, através da medida da biomassa aderida pelo método semiquantitativo do cristal violeta, a arquitetura dessas estruturas e a distribuição dos constituintes macromoleculares (DNA e proteínas) na substância polimérica extracelular por microscopia confocal de varredura a laser (CLSM);
- f) investigar a resposta de macrófagos pertencentes à linhagem J.774 após interação com células planctônicas ou biofilmes de ambas as

amostras, através da dosagem de nitrito por metodologia colorimétrica e da produção das citocinas IFN- γ ; TNF- α ; IL-6 e IL-10 por ensaio imunoenzimático;

- g) avaliar visualmente a interação de macrófagos J.774 com células planctônicas e biofilmes de ambas as amostras bacterianas pelo emprego de CLSM;
- h) empregar metodologia de espectrometria de massas (do tipo ESI-Q-TOF) para identificar e comparar proteínas sintetizadas por células planctônicas *versus* biofilmes nas amostras bacterianas em estudo;
- i) avaliar o genoma da amostra clínica CL-6729 através de sequenciamento completo do genoma (WGS) através da plataforma Illumina.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Determinação de Aspectos Fenotípicos e Genotípicos de *E. faecium*: Características Gerais, Susceptibilidade aos Antimicrobianos e Tipagem Molecular

Foram avaliadas duas amostras pertencentes à espécie *Enterococcus faecium*.SS-1274 (derivada de NCTC 7171; ATCC 19434^T), amostra tipo da espécie, de origem humana e, de acordo com as informações que constam nas coleções de cultura onde foi originalmente depositada, é susceptível a diversos antimicrobianos e derivada de um isolamento primário anterior à introdução da prática da antibioticoterapia (Orla Jensen, 1919; de acordo com dados em http://www.hpacultures.org.uk). Já a CL-6729 é uma amostra clínica oriunda de infecção urinária, isolada no ano de 2005 de uma paciente do sexo feminino atendida em uma instituição hospitalar federal no estado do Rio de Janeiro.

As amostras bacterianas encontravam-se mantidas a -20°C em solução de leite desnatado a 10% (*Skim Milk*, BD Diagnostics, Franklin Lakes, NJ, EUA) acrescido de 10% de glicerol e integram a coleção de culturas do Laboratório de Apoio Biotecnológico, do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IM/UFRJ), sob a coordenação da Prof^a Lúcia Martins Teixeira. A partir dos estoques, as amostras foram reativadas após semeadura em meio ágar sangue de carneiro (Plast-Labor Ind. e Com., Rio de Janeiro, RJ) e incubação por 18 h – 24 h a $36^{\circ}C\pm1^{\circ}C$, para avaliação da pureza e viabilidade das culturas.

2.1.1 Testes Fisiológicos Convencionais

A caracterização de ambas as amostras foi reavaliada, para confirmação de dados, através do emprego de testes fisiológicos convencionais com base no proposto por Teixeira et al. (2015). A confirmação do gênero *Enterococcus* foi determinada pelas características morfotinturiais em esfregaços corados pelo método de Gram, bem como por testes de produção da catalase; hidrólise da esculina em presença de sais biliares; crescimento em presença 6,5%; de NaCl; hidrólise do L-pirrolidonil- β -naftilamida (PYR) e de L-leucina- β -naftilamida (LAP). A confirmação da espécie foi realizada através da avaliação da produção

de pigmento; motilidade; descarboxilação da arginina; utilização do piruvato de sódio; e produção de ácidos a partir da utilização dos açúcares L-arabinose, manitol, metil- α -D-glicopiranosídeo, D-rafinose, sacarose, sorbitol e D-sorbose (todos obtidos da Sigma – Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA).Os testes foram realizados a partir de crescimento bacteriano recente, definido como culturas puras obtidas após incubação por 18 h – 24 h a 36°C±1°C e em meio ágar sangue. A leitura dos resultados foi realizada em até sete dias de incubação.As amostras de referência *E. gallinarum* SS-1228; *E. casseliflavus* SS-1229; *E. faecalis* SS-1273 e *E. faecium* SS-1274 foram utilizadas como controle da qualidade dos testes.

2.1.2 <u>Avaliação da Susceptibilidade aos Antimicrobianos Através do Método de Disco</u> <u>Difusão (KIRBY-BAUER, 1966)</u>

As amostras bacterianas foram avaliadas quanto à susceptibilidade a 19 antimicrobianos. Para tal, a partir de um cultivorecente foi feita uma suspensão bacteriana em solução salina (0,85% de NaCl, USB Corporation, Cleveland, OH, EUA) estéril, ajustada para uma turbidez equivalente a escala de 0,5 McFarland (aproximadamente 1,5 x 10^8 UFC/mL). Com auxílio de *swabs*, as suspensões foram semeadas em ágar Müeller-Hinton (MHA, *Müeller-Hinton Agar*, BD Diag.), para obtenção de crescimento semiconfluente. Discos de papel de filtro impregnados com os antimicrobianos foram colocados sobre o inóculo. A leitura dos halos de inibição foi feita após incubação de $16 h - 18 h a 36^{\circ}C\pm1^{\circ}C$, exceto para a vancomicina, cujo período foi de 24 h.

A interpretação dos resultados obtidos, com a leitura dos halos de inibição, foi realizada de acordo com o documento M100-S25do*Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2015). Foram testados os seguintes antimicrobianos: ampicilina (10µg); ciprofloxacina (5µg); cloranfenicol (30µg); eritromicina (15µg); fosfomicina (200µg); levofloxacina (5µg); linezolida (30µg), nitrofurantoína (300µg), norfloxacina (10µg), penicilina (10u),quinupristina-dalfopristina (15µg), rifampicina (5µg), tetraciclina (30µg), teicoplanina (30µg), vancomicina (30µg), tigeciclina (15µg), doxiciclina (5µg) e discos contendo concentrações elevadas de estreptomicina (300µg) e gentamicina (120µg). Todos os discos foram obtidos da Oxoid Ltd (Basingstoke, Hampshire, Reino Unido). Os resultados obtidos com os discos de vancomicina e teicoplanina foram também avaliados para

determinação do fenótipo de resistência aos glicopeptídeos. Da mesma forma, o fenótipo HLAR foi caracterizado através dos resultados obtidos com o emprego dos discos de estreptomicina (HLSR, *high-level streptomycin resistance*) e gentamicina (HLGR, *high-level gentamicin resistance*) em concentrações elevadas.

As amostras de referência de *E. faecalis* ATCC 29212, A256 (resistente à vancomicina) e ATCC 51229 (resistente a níveis elevados de estreptomicina e de gentamicina) foram utilizadas como controle nos testes.

2.1.3 <u>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para Vancomicina por</u> <u>Metodologia de Microdiluição em Caldo</u>

A CIM foi determinada de acordo com os padrões estabelecidos pelo documento M07-A10 CLSI (2015).Para tal, foram preparadas soluções 10 vezes concentradas dos antimicrobianos. Com essas soluções, foram feitas diluições duplas e seriadas em caldo Müeller-Hinton (MHB, *Müeller-Hinton Broth*, BD Diag.) para vancomicina (Sigma – Aldrich Co.). Alíquotas de 100 µl de cada diluição foram distribuídas em placas de microtitulação de 96 poços e de fundo em "U" (Corning Inc., Acton, MA, EUA).

Os inóculos constaram de suspensões bacterianas com turvação semelhante à escala 0,5 McFarland em MHB, posteriormente diluídas na razão de 1/20 no mesmo meio de cultura. A partir desta, foram distribuídos 10µL em cada poço da placa, previamente preenchido com 100µl das diluições dos antimicrobianos. As microplacas foram incubadas por18 h – 24 h a $36^{\circ}C\pm1^{\circ}C$. Após o período de incubação, a CIM foi considerada como a menor concentração do antimicrobiano (em µg/mL) onde não foi identificado, visualmente, crescimento bacteriano.

2.1.4 Detecção dos Determinantes de Resistência à Vancomicina

A presença do gene *vanA* foi confirmada por reação em cadeia da polimerase (PCR), segundo as recomendações de Clark et al. (1995) e Satake et al. (1997). O DNA molde foi extraído com o *Illustra bacteria genomicPrep Mini Spin kit* (GE Healthcare Life Sciences,

Uppsala, Suécia), conforme recomendações do fabricante e a partir de um crescimento recente (18h a $36^{\circ}C\pm1^{\circ}C$) em caldo BHI (*Brain Heart Infusion Broth*, BD Diag.). As amostras *E. faecalis* A256 (portadora do gene *vanA*) e *E. faecalis* V583 (portadora do gene *vanB*) foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

A mistura de reação constou de 0,5µM de cada iniciador, 0,2 mM de uma solução de dNTP (100mM de cada), 2,5U de *Platinum* Taq polimerase, 1,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂) e água Milli-Q para um volume final de 100µL (todos os reagentes obtidos da Invitrogen – Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Essa mistura foi submetida a um ciclo de 95°C por 10 min, para lise e desnaturação do DNA, 30 ciclos de 94°C por 30 seg, 58°C por 30 seg, 72°C por 30 seg e um ciclo final de 72°C por 10 min, em um termociclador (*Veriti Thermal Cycler*, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As sequências (direção 5'-3') dos iniciadores utilizados foram:

vanA1 (*foward*) – CATGAATAGAATAAAAGTTGCAATA; e vanA2 (*reverse*) – CCCCTTTAACGCTAATACGATCAA.

A detecção dos produtos de amplificação foi feita por eletroforese em gel de agarose (Invitrogen – Life Tech.) a 1,2% em tampão TBE 0,5X (45 mM Tris, 45 mM ácido bórico, 1 mM EDTA, reagentes obtidos da Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Após a corrida eletroforética, por 1h a 100V, os géis foram corados com 0,5 μ g/mL de brometo de etídeo por 30 min, descorados em água por 2 h e, posteriormente visualizados e fotografados com auxílio do sistema MiniBis Pro (DNR Bio-Imaging System Ltd., Jerusalém, Israel). As corridas eletroforéticas foram acompanhadas de um padrão de pares de base (*100 pb DNA Ladder*, Invitrogen – Life Tech.) possibilitando, assim, estimar o tamanho dos produtos amplificados.Produtos de amplificação equivalentes a 1.030 pb, indicaram a presença do genótipo *vanA*.

2.1.5 <u>Definição dos Perfis de Fragmentação do DNA Cromossômico por Eletroforese em</u> <u>Campo Pulsado – PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis*)</u>

A metodologia utilizada seguiu as recomendações de Teixeira et al. (1997). O DNA cromossômico foi obtido pela técnica de lise *in situ*. A partir de um crescimento recente, em meio àgar sangue, foram preparadas suspensões bacterianas em 500 µL de tampão PIV (1M NaCl, 10mM Tris, pH 7,6), com turbidez ajustada para o equivalente ao padrão 8 da escala de

McFarland. O mesmo volume (500 μ L) de agarose de baixo ponto de fusão (*NuSieve GTG Agarose*,Lonza, Basiléia, Suíça) a 2%, confeccionada, também, em tampão PIV, foi adicionada às suspensões celulares. A mistura foi, imediatamente, vertida em moldes que, após solidificação, deram origem a pequenos blocos que foram tratados para obtenção do DNA bacteriano.

Os blocos foram incubados com uma solução de lise constituída de tampão EC (6mM Tris, pH 7,6; 1M NaCl; 100mM EDTA; 1% Sarcosyl, Bio-Rad Labs.) adicionado de 1 mg/mL de lisozima e 5 U/mL de mutanolisina (ambas obtidas da Sigma – Aldrich Co.), por 18 h – 24 h a $36^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ e sob agitação suave.

Em seguida, a solução de lise foi substituída por tampão ESP (0,5mM EDTA, pH 9,5; 1% Sarcosyl; 1mg/mL de proteinase K (Sigma – Aldrich Co.) e incubação por 18 h-24 h a 50°C em banho térmico. Os blocos foram, então, submetidos a quatro etapas de lavagem em tampão TE [10 mM Tris-HCl; 0,1 mM EDTA, pH 7,6 (Bio-Rad Labs.)], sendo duas por 30 min e as outras duas por 1h. Após as lavagens, os blocos foram incubados, por 2 h, em 250 μ L do tampão específico para endonuclease de restrição *Sma*I (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, EUA). Após a retirada do tampão, cada bloco foi incubado com 2U da respectiva enzima por 18 h-24 h a 25°C, em banho térmico.

Após o período de digestão com *Sma*I, os blocos foram fundidos a 70°C e aplicados em gel de agarose (Invitrogen – Life Tech.) a 1,2% em TBE 0,5X. Os fragmentos foram separados em um sistema de eletroforese em campo pulsado CHEF DRIII *Variable Angle System* (Bio-Rad Labs.), por 22h a 13°C com pulsos iniciais de 5 seg e finais de 35 seg, ângulo 120° e a 6V/cm. O gel foi corado com 0,5 µg/ml brometo de etídeo por 30 min, descorado em água por 2 h e, posteriormente, fotografado conforme descrito no item 2.1.4.

Perfis eletroforéticos de representantes clonais resistentes à vancomicina e circulantes no Estado do Rio de Janeiro, no período de 2004 a 2010, pertencentes ao banco de dados mantido no Laboratório de Apoio Biotecnológico (IM/UFRJ), foram utilizados para fins comparativos com o obtido pela digestão do DNA cromossômico da amostra CL-6729. Para tal, foram analisados com auxílio do aplicativo BioNumericsversão 7.6(Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica), utilizando-se o coeficiente de Dice para determinação dos percentuais de similaridade e o método UPGMA (*unweighted pair-group method with arithmetic averaging*)para construção do dendrograma.

A tipagem por MLST foi realizada segundo as recomendações Homan et al. (2002).A metodologia utilizada fundamenta-se na amplificação e sequenciamento de regiões internas de sete genes de manutenção celular (*housekeepinggenes*) de *E. faecium*.

O DNA da amostra foi obtido conforme descrito no item 2.1.4. Para detecção de cada alelo, preparou-se reações de PCR, individuais para cada gene, que constaram de 0,3µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Quadro 1), 0,2mM de cada dNTP, 1U de *Platinum* Taq polimerase, 2mM de cloreto de magnésio (MgCl₂) e 1µL da suspensão do DNA molde, para um volume final de 30 µL. As condições da PCR foram as seguintes: 1 ciclo de 95°C por 10 min, 30 ciclos de 94°C por 30 seg, para desnaturação do DNA, 50°C por 30 seg, para o anelamento dos iniciadores, e 72°C por 30 seg, para extensão das novas fitas de DNA, e 1 ciclo de extensão final a 72°C por 5 min, em termociclador.

Quadro 1 – Genes e oligonucleotídeos iniciadores utilizados no esquema de tipagem por MLST¹ para amostras de *Enterococcus faecium*

GENE / PRODUTO	OLIGONUCLEOTÍDEO / SEQUÊNCIA (direção 5' - 3')	TAMANHO DO AMPLICON ²
adk / adenilato quinase	F: TATGAACCTCATTTTAATGGG R: GTTGACTGCCAAACGATTTT	437
<i>atpA</i> / subunidade α da ATP sintetase	F: CGGTTCATACGGAATGGCACA R: AAGTTCACGATAAGCCACGG	556
ddl / D-alanina-D-alanina ligase	F: GAGACATTGAATATGCCTTATG R: AAAAAGAAATCGCACCG	465
<i>gdh</i> / glicose 6-fosfato desidrogenase	F: GGCGCACTAAAAGATATGGT R: CCAAGATTGGGCAACTTCGTCCCA	530
<i>gyd</i> / gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	F: CAAACTGCTTAGCTCCAATGGC R: CATTTCGTTGTCATACCAAGC	395
<i>pstS</i> / proteína transportadora de cassete de ligação de ATP fosfato	F: TTGAGCCAAGTCGAAGCTGGAG R: CGTGATCACGTTCTACTTCC	583
<i>purk/</i> fosforibosilaminoimidazol carboxilase	F: GCAGATTGGCACATTGAAAGT R: TACATAAATCCCGCCTGTTTC/T	492

Legenda: ¹MLST, Tipagem por sequenciamento multilocus; ²Tamanho do amplicon em pares de base; F, *foward*; R, *reverse*.

Os produtos amplificados foram submetidos à corrida eletroforética a 100 V por 1 h em gel de agarose (Invitrogen – Life Tech.) a 1,2% em tampão TBE 0,5X. A corrida foi acompanhada de um padrão de pares de base (*100 pb DNALadder*). Os géis foram corados, descorados, visualizados e fotografados, conforme descrito no item 2.1.4.

Os produtos amplificados foram purificados com auxílio do*DNA and Gel Purification kit* (GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, a concentração de cada produto foi quantificada empregando-se o*Quant-IT dsDNA BR Assay kit* e o fluorômetro *Qubit* (Invitrogen – Life Tech.).

As reações de sequenciamento foram preparadas em placas de 96 poços (*MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate*, Applied Biosystems) contendo: 0,32 μ M dos oligonucleotídeos iniciadores, 1 μ L do *BigDyeTerminator v3.1CycleSequencing kit* (Applied Biosystems)e de 50 ng a 100ng de DNA para um volume final de 10 μ L. O ciclo de sequenciamento foi realizado em termociclador com os seguintes parâmetros: 25 ciclos de 96°C por 10 min, 50°C por 5 seg e 60°C por 4 min.

Os produtos da reação foram sequenciados no *AB 3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosytems). As sequências foram editadas com auxílio do aplicativo de domínio público BioEdit – *Biological Sequence Alignment v.7.0.4* (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, EUA) e submetidas ao BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Em seguida, foram analisadas no banco de dados disponível no endereço https://pubmlst.org/efaecium, para comparação e determinação do alelo de cada lócus. O conjunto dos alelos determina o tipo MLST (ST) correspondente.

Os dados obtidos foram analisados com auxílio do aplicativo de domínio público eBURST V3 (*Imperial College*, Londres, Inglaterra) disponível no endereço http://eburst.mlst.net. A análise dos dados, baseados nos STs, deu origem à construção de árvores representativas do relacionamento genético (FEIL et al., 2004) entre a amostra avaliada neste estudoe as amostras obtidas em diversas localidades geográficas reunidas no banco de dados mundial (https://pubmlst.org/efaecium).

2.1.7 <u>Análise do Polimorfismo Numérico de Segmentos Repetitivos em Múltiplos Loci –</u> <u>MLVA (*multilocus variable number tandem repeat analysis*)</u>

A tipagem por MLVA foi realizada segundo as recomendações de Top et al., (2004). A metodologia utilizada foi baseada na amplificação de seis loci que apresentam repetições em tandem, designados como VNTR-1, VNTR-2, VNTR-7, VNTR-8, VNTR-9 e VNTR-10. O DNA foi obtido conforme já descrito no item 2.1.4.

Para detecção de cada segmento, foi preparada uma reação de PCR, que constou de: 0,5M do respectivo oligonucleotídeo iniciador (Quadro 2), 0,2mM de cada dNTP, 2,5U de *Platinum* Taq polimerase, 2,5mM de cloreto de magnésio (MgCl₂) e 2µL da suspensão do DNA molde, para um volume final de 30 µL. As condições da PCR para os seis loci avaliados incluíram igualmente uma desnaturação inicial de 95°C / 15 min e uma extensão final de 72°C / 5 min, além das seguintes etapas específicas para amplificação de cada lócus: VNTR-1, 35 ciclos de 94°C a 30 seg, 52°C a 30 seg e 72°C a 30 seg; VNTR-2 uma primeira etapa de 10 ciclos de 94°C / 30 seg, 70°C / 30 seg, com temperatura de anelamento diminuindo de 1°C a cada ciclo (em protocolo *touchdown*, PCR-TD), e 72°C / 10 min, seguido de um segundo PCR-TD, que incluiu 30 ciclos de 94°C / 30 seg, 55°C / 30 seg e 72°C / 10 min, com o tempo de extensão aumentando 20 seg a cada ciclo; VNTR-7, VNTR-8, VNTR-9 e VNTR-10, 10 ciclos 94°C / 30 seg, com redução de 1°C na temperatura de anelamento a cada ciclo (PCR-TD), e 72°C / 1 min, posteriormente, foram realizados 30 ciclos de 94°C / 30 seg, 55°C / 30 s

Quadro 2 – Características dos loci que compõem a metodologia de análise do polimorfismo numérico de segmentos repetitivos em múltiplos loci (MLVA) e sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de amplificação em cadeia da polimerase (PCR)

LÓCUS	TAMANHO DA REPETIÇÃO (em pb)	Nº DE REPETIÇÕES	SEQUÊNCIA DOS INICIADORES
VNTR-1	123	0-8	F: CTGTGATTTGGAGTTAGATGG R: CATTGTCCAGTAGAATTAGATTTG
VNTR-2	279	0-14	F: GATGCTTATTTCCACTGCTTGTTG R:GTTTTACCCTCTCTTTTAAGGTCAATG
VNTR-7	121	1-7	F: CTATCAGTTTCAGCTATTCCATC R: CTGGTACGAATCAAATCAAGTG
VNTR-8	121	1-7	F: GGGGAGTGGCAAAAAATAGTGTG R: CAGATCATCAACTATCAACCGCTG
VNTR-9	121	1-3	F: CTGCATCTAATAACAAGGACCCATG R: ACATTCCGATTAACGCGAAATAAG
VNTR-10	121	0-3	F: CCTACAGAAAATCCAGACGG R: TTTTTTCCATCCTCTTGAATTG

Legenda: pares de base (pb); *foward* (F); *reverse* (R) Fonte: A autora, 2017.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Invitrogen – Life Tech.) a 2% para os loci VNTR-1, VNTR-7, VNTR-8, VNTR-9 e VNTR-10 e a 1% para VNTR-2, em tampão TBE 0,5X, durante 1 h a 100V. Os géis foram corados, descorados e fotografados como descrito anteriormente no item 2.1.4.

A interpretação dos resultados foi visual e a determinação do tamanho dos produtos de amplificação foi baseada na comparação com padrões de pares de base (*100 pb* e *250 bp DNA Ladder*, Invitrogen – Life Tech.). Os dados obtidos foram comparados com tabelas específicas disponibilizadas no endereço http://www.umcutrecht.nl, possibilitando a determinação do número de repetições em cada lócus. O conjunto dos números de repetições determina o tipo MLVA (MT) correspondente.

2.1.8 Investigação Estrutural e Molecular de Tn1546

2.1.8.1 Determinação do Desenho Estrutural de *Tn1546* através de Metodologia de PCR por Sobreposição

Oligonucleotídeos iniciadores específicos para os genes e segmentos intergênicos foram utilizados para a amplificação das regiões polimórficas de Tn1546 através da metodologia de PCR por sobreposição (*overlapping PCR*).

A mistura da reação foi composta de: $0,3\mu$ M do oligonucleotídeo iniciador, 0,25mM de cada dNTP (Invitrogen – Life Tech.), 2,5mM de MgCl₂, 2,5U de *HotStarTaq*DNA polimerase e de 1X do tampão aditivo *Q-Solution*1X (QIAGEN, Hilden, Alemanha). Volumes de 3μ L dos produtos de amplificação de Tn*1546* por PCR longo foram adicionados à mistura de reação. As sequências dos oligonucleotídoes iniciadores utilizados e posição de anelamento estão apresentados no Quadro 3. A Figura 1 é representativa de Tn*1546* indicando as regiões de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados exemplicando, portanto, a estratégia de amplificação utilizada e respectivos segmentos esperados.

As etapas de ciclagem foram: 94°C por 10 min; 35 ciclos de 94°C por 1 min, 51°C por 1 min e 72°C por 1 min; e extensão final 72°C por 15 min. Para visualização dos produtos amplificados, realizou-se uma corrida eletroforética de 2 h a 100 V em gel de agarose a 0,9%

em tampão TBE 0,5X acompanhada de um padrão de pares de base de 250 pb *Ladder* (Invitrogen – Life Tech.). Os géis foram corados, descorados, visualizados e em seguida fotografados, como descrito no item 2.1.4.

Quadro 3 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR por sobreposição (*overlapping PCR*) para a caracterização de polimorfismos em Tn1546

Denominação ²	Sequência de nucleotídeos (5' – 3')	Posição (pb ³)	Referência	
IR_L/IR_R (P1)	GGAAAATGCGGATTTACAACGCTAAG	10839-10814	Biavasco et al., 2007	
ORF1 F1 (P2)	ACGTTAAGAAAGTTTTAGTGG	72-92		
ORF1 R1 (P3)	GCCCTTTTAGGAATGG	1190-1175		
ORF1 F2 (P4)	CATACATGCGCCATTGAGATA	1085-1105	Junget al., 2006	
ORF1 R2 (P5)	GACACTGCCGGTTACACT	773-756		
ORF1 R3 (P6)	ACGCACCATACAGCATCA	324-307		
ORF1 A (P7)	AGGGCGACATATGGTGTAACA	170-190	D: / 1 2007	
ORF1 B (P8)	TGGTGGCTCCTTTTCCCAGTTC	907-928	Biavascoet al., 2007	
ORF2 F1 (P9)	CTTGCTTCCCACACCATT	2524-2541		
ORF2 R1 (P10)	GTTAGTCCATCCTCGCTTGAT	2780-2760	Junget al., 2006	
ORF2 F2 (P11)	GCCATTCTGTATTCCGCTAA	3762-3781		
vanR F1 (P12)	AGCGATAAAATACTTATTGT	3979-3998		
vanR R1 (P13)	TCGGTGGGAGTAAGGGATAA	4457-4438	Donabedianet al., 2000	
vanS F1 (P14)	TTGGTTATAAAATTGAAAAATAA	4649-4671		
vanS R1 (P15)	TTAGGACCTCCTTTTATC	5803-5786	Jung et al., 2006	
vanH F1 (P16)	ATGAATAACATCGGCATTAC	6018-6037		
vanH R1 (P17)	CTATTCATGCTCCTGTCT	6986-6968	Jung et al., 2006	
vanA F (P18)	GGGAAAACGACAATTGC	7153-7170		
vanA R (P19)	GTACAATGCGGCCGTTA	7885-7869	Jung et al., 2006	
vanX F1 (P20)	ATGGAAATAGGATTTACTTT	8016-8035	Inne et al. 2006	
vanX R1(P21)	TTATTTAACGGGGAAATC	8624-8607	Jung et al., 2006	
vanY F1 (P22)	ATGAAGAAGTTGTTTTTTTTA	9052-9072		
vanY R1 (P23)	TTACCTCCTTGAATTAGTAT	9963-9944	Jung et al., 2006	
vanZ F (P24)	TTATCTAGAGGATTGCTAGC	10148-10168	Jung et al., 2006	

Legenda: *foward* (F); *reverse* (R)

Nota: IS19, sequência de inserção comumente encontrada em Tn1546. Fonte: A autora, 2017.

Figura 1 – Esquema representativo das regiões de anelamento dos 24 oligonucleotídeos iniciadores (P) utilizados nas reações de PCR de sobreposição para a caracterização de Tn1546



Legenda: As setas largas representam os genes; IRL e IRR, regiões repetidas flanqueadoras; 10,8 kb – tamanho total do Tn*1546* protótipo. Fonte: Adaptado de López et al., 2010.

2.1.8.2 Detecção de Sequências de Inserção em vanS

A identificação de elementos de inserção foi realizada por meio de PCR convencional. O painel de oligonucleotídeos iniciadores utilizados está discriminado no Quadro 4 e foi escolhido de acordo com a frequência desses elementos em Tn*1546*, observada em estudos anteriores (BROWN et al., 2001;FOGLIA et al., 2003; FREITAS et al., 2013;GU et al., 2009; JUNG et al., 2006; KAWALEC et al., 2007; LEE et al., 2004; OSKOUI et al., 2010; PALEPOUet al., 1998; SLETVOLD et al., 2010; WILLEMS et al., 1999; WOODFORD et al., 2001; ZHU et al., 2009).

Os produtos obtidos na amplificação de *vanS*(como descrito anteriormente, no item 2.1.8.1) foram purificados inicialmente com auxílio do *Illustra GFX PCR and Gel Band Purificationkit* (GE Healthcare) e em uma segunda etapa utilizando o reagente ExoSAP-IT (Affymetrix-USB, Santa Clara, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos purificados foram utilizados como molde para as reações de PCR realizadas como já descrito no item 2.1.8.1. Os oligonucleotídeos de *vanS*(vanSF1/vanSR1, Quadro 3) também foram utilizados em conjunto com os demais iniciadores designados para detecção das sequências de inserção.

Quadro 4 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na detecção de sequências de inserção em *E. faecium* CL-6729

Denominação do oligonucleotídeo	Sequência de nucleotídeos (direção 5' – 3')	Referência	
IS19.F3	CCTCATTTCTTGGGAGTTT	Jung et al., 2006	
IS1216V F4	TGGAAGCCATTCGAGGA	Jung et al. 2006	
IS1216V R4	ATTCCACTTCTTGTCTAACCC		
IS1542 NW F1	GAATCGCTTTTACTGCTTCTC	Oskoui et al., 2010	
IS1542 NW R1	TTCTAAAGCTGCCATATTGC		

Legenda: Foward (F); Reverse (R). Fonte: A autora, 2017.

2.1.8.3 Sequenciamento de vanS

Os produtos de *vanS*purificados como descrito anteriormente (item 2.1.8.2) foram dosados, para obtenção das concentrações de DNA, com auxílio de um fluorômetro (*Qubit Fluorometer*, Invitrogen – Life Tech.), empregando-se reagentes específicos que compõem o *Quant-IT dsDNA BR Assay kit* (Invitrogen – Life Tech). Após isto, foram sequenciados pelo método de terminação com dideoxinucleotídeos (SANGER et al., 1977), utilizando os mesmos iniciadores das reações de amplificação de *vanS* (Quadro 3). Para a mistura da reação foram incluídos 2 μ L de DNA (180 ng / μ L), 5 μ L de água MiliQ, 1,5 μ L de tampão (*BigDye Terminator Sequencing Buffer*, Applied Biosystems), 0,5 μ L do reagente *BigDye* (Applied Biosystems) e 1,0 pmol / μ L do iniciador, para cada poço da microplaca de PCR (Axygen, Union City, CA, EUA). A reação foi realizada em triplicata para cada par de iniciadores e, após uma breve centrifugação, a placa foi submetida a uma reação de PCR para sequenciamento, com um ciclo inicial de 96°C por 1 min e 35 ciclos de 96°C por 15 seg, 50°C por 15 seg e 60°C por 1 min e 30 seg, em termociclador.

Os produtos foram precipitados pela adição a cada poço da microplaca de 30 μ L de etanol absoluto e 2,5 μ L de EDTA (0,125mM). Após centrifugação por 45 min a 4°C e descarte do sobrenadante, a placa foi submetida a uma centrifugação invertida até atingir 700

rpm. Finalizada esta etapa, foram adicionados 30 μ L de etanol 70% a cada um dos poços, seguido de incubação em temperatura ambientepor 15 min. Em sequência, foi realizada uma nova centrifugação invertida por 1 min a 7000rpm e a microplaca foi deixada secar naturalmente em ambiente escuro por 1 h.

Posteriormente, as sequências foram lidas com auxílio do sistema 3500 Genetic Analyzer8-CapillaryArray (Applied Biosystems), editadas com auxílio do aplicativo MEGA 6.06 (TAMURA et al., 2007) e alinhadas com sequências disponíveis no GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). As sequências utilizadas como referência foram M97297.1 (*E. faecium*, transposon Tn1546) e AF169285.1 (IS19, Enterococcus faeciuminsertion sequence IS19putative transposase gene, complete cds – 1.038 pb).

2.1.8.4Análise de Predição de Estruturas de Modelagem para a Proteína VanS

Baseado nas sequências obtidas para o gene *vanS* de CL-6729 e naquelas disponíveis no GenBank (para o transposon Tn*1546*, região referente a *vanS*), foram contruídos modelos de predição de estrutura molecular da proteína. As estruturas secundárias foram feitas usando o programa PSIPRED (BRYSON et al., 2005) e a predição de domínios transmembrana usando o aplicativo TopPred 1.10 (VON HEIJNE, 1992).

2.1.8.5 Análise por PCR em Tempo Real - qPCR da Expressão dos Determinantes de Resistência à Vancomicina vanA, vanR e vanS em Biofilmes e Células Planctônicas de *E. faecium*CL-6729

A expressão dos genes *vanA*, *vanS* e *vanR* foi investigada nas diferentes formas de crescimento, planctônico e biofilme, e na presença ou ausência de concentrações subinibitórias de vancomicina para amostra CL-6729. A amostra *E. faecalis* A256, resistente à vancomicina, foi utilizada como referência em diversas etapas dos ensaios.

2.1.8.5.1 Obtenção de Células Planctônicas e de Biofilmes para Extração de RNA Total:

- a) células planctônicas em caldo: crescimento em caldo BHI, por 24h a 36±1°C, suplementado ou não com subCIM, definida neste estudo como equivalente a 1/4 da CIM de vancomicina obtida para a amostra de referência SS-1274. A CIM para vancomicina foi determinada como já descrito no item 2.1.3;
- b) células do biofilme: biofilmes foram crescidos em placas de poliestireno com seis poços, no meio BHI suplementado ou não com subCIM de vancomicina, por 24h a 36°C ±1°C;
- c) células planctônicas oriundas de biofilme: células não aderentes (em suspensão no meio), que foramrecolhidas após o período de formação dos biofilmes cultivados na presença ou na ausência do antimicrobiano.

Após centrifugação a 3.500 x g em refrigeração (4°C/10 min) (Eppendorf 5424 R, Hamburgo, Alemanha), os sobrenadantes foram descartados e as células foram lavadas (nas mesmas condições de centrifugação) com solução salina estéril (NaCl 0,85%) e centrifugadas novamente nas mesmas condições. O sedimento foi utilizado para obtenção do RNA total. A combinação dos parâmetros avaliados resultou em 12 ensaios (três condições distintas / duas avaliações – com e sem antimicrobiano / duas amostras bacterianas) representativos das análises com a amostra CL-6729 e com controle A256.

2.1.8.5.2 Extração do RNA total

A extração do RNA total foi realizada seguindo as recomendações do $T\bar{o}TALLY$ RNA kit(Ambion, Invitrogen – Life Tech.). As células bacterianas (obtidas como descrito em 2.1.8.5.1) foram ressuspensas em 300 µL de tampão TE adicionado de 1 mg/mL de lisozima e incubadas por 5 min em temperatura ambiente.

Após lise celular, foram adicionados 300 µL de solução desnaturante (*Denaturation Solution*, Ambion, Invitrogen – Life Tech.) acrescentada do mesmo volume de uma solução contendo fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (nas proporções estabelecidas pelo kit

comercial). A suspensão foi vigorosamente homogeneizada em vortex por 15 seg e em seguida deixada em banho de gelo 5 min. Após centrifugação em refrigeração (12.000 rpm por 5 min a 4°C), a fase aquosa foi transferida para outro tubo (tipo Eppendorf), sobre a qual foram adicionados 60 μ L de acetato de sódio e 300 μ L de fenol ácido, homogeneizados em vortex por 15 seg e posteriormente incubado, mais uma vez, em banho de gelo 5 min. Foi então realizada nova centrifugação por 5 min a 12.000 rpm e a fase aquosa foi transferida novamente (para um novo tubo) e, desta vez, adicionada de 600 μ L de isopropanol. As preparações foram incubadas a -20°C por 30 min ou até a formação de um precipitado branco. Após centrifugação a 13.000 rpm por 15 min, o sobrenadante foi desprezado e adicionou-se 300 μ L de etanol 70% em temperatura ambiente.

O extrato foi centrifugado a 13.000 rpm por 10 min e o sobrenadante desprezado. O sedimentofoi deixado secar a temperatura ambiente e, em sequência ressuspenso em 25 μ L de águalivre de RNAses tratado com DNase I (*TURBO DNA-free kit*, Ambion, Applied Biosystems) para remoção de DNA contaminante e os RNAs foram quantificados com auxílio do espectrofotômetro NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA).

2.1.8.5.3 Expressão de vanA, vanS e vanR

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 0,1 µg de RNA,utilizando-se o *ImProm-II Reverse Transcription System* (Promega Co., Madison, WI, EUA). Os transcritos foram analisados por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), utilizando-se *SYBR Green PCR Master Mix* (Invitrogen – Life Tech.), o equipamento*ABI7500 Sequence Detection System* (Applied Biosystems) e o respectivo software específico (7500 software v.2.0.1) para mensurar o C_T (*cycle threshold*).Para padronização das condições da reação e avaliação dos resultados, foi determinada uma curva padrão para cada gene, usando diluições seriadas de DNA genômico e de RNA total das amostras avaliadas. Os níveis de RNA mensageiro para os genes alvo foram comparativamente investigados ($\Delta\Delta$ CT – método onde é possível se comparar os valores de C_t obtidos) e normalizados para os níveis de 16S rRNA. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para detecção dos genes estão listadas na Quadro 5.

Quadro 5 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para detecção da expressão dos genes vanA, vanS, vanR e rrs

Gene	Iniciadores /Sequência (direção 5' - 3')	Tamanho do Produto (em pb)	Referência
vanA	QVanA – F: GAATGGGAAAACGACAATTGCT QVanA – R: TTGCCATGCAAAGCTGAAAA	111	Choi et al., 2011
vanS	VanS – F: CCGCTGCATACAGTGAGGAT VanS – R: CCGTATCGGAAGAACGAGCA	165	Neste estudo
vanR	VanR – F: GGCACAAGCGGCCTTACTAT VanR – R: TAACTCCAGTGGGCGAAAGG	156	Choi et al., 2011
rrs (16S rRNA)	Qrrs – F: GCTTTCGGGTGTCGCTGAT Qrrs – R: TCACCCTCTCAGGTCGGCTAT	79	Neste estudo

Legenda: F, *foward* (F); *reverse* (R); pares de bases (pb). Fonte: A autora, 2017.

2.2 Aspectos Relacionados à Virulência de *E. faecium*: Principais Determinantes Genéticos e Formação de Biofilmes

2.2.1 Caracterização do Genótipo de Virulência

A presença de cinco genes relacionados à expressão de fatores de virulência de *Enterococcus* foi investigada, a saber: *asa1*, que codifica para a expressão da substância de agregação; *cylA*, da citolisina; *esp*, da proteína de superfície de enterococos; *hyl*, da hialuronidase; e *gelE*, da gelatinase.

O DNA molde foi obtido conforme descrito no item 2.1.4 e o protocolo para reação de amplificação seguiu as recomendações de Vankerckhoven e colaboradores (2004). A mistura de reação constou de 0,8 μ M de cada oligonucleotídeo iniciador (Quadro 6), 0,2 mM de cada dNTP, 2,5U de *Platinum* Taq polimerase, 3 mM de MgCl₂ e 5 μ L da suspensão do DNA molde, para um volume final de 50 μ L. As condições da PCR foram as seguintes: 1 ciclo de 94°C por 5 min, 30 ciclos de 94°C por 1 min, para desnaturação do DNA, 56°C por 1 min, para anelamento dos iniciadores, 72°C por 1 min para extensão das novas fitas de DNA, e 1 ciclo de extensão final a 72°C por 10 min, em termociclador. A detecção dos produtos de

amplificação foi feita por eletroforese em gel de agarose a 1,2% em tampão TBE 0,5X. Após a corrida eletroforética, por 1 h a 100V, o gel foi corado, visualizado e fotografado como descrito anteriormente no item 2.1.4. As amostras de referência *E. faecalis* OG1xpAM714 (*cylA*⁺, *esp*⁺), *E. faecalis* OG1RF (*gelE*⁺), *E. faecalis* UERJ101 (*asa*⁺, *esp*⁺) e CL 8020 (*hyl*⁺) foram utilizadas como controles dos testes.

Quadro 6 – Sequências¹ dos oligonucleotídeos iniciadores e tamanhos dos produtos obtidos nas reações de PCR multiplex para caracterização de fatores de virulência em *Enterococcus*.

Gene / produto	Oligonucleotídeo / sequência (direção 5' – 3')	Tamanho do amplicon	Referência
asa1/ substância de	ASA 11: GCACGCTATTACGAACTATGA	275	Vankerckhoven et al.,
agregação	ASA 12: TAAGAAAGAACATCACCACGA	375	2004
<i>cylA</i> / citolisina	CYT I: ACTCGGGGGATTGATAGGC	200	Vankerckhoven et al.,
	CYT IIb: GCTGCTAAAGCTGCGCTT	000	2004
esp/ proteína de superfície	ESP 14F: AGATTTCATCTTTGATTCTTGG	510	Vankerckhoven et al.,
de enterococos	ESP 12R: AATTGATTCTTTAGCATCTGG	510	2004
hyl /hialuronidase	HYL n1: ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG	276	Vankerckhoven et al.,
	HYL n2: GACTGACGTCCAAGTTTCCAA	270	2004
<i>gelE</i> / gelatinase	GEL F: ACCCCGTATCATTGGTTT	405	Comes et al. 2008
	GEL R: ACGCATTGCTTTTCCATC	403	Gomes et al., 2008

Legenda: F, *foward* (F); *reverse* (R); pares de bases (pb). Fonte: A autora, 2017.

2.2.2 Curva de Formação de Biofilme

Foi realizada uma análise quantitativa da biomassa aderida ao substrato em diferentes períodos de incubação para construção de uma curva de formação dos biofilmes produzidos pelas amostras bacterianas em estudo.

A metodologia utilizada para a formação e quantificação dos biofilmes de *Enterococcus* foi baseada na descrita por Tendolkar et al. (2004), com algumas modificações. A partir de suspensões bacterianasem caldo BHI, com turvação equivalente à escala 0,5 de McFarland, foram distribuídos 200 μ L por poço de placas de microtitulação de poliestireno (Corning Inc.), de fundo chato e com 96 poços. Cada amostra bacteriana avaliada foi distribuída em uma fileira vertical, correspondendo a oito réplicas. As placas foram incubadas a 36°C±1°C por tempos de 2, 4, 6, 8, 18, 24, 26, 48, 72 e 74 horas. Para estes quatro últimos tempos de formação dos biofilmes, o meio de cultura foi trocado a cada período de 24h.

Imediatamente após cada tempo de formação determinado, o sobrenadante contendo as células planctônicas foi removido e os poços lavados uma vez por adição de 200 μ L de solução salina estéril.Para quantificação, os biofilmes foram fixados durante 15 min pela adição, a cada um dos poços, de volumes de 100 μ L de metanol 99% (Vetec Química Nova Ltd., Rio de Janeiro, Brasil). Após este período, o metanol foi retirado e a microplaca foi deixada em temperatura ambiente para secagem. Em seguida, uma solução aquosa de cristal violeta a 0,2% (Merck & Co. Incorporated, NJ, EUA) foi adicionada em todos os poços e, após 15 min em temperatura ambiente, o excesso do corante foi removido por lavagem em água corrente e as microplacas foram deixadas por mais 30 min, em temperatura ambiente, para secagem. O corante impregnado no biofilme, relativo à quantidade de massa aderida, foi solubilizado por adição de 150 μ L de uma solução aquosa de ácido acético a 15% (Quimibrás Indústria Química S.A., Rio de Janeiro, RJ).

A quantificação foi realizada pela determinação da absorvância, mensurada a λ =570 nm, em um leitor de microplacas (*Microplate Reader Model 550*, Bio-Rad Labs.). Como critério de análise, os resultados foram equivalentes à média das leituras de seis para cada oito réplicas por amostra, não sendo utilizados no cálculo o maior e o menor valor de densidade ótica (DO_{570nm}). Os valores médios obtidos foram utilizados para a construção de uma curva de formação. Os ensaios foram realizados em duplicata em oito réplicas de cada.

2.2.3 <u>Avaliação da Arquitetura do Biofilme por Microscopia Confocal de Varredura a Laser</u> (CLSM, *confocal laser scanning microscopy*)

Para as avaliações por microscopia confocal, os biofilmes foram formados a partir de 1 mL das suspensões celulares com turvação equivalente a escala 0,5 McFarland, em meio BHI, que foram incubadas em sistemas comerciais que constam de câmaras próprias confeccionadas sobre de lâminas de vidro para microscopia (*Chamber slide with cover glass*, NalgeNunc International, NY, EUA) por 24h e por 72h a 36±1°C. Após o período de incubação, o meio de cultura foi retirado e os biofilmes foram lavados com 1 mL de tampão fosfato-salina (PBS, 0,1M fosfato de sódio monobásico; 0,1M fosfato de sódio dibásico; pH 7,0), para retirada das células em suspensão (não aderidas ao biofilme).

Posteriormente, foi adicionada, a cada uma das câmaras, uma solução de fluorocromos contendo 1 mL de *SYPRO Ruby Protein* e 0,167 µM de *SYTO9* (ambos obtidos Molecular

Probes – Life Tech., Eugen, OR), para coloração das regiões ricas em proteínas e em DNA, respectivamente. A metodologia utilizada seguiu as recomendações de Frank & Patel (2007). Após incubação por 30 min, no escuro e em temperatura ambiente, as preparações foram visualizadas em um microscópio modelo TCS-SP5 (Leica Microsystems Inc., Bannockburn, IL, EUA) pertencente a Unidade de Microscopia Confocal, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro – ICB/UFRJ.

Para as análises ao microscópio, as condições utilizadas para os fluorocromos utilizados foram as seguintes: *SYPRO Ruby Protein*, excitação a λ =476 nm e emissão monitorada a λ = 610-670 nm; *SYTO9*, excitação a λ =488 e emissão a λ =525 nm. As preparações foram visualizadas em objetiva de 63 X,*step size* de 3 µM e as imagens foram adquiridas de três campos escolhidos de forma aleatória.

As imagens foram analisadas com auxílio do aplicativo ImageJ 1.45 (NIH, *National Institutes of Health*, Bethesda, Maryland, USA) e do aplicativo Leica LAS AF versão 2.2.0 build 4758 (Leica Microsyst. Inc.).

2.2.4 Interação de Macrófagos com Células Planctônicas eBiofilmes das Amostras de *E.* faecium

Para determinar os efeitos de biofilmes e de células planctônicas sobre macrófagos da linhagem J.774 foram realizados ensaios de interação em diferentes tempos de incubação e avaliadas a resposta através da dosagem do nitrito e da produção de citocinas (INF- γ ; TNF- α ; IL-6 e IL-10).

2.2.4.1 Obtenção dos Macrófagos

Macrófagos da linhagem J.774 estavam mantidos em nitrogênio líquido (-196°C) na Coleção de Cultura da Disciplina de Microbiologia e Imunologiae foram gentilmente cedidos pelo Prof. João Ramos da Costa Andrade do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, da Faculdade de Ciências Médicas, UERJ.

A partir do estoque, os macrófagos foram processados em 5 mL deDulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) suplementado com 5% de glutamina e 10% de soro fetal bovino (SFB) distribuídos em frascos T-25 (Sigma - Aldrich Co.), até a obtenção de uma camada confluente de células. Após confluência acima de 95%, o tapete decélulas foi lavado duas vezes por adição de PBS aquecido a 37°C (5 mL por vez)eadicionado de EDTA 0,02M refrigerado a 4°C. Em seguida os macrófagos foram recuperados por raspagem (Cell Scraper, TPP Techno Plastic Products AG, Suíça) e ressuspensos em DMEM. Paraa avaliação da viabilidade celular e contagem, foi utilizado o ensaio de exclusão do azul de tripan, para isso foi preparada uma solução contendo 75 µL de PBS 1X adicionados de 1 µL da suspensão celular e 24 µL da solução de Azul de tripan 0,1% (v/v). Posteriormente, 10 µL da solução resultante foram adicionados à câmara de Neubauer para contagem. Essemétodo permite detectar células inviáveis, cuja membrana, por apresentar danos, permite aincorporação do corante e coram-se em azul; enquanto que as células viáveis, porapresentarem membrana íntegra, bloqueiam a passagem do corante, ficando transparente. Suspensões de macrófagos em meio DMEM ajustadas para 5 x 10^5 células/mL, foram distribuídas em placas de cultura de células com 12 poços (1 mL / poço).

2.2.4.2 Obtenção de Células Planctônicas

As amostras bacterianas foram cultivadas em meio BHI, durante 24 h a 36°C±1°C. Após o período de incubação, os tubos correspondentes ao crescimento planctônico em BHI foram centrifugados por 10 mim a 14.000 x g, o sedimento foi lavado uma vez por adição de 1 mL de PBS e em seguida as células bacterianas foram ressuspensas em meio DMEM.

2.2.4.3 Obtenção dos Biofilmes

Para formação dos biofilmes, volumes de 3 mL de suspensões bacterianas confeccionadas em meio BHI e apresentando turbidez equivalente à escala 0,5 de McFarland foram distribuídos em placas de poliestireno, de fundo chato com 12 poços. Após incubação

por 24h a 36°C±1°C, os biofilmes aderidos ao fundo dos poços das placas foram lavados uma vez com PBS e ressuspensos em DMEM para os ensaios de interação com macrófagos J.774.

2.2.4.4 Padronização do número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL)

A contagem de células planctônicas foi obtida a partir de um cultivo em 3 mL de BHI. Após 24h de incubação a $36^{\circ}C\pm1^{\circ}C$, foram realizadas diluições seriadas de cada amostra em salina fisiológica estéril até 10^{-6} . A seguir, $10 \ \mu$ L de cada diluição foram semeadas em meio BHI ágar e incubados por 24h a $36^{\circ}C\pm1^{\circ}C$. Após o período de incubação, as colônias foram contadas e o valor das unidades formadoras de colônia por mililitro calculado. As placas utilizadas para contagem foram as que apresentaram entre 30 e 300 colônias.

Biofilmes foram formados a partir de suspensões bacterianas em caldo BHI, com turvação equivalente à escala 0,5 de McFarland, foram distribuídos 3 mL por poço de placas de microtitulação de poliestireno (Corning Inc.), de fundo chato e com 12 poços (TPP *Techno Plastic Products*, Trasadingen, Suíça). Após 24h de incubação a $36^{\circ}C\pm1^{\circ}C$, biofilmes foram lavados uma vez com 500 µL de salina fisiológica estéril (NaCl 0,85%). Biofilmes foram retirados por raspagem e ressuspensos em 1 mL de solução salina estéril. A solução de biofilme foi adicionada a 9 mL de salina estéril e sonicado em banho (Bransonic Ultrasonic Cleaner 2210R-MT) por 5 min a 40 Hz. Em seguida foram realizadas diluições seriadas em solução salina estéril até 10^{-6} . Em seguida, $10 \ \mu$ L de cada diluição foram semeadas em meio BHI ágar e incubados por 24h a $36^{\circ}C\pm1^{\circ}C$. Após o período seguiu-se como descrito anteriormente para as células planctônicas.

2.2.4.5 Ensaios de Interação com Macrófagos J.774

Volumes de 25 μ L das suspensões bacterianas padronizadas, a uma taxa de multiplicidade de infecção de 10:1 (bactéria/macrófago), foram distribuídas em poços distintos para os ensaios de interação das amostras de *E. faecium* CL-6729 e SS-1274 com macrófagos.

Os ensaios bactérias planctônicas ou biofilmes *versus* macrófagos foram incubados a $36^{\circ}C\pm1^{\circ}C$, em atmosfera enriquecida com 5% de CO₂, por períodos de 30 min, 2 h e 24 h. Após cada período de incubação, os sobrenadantes foram coletados, filtrados com poro 0,22 µm (Kasvi; Curitiba, Brasil) e estocados a -20°C ou imediatamente avaliados, quanto aos parâmetros especificados a seguir.

2.2.4.5.1 Dosagem de Óxido Nítrico

A concentração de óxido nítrico nos sobrenadantesprovenientes dos ensaios de interação foi determinada pelo empregoda metodologia do reativo de Griess (DING et al., 1988). Alíquotas de 50 µL, coletadas após cada um dos períodos de interação com macrófagos (30 min, 2 h e 24 h), foram adicionadas à igual volume do reativo de Griess, constituído de 1:1 da solução A (1% (p/v) de sulfanilamida em 5% de ácido ortofosfórico) e da solução B(0,1% (p/v) de naftiletileno diamina dihidroclorido). Após incubação por 10 min em temperatura ambiente, foi realizada a leitura da absorvância, em leitor de microplaca (*Microplate Reader Model 550*, Bio-Rad Labs.) a $\lambda = 540$ nm. A concentração de nitrito (NO₂⁻) nos ensaios foi determinada utilizando uma curva padrão confeccionada para uma faixa de concentração de 1 µM – 100 µM de nitrito de sódio (NaNO₂).

2.2.4.5.2 Avaliação da Resposta de Macrófagos J.774 Após Interação com Células Planctônicas e Biofilmes de *E. faecium*

Os níveis das citocinasTNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-10 foram quantificados nos sobrenadantes após interação de *E. faecium* com macrófagos J.774 por ensaio imunoenzimático de captura – ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), utilizando-se o *OptiEIA ELISA kit* (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) e de acordo com as recomendações do fabricante, com algumas modificações. Para tal, placas de poliestireno contendo 96 poços de fundo chato e apropriadas para ELISA (Maxsorp, Thermo Fisher) foram sensibilizadas com 50 µL, em cada poço, de anticorpo de captura (1:250 em tampão carbonato de sódio 0,1M, pH 9.5) e incubadas *overnight* a 4°C. Após incubação, os poços foram lavados três

vezes com 200µL / poço de solução de lavagem (PBS; 0,05% Tween-20) e bloqueadas com 200 µL / poço de solução de PBS acrescido de SFB a 10%, durante 1h em temperatura ambiente. Posteriormente, os poços foram lavados por três vezes com 200 µL de solução de lavagem por poço e adicionados de 50 µL dos sobrenadantes coletados após os ensaios de interação. Após incubação por uma noite a 4°C, os poços foram lavados por cinco vezes e adicionados de uma solução (*working detector*) contendo o anticorpo de detecção biotinilado (IFN- γ , IL-6 ou IL-10) e o complexo streptavidina conjugada àenzima peroxidase (SAv – HRP). A solução foi preparada por adição do anticorpo de detecção na proporção 1:250 (para IL-6 faz-se 1:500) em PBS (acrescido de 10% de SFB) e adicionada do complexo enzimático de forma a também obter uma proporção de 1:250. Foram distribuídos 50 µL / poço da solução de *working detector* e incubados por 1h em temperatura ambiente.

Para detecção de TNF- α , o anticorpo foi diluído 1:250 em solução de PBS (contendo 10% de SFB), adicionados 50 µL aos poços e a placa incubada por 1h em temperatura ambiente. Após incubação, os poços foram lavados 5x como descrito anteriormente e adicionados de 50 µL do complexo enzimático diluído 1:250 em solução de PBS acrescido de SFB a 10%. A placa para detecção de TNF- α foi incubada por 30 min em temperatura ambiente.

Após o tempo de incubação determinado, os poços foram lavados por sete vezes pela adição de 200 µL de solução de lavagem e adicionados de tetrametilbenzidina (TMB, ThermoFisher) em tampão citrato-fosfato (0,1 M ácido cítrico; 0,1 M Na₂HPO₄, pH 5,0), por 30 min em temperatura ambiente e protegido da luz. Em seguida, a reação foi parada com 25 µL da solução H₂SO₄ 2N e medida em espectrofotometria a uma absorbância de a λ = 450 nm e λ = 570 nm dentro de até 30 min após adição da solução de parada.

Uma curva padrão foi realizada por diluição seriada dos anticorpos recombinantes na razão $\frac{1}{2}$ em PBS, acrescido de 10% de SFB, a fim de obter uma escala na concentração dos anticorpos com concentração final de 2000 pg (para IFN- γ e IL-10) e 1000 pg (para TNF- α e IL-6). Foram confeccionados duplicatas para cada concentração desejada na curva padrão. Como controle negativo foram mantidos três poços contendo somente DMEM em todos os testes.

Os valores médios obtidos na curva para cada concentração foram utilizados para construção de uma curva padrão onde os valores médios obtidos para as amostras foram inseridos na equação da reta, obtendo-se a concentração de cada citocina presente nos sobrenadantes após os ensaios de interação.

Os valores obtidos nas dosagens das concentrações de NO_2^- e das citocinas foram avaliados através de análise da variância monocaudal (*One-way* ANOVA) com posteriores comparações pelo teste de Tukey. As análises foram realizadas com o aplicativo *GraphPad Prism v 5.0* (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). Foram considerados significativos valores de p<0,05.

2.2.4.5.4 Avaliação por CLSM da Interação entre Biofilmes e Células Planctônicas de *E. faecium* CL-6729com Macrófagos J.774

Os biofilmes foram formados em câmaras específicas como já descrito no item 2.2.3, por 24 h a $36^{\circ}C\pm1^{\circ}C$. Posteriormente, foram corados pela adição de um volume de 200 µL do fluorocromo *SYPRO Ruby Protein*(MolecularProbes – Life Technologies, Eugen, OR), a cada uma das câmaras. Após incubação por 30 min protegidos da luz, os biofilmes foram lavados uma vez por adição de 500 µL de PBS para retirada do excesso do corante.

Para os ensaios com células planctônicas, 500 μ L de uma cultura recente em meio BHI (obtida após incubação por 24 h a 36°C±1°C) foram transferidos para tubos tipo Eppendorf e centrifugados por 10 min a 14.000 x g. O sedimento foi lavado por centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente com 500 μ L de PBS, o sobrenadante descartado e as células bacterianas foram coradas com 200 μ L do fluorocromo *SYPRO Ruby Protein* (MolecularProbes – Life Technologies, Eugen, OR), durante 30 min e protegidas da luz. Após coloração, os tubos foram centrifugados (10 min a 14.000 x g), o sedimento foi lavado uma vez com 500 μ L de PBS (para retirada do excesso do corante), o sobrenadante descartado e as células bacterianas coradas foram ressuspensas em 100 μ L de PBS.

Os macrófagos J.774 foram obtidos, processados para atingir confluência e, em seguida, os tapetes celulares foram destacados das garrafas de culturas de células como descrito no item 2.2.4.1. Posteriormente, volumes de 1 mL da suspensão de macrófagos foram transferidos para tubos tipo Eppendorf, centrifugados (por 10 min a 2.500 rpm, em refrigeração 4°C), o sobrenadante descartado e o sedimento foi lavado uma vez por adição de 1 mL de PBS. Após descarte do sobrenadante, os macrófagos foram corados pela adição de

 $0,167 \mu M$ do fluorocromo *SYTO9* e incubados por 1 h protegidos da luz. Os tubos foram centrifugados por 10 min a 2.500 rpm, o sedimento lavado uma vez por adição de 1mL de PBS (para a retirada do excesso de corante) e, em sequência, ressuspenso em 100 μ L de PBS.

Para os ensaios de interação, 50 μ L da suspensão de macrófagos corados com *SYTO9* foram adicionados às câmaras contendo os biofilmes aderidos e corados com *SYPRO Ruby Protein*. Da mesma forma, 50 μ L da suspensão de macrófagos corados e igual volume da suspensão de células bacterianas planctônicas coradas com *SYPRO Ruby Protein* foram depositados nas câmaras de vidro específicas para CLSM. Após períodos de 30 min e de 1 h de contato bactérias / macrófagos, 50 μ L do óleo *antifade (Prolong Gold Antifade Mountant*, Molecular Probes) foi acrescentada às preparações, que foram visualizadas e as imagens analisadas como já descrito no item 2.2.3.

2.3 Panoramas Proteico e Genômico de E. faecium

2.3.1 Análise dos Perfis Protéicos de Biofilmes e Células Planctônicas de E. faecium

2.3.1.1 Extração das Proteínas Totais

As células planctônicas foram obtidas a partir de cultivos em meio BHI por 24 h a $36^{\circ}C\pm1^{\circ}C$. As culturas foram centrifugadas por 20 min a 1.300 x g, o sobrenadante descartado e as células bacterianas lavadas em 3,0 mL de solução salina estéril (nas mesmas condições de centrifugação) e, posteriormente, foram utilizadas nos processos de obtenção de proteínas totais.

Os biofilmes foram formados a partir do inóculo de 3mLde uma suspensão bacteriana confeccionada em meio BHI, apresentando turbidez equivalente à escala 0,5 de McFarlandem placas de poliestireno, de fundo chato com 12 poços. Após o período de incubaçãode 24 h a 36°C±1°C, o meio de cultura foi cuidadosamente aspirado e os biofilmes lavados com solução salina estéril (para retirada das bactérias não aderentes). Os biofilmes foram retirados com raspador de células (*cell scraper*) e ressuspensos em solução salina estéril. As suspensões

foram centrifugadas 1.300 x g por 20 min e em refrigeração (a 4° C), e os sedimentos contendo os biofilmes foram utilizados para obtenção de extratos de proteínas totais.

O protocolo de extração das proteínas totais seguiu as recomendações de Merquior et al. (1994). As células planctônicas e os biofilmes foram ressuspensos em 0,25 mL de solução aquosa contendo 10mg/mL de lisozima e 40U de mutanolisina(ambas enzimas obtidas da Sigma – Aldrich Co.), que foram incubadas em banho térmico a $36^{\circ}C\pm1^{\circ}C$ por 2h. Após esta etapa, foi adicionado igual volume de tampão de tratamento da amostra (*Laemmli Sample Buffer*, Bio-Rad Labs.) adicionado de 5% de 2-mercaptoetanol (v/v) e, em seguida, cada preparação foi aquecida a 100°C por 5 min. Após este período, as preparações foram centrifugadas a 1.000 x g por 5 min e os sobrenadantes (extratos de proteínas totais) foram utilizados para as análises eletroforéticas.

2.3.1.2 SDS-PAGE

O procedimento de SDS-PAGE descontínuo foi realizado através de uma modificação do protocolo descrito por Laemmli (1970). Preparações solúveis foram aplicadas em reservatórios do gel de empilhamento, contendo acrilamida na concentração final de 4% (p/v) em tampão Tris-HCl 0,5M (pH 6,8). O gel de separação foi constituído de acrilamida a 10% (p/v) em Tris-HCl 1,5M (pH 8,8). O tampão de corrida foi composto de Tris-HCl 0,025M e glicina 0,192M (pH 8,3). A concentração final de SDS tanto nos géis como no tampão utilizado na cuba foi de 0,1% p/v (todos os reagentes obtidos da Bio-Rad Labs.). A eletroforese foi realizada em um sistema Mini-Protean II (Bio-Rad Labs.), sob corrente constante de 30 mA. Padrões de pesos moleculares (*Precision Plus Protein Dual Color Standards*, Bio-Rad Labs.) foram incluídos em cada corrida eletroforética.

O final da corrida foi evidenciado pela chegada do corante indicador, constituinte do tampão de tratamento da amostra, *Laemmli Sample Buffer* (*Laemmli Sample Buffer*, Bio-Rad Labs) à base inferior do gel. Os géis foram corados com uma solução contendo 0,125% (p/v) de *Coomassie Blue R-250* (Sigma – Aldrich Co.) em metanol:ácido acético:água na proporção 5:1:4, e descorados com a mesma solução solvente. As imagens dos géis foram adquiridas sob luz branca, pelo sistema MiniBis Pro. As bandas de interesse foram excisadas dos géis para serem avaliadas por espectrometria de massa. Foram consideradas bandas de interesse aquelas

que mostraram diferenças qualitativas e quantitativas entre os perfis proteicos obtidos de células planctônicas e de biofilmes.

2.3.1.3 Análise das Proteínas por Espectrometria de Massas - ESI-Q-TOFMS(*electrospray ionisation time-of-flight mass spectrometry*)

As bandas excisadas em tiras de géis de SDS-PAGE foram tratadas com 100 μ L de solução de 50% (v/v) de acetonitrila(Sigma-Aldrich,EUA)em 25 mM de bicarbonato de amônio, pH 8,0(Sigma-Aldrich,EUA), até serem totalmente descoradas. Em sequência, foram desidratadas com 200 μ L de acetonitrila (100%)por 5 min, secas a vácuo (*Eppendorf Vacufuge Concentrator*, Fisher Scientific, EUA) por 15 min e reduzidas com100 μ L de uma solução de 1,5 mg/mL de dithiothreitol (DTT, Sigma-Aldrich,EUA) em bicarbonato de amônio 100 mM (pH 8,0). Posteriormente, foram então alquiladas com 100 μ L de uma solução de 50 mM de iodoacetamida (Sigma-Aldrich,EUA), durante 30 min, em temperatura ambiente, lavadas em 200 μ L de bicarbonato de amônio a 100 mM (pH 8,0) por 10 min e mais uma vezdesidratados em solução de acetonitrila (100%). Após nova etapa de secagem a vácuo, as preparações foram reidratadas e as proteínas digeridas *in gel* com uma solução contendo 20 ng/mL de tripsina (Promega Co.)confeccionada em 50 mM de bicarbonato de amônio (pH 8,0), por um período de 24 h a 36°C±1°C.

Os peptídeos foram extraídos com uma solução5% (v/v)de ácido fórmico e 50% (v/v) de acetonitrila, por 30 min, secos por 1 h a vácuo e, em seguida, ressuspensos em solução de ácido fórmico a 0,1% e acetonitrila a 3% (v/v). Após agitação em vortex por 10 seg, as preparações foram centrifugadas a 14.000 rpm,durante 5 min. Os sobrenadantes foram coletados para análise através de ionização por *electrospray* em analisador quadruplo do tempo de voo (ESI-Q-TOF MS)em um instrumento do tipo Q-Tof Micro (Waters Corporation, Milford, MA, EUA) acoplado a um NanoUPLC (Nanoaquicty, Waters Co.), pertencentes a Unidade de Espectrometria de Massas e Proteômica, do Centro de Ciências de Saúde, da Universidade Federal do Rio de Janeiro(UEMP/CCS/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ).

Os dados brutos das sequências peptídicas foram processados com auxílio do aplicativo Data Explorer 4.2 (Applied Biosystems), para serem identificados utilizando o banco de dados do NCBInr, através do MASCOT (Matrix Science Ltd., disponível em http://www.matrixscience.com), na base Bacteria (Eubacteria).

O valor de p < 0,01 foi inferido como parâmetro limiar (*treshold*) na caracterização dos peptídeos, que foram analisados em ESI-Q-TOF, para identificação em MS/MS Ion. Todos os resultados (*matches*) foram conferidos visualmente em relação aos espectros originais obtidos, considerando identificações válidas somente aquelas, cujas proteínas apresentavam três ou mais peptídeos diferentes, desde que pelo menos um apresentasse cinco resíduos sequenciados consecutivamente na série Y, B ou ainda de forma complementar. Em caso de um número inferior a três peptídeos, foi confirmada como identificação válida, a presença de pelo menos um peptídeo com no mínimo sete resíduos de ácidos aminados sequenciados consecutivamente na série Y e/ou B ou complementar. Também foi aceito como identificação válida da proteína com menos de três peptídeos, desde que um dos peptídeos apresentasse 100% de identidade exclusiva para a proteína identificada. A análise funcional das proteínas foi realizada através do bando de dados Uniprot acoplado ao EMBL-Bank (http://www.ebi.ac.uk/embl). As análises foram feitas em triplicata técnica.

Os dados obtidos que também fizeram parte de trabalhos anteriores do grupo (MONTEIRO DA SILVA, 2012) foram utilizados para uma avaliação conjunta do perfil proteômico com o genômico determinado por sequenciamento do genoma completo da amostra CL-6729 e conforme especificado abaixo.

2.3.2 <u>Sequenciamento do Genoma Completo (WGS – whole genome sequencing) da Amostra</u> <u>E. faecium CL-6729</u>

O sequenciamento do genoma completo foi realizado conforme a instruções descritas por Tran et al. (2013); Been et al. (2015) e Pinholt et al. (2015). O DNA genômico foi obtido utilizando o *Wizard Genomic DNA Purification kit* (Promega, Madison, WI, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Para isso, o DNA da amostra CL-6729 foi obtido a partir de um crescimento recente (18h-24h 36°C \pm 1°C) em meio TSB. Após isto, 1 mL da cultura foi transferido para um tubo eppendorf e centrifugado a 14.000 x g por 2 min. O sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em 480 µL de EDTA 50 mM. Foram adicionados 120 µL de lisozima (10 mg/mL) e incubados por 1h a 36°C \pm 1°C. Após o período de incubação, as células foram centrifugadas (14.000 x g/ 10 min) e o sobrenadante removido. As células foram ressuspensas em 600 µL de solução de lise e incubadas a 80°C por 5 min. Posteriormente, 3 µL de solução de RNAse foram adicionados às células lisadas e

homogeneizadas por inversão do tubo. A seguir, foram adicionados 200 μ L de solução de precipitação de proteína e o pellet vortexado por 20 min. Após incubação por 5 min no gelo, o lisado celular foi centrifugado a 14.000 x g por 3 min. O sobrenadante foi transferido para um novo eppendorf de 1,5 mL adicionado de 600 μ L de isopropanol e homogeneizado por inversão. O DNA foi centrifugado a 14.000 x g por 2 min, o sobrenadante aspirado e adicionados 600 μ L de etanol 70%. Após homogeneização por inversão o pellet foi centrifugado como anteriormente e o etanol aspirado. Por fim o DNA foi reidratação, incubação por 1h a 65°C e estoque a 4°C.

As amostras foram sequenciadas na plataforma Illumina Hiseq (Ilumina, EUA). Uma bibilioteca *paired-end*foi construída utilizando a plataforma Nextera XT DNA (Illumina). As bibliotecas geradas foram concatenadas e anotadas utilizando a plataforma PATRIC 3.2.75 (*University of Chicago*, Chicago, IL). A anotação de genes associados à virulência, ao metabolismo celular e à resistência aos antimicrobianos também foi realizada utilizando a plataforma CGE (*Center for Genomic Epidemiology*, Dinamarca). Para obtenção de um mapa circular do genoma, foi utilizado o aplicativo CGView (STOTHARD et al., 2005).

Também foi avaliada a presença de elementos móveis como sequências de inserção e de fagos, através do emprego das ferramentas *ISFinder* (http://www-is.biotoul.fr) e PHAST(*Phage Search Tool* – http://phast.wishartlab.com), respectivamente. A tipagem por MLST foi também realizada *in silico* através da plataforma PATRIC 3.2.75.

3 RESULTADOS

3.1 Determinação de Aspectos Fenotípicos e Genotípicos de *E. faecium*: Características Gerais, Susceptibilidade aos Antimicrobianos e Tipagem Molecular

A caracterização fisiológica pelo emprego de uma bateria de testes fisiológicos específicos confirmou a identificação de *E. faecium* para ambas amostras bacterianas incluídas neste estudo. Entretanto, os resultados foram discordantes em dois dos testes empregados: utilização de sorbitol e de rafinose. Nestes testes a amostra CL-6729 apresentou resultado positivo em ambos; enquanto que, SS-1274 foi negativa. Cabe ressaltar que os resultados para estes testes podem ser variáveis na caracterização desta espécie, de acordo com Teixeira et al. (2015). Assim pode-se considerar que as amostras estudadas pertencem a biótipos distintos.

Os testes de susceptibilidade por disco-difusão revelaram que a amostra SS-1274, conforme esperado,foi sensível para a maioria dos antimicrobianos testados. Em contrapartida, a amostra clínica CL-6729 foi resistente a 11 dos 19 antimicrobianos testados, reunindo seis classes diferentes, exibindo um perfil de multirresistência.

As análises da susceptibilidade aos antimicrobianos revelaram também que a amostra CL-6729 apresentou resistência concomitante à vancomicina e à teicoplanina, que caracteriza o fenótipo VanA. O fenótipo VanA, identificado por metodologia de disco-difusão, foi referendado nos testes de avaliação da concentração mínima inibitória (CMI), por microdiluição em caldo. O valor da CMI para vancomicina da amostra clínica CL-6729 foi \geq 64 µg/mL; enquanto que, para SS-1274 foi de 0,5 µg/mL. Através da metodologia de PCR foi possível confirmar os achados com os testes fenotípicos diante da detecção de produtos de amplificação específicos do genótipo *vanA*. Além disso, CL-6729 também exibiu os fenótipos de resistência, HLGR e HLSRidentificados pelo emprego de discos apresentando concentrações elevadas de gentamicina e estreptomicina, respectivamente.

As características fenotípicas e genotípicas avaliadas para ambas as amostras incluídas neste estudo estão apresentadas no Quadro 7.

Quadro 7 - Características fenotípicas e genotípicas das amostras de Enterococcus faecium utilizadas neste estudo

68

Testes fenotípicos e genotípicos	Amostras / Resultados obtidos nos testes	
	SS-1274 ¹	CL-6729
Caracterização fisiológica ² :		
Coloração de Gram	Cocos Gram +	Cocos Gram +
Produção de catalase	_	_
Hidrólise da esculina em presença de bile	+	+
Crescimento em meio contendo NaCl a 6,5%	+	+
Produção de pirrolidonilarilamilase	+	+
Produção de leucina-aminopeptidase	+	+
Decarboxilação da arginina	+	+
Motilidade	-	-
Produção de pigmento	_	_
Utilização de piruvato de sódio	_	_
Utilização dos açúcares:		
Arabinose	+	+
Manitol	+	+
Metil-α-D-glicopiranosídeo	_	_
Rafinose	_	+
Sacarose	+	+
Sorbitol	_	+
Sorbose	-	_
Susceptibilidade aos antimicrobianos ³ :		
Ampicilina	S	R
Ciprofloxacina	S	R
Cloranfenicol	S	S
Doxaciclina	S	S
Eritromicina	R	R
Estreptomicina ⁴	S	R
Fosfomicina	S	S
Gentamicina ⁴	S	R
Levofloxacina	S	R
Linezolida	S	S
Nitrofurantoína	S	S
Norfloxacina	R	R
Penicilina	S	R
Quinupristina/Dalfopristina	S	S
Rifampicina	R	R
Tetraciclina	S	S
Teicoplanina	S	R
ligeciclina	S	S
Vancomicina	S	ĸ
Concentração mínima inibitória (em µg/mL) de vancomicina ⁵	0,5	≥ 64
Genótipo vanA ⁶	_	+

Legenda: +, teste positivo; –, teste negativo; S, sensível; R, resistente. Nota: ¹Derivada de NCTC 7171 / ATCC 19434^T; ²Realizado e interpretado segundo Teixeira et al. (2015); ³Método de difusão em ágar, segundo CLSI 2009 e 2015; ⁴Discos contendo concentrações elevadas (120 µg de estreptomicina e 300 µg de gentamicina); ⁵Método de microdiluição em caldo, segundo CLSI 2009 e 2015; ⁶Detecção do genótipo de resistência por metodologia da reação em cadeia da polimerase (PCR), conforme descrito em Materiais e Métodos.

Fonte: A autora, 2017.

Os resultados obtidos com a técnica PFGE demonstraram que a amostra em estudo CL-6729 apresentou índice de similaridade de até 80% com outras amostras de origem clínica, isoladas no período de 2004 a 2006 e pertencentes à coleção de culturas de *Enterococcus*mantida por nosso grupo. Os perfis de PFGE foram submetidos à análise de similaridade pelo emprego do coeficiente de Dice e foi construído um dendrograma utilizando o algoritmo UPGMA, com auxílio do software BioNumerics, conforme pode ser observado na Figura 2.

Adicionalmente, *E. faecium* CL-6729 foi caracterizada como pertencente ao MT-12, pela metodologia de MLVA, e ao ST-78, de acordo com os resultados obtidos por MLST. O agrupamento de acordo com o ST e o MTtambém pode ser observado Figura 2.

Figura 2 – Dendrograma representativo do arranjo obtido pela metodologia de PFGE¹, reunindo dados adicionais de tipagem por MLVA² e MLST³, susceptibilidade à vancomicina e ano de isolamento das amostras clínicas de *Enterococcus faecium*



Legenda: ¹Eletroforese em campo pulsado, sequenciamento de múltiplos loci; ²Análise do polimorfismo numérico de segmentos repetitivos em múltiplos loci; ³Tipagem por sequenciamento de multilocus; VAN, vancomicina; R, resistente; A seta vermelha destaca a amostra CL-6729.

Utilizando o algoritmo EBurst v3 foi possível obter a construção de uma árvore filogenética que inclui STs observados na América do Sul. Como observado na Figura 3, ST-78 foi fundador do complexo clonal agrupando vários STs associados às amostras de pacientes hospitalizados em diferentes países da América do Sul (Brasil, Argentina, Chile, Peru e Paraguai).

Figura 3 – Diagrama representativo do relacionamento filogenético dos tipos determinados por metodologia de tipagem por sequenciamento multilocus (MLST), localizando os ST 78 (sequence type 78) associados às amostras de pacientes hospitalizados da América do Sul¹



Legenda; Os números representam os STs; a espessura dos pontos é representativa da quantidade de amostras pertencente ao respectivo ST depositadas no banco de dados; as linhas ligam os STs relacionados; distâncias sequenciais entre STs interligados representam o número de alelos que variaram. Nota: ¹Dados complementares obtidos do banco de dados disponível em http://www.mlst.net Fonte: A autora, 2017.

Assim, os resultados obtidos com o emprego da tipagem molecular por PFGE e MLVA determinaram que a amostra CL-6729 pertence a um clone prevalente e amplamente disseminado no Estado do Rio de Janeiro. Adicionalmente, os dados obtidos por MLST alocaram esta amostra em um tipo (ST-78) pertencente ao complexo clonal 17 (CC17), considerado de alto risco e globalmente disseminado.

Através da metodologia de PCR convencional, foi investigada a integridade dos genes associados ao elemento de transposição Tn*1546*, que carreia o conjunto gênico *vanA*, responsável pela expressão da resistência à vancomicina de maior importância clínica. Ensaios preliminares por espectrometria de massas, que identificaram a expressão da proteína VanA em cultivos na ausência de vancomicina, sugeriram um padrão de resistência constitutivo na amostra CL-6729. Diante deste dado incomum, pois a resistência à
vancomicina em *Enterococcus* decorrente do genótipo *vanA* é caracteristicamente induzida, foram traçadas estratégias para a investigação mais detalhada deste achado. Sendo assim, foi avaliada a integridade de todos os genes pertencentes ao conjunto gênico *vanA*: *orf1*, *orf2*, *vanR*, *vanS*, *vanH*, *vanA*, *vanX* e *vanY*.

Paralelamente, a amostra *E. faecalis* A256 foi utilizada como controle por albergar um tipo de Tn*1546* similar ao protótipo originalmente caracterizado por Arthur e colaboradores (1993) em *E. faecium* BM4147. A amostra A256 foi isolada de um caso de sepse urinária (Shlaes et al., 1989) e é frequentemente utilizada como referência para o estudo da resistência à vancomicina em enterococos.

Os resultados demonstraram que a quase totalidade dos genes apresentou tamanho esperado e semelhante ao controle, indicando integridade gênica (Figura 4). A única exceção foi em relação a *vanS*, cujo produto de amplificação obtido de CL-6729 apresentou tamanho consideravelmente maior do que o da amostra controle A256, cujo tamanho previsto é de 1.154 pb (Figura 4B).

Figura 4 –Géis representativos dos produtos de amplificação obtidos dos genes que compõem o conjunto gênico *vanA*¹ em Tn*1546* das amostras *E. faecium* CL-6729 e *E. faecalis* A256 (amostra controle)



Legenda: Linhas 1A e 1B: Padrão de pares de base (*100 bp Ladder*, Invitrogen Co.); Linhas pares A e B: amostra CL-6729; Linhas ímpares A e B: amostra A256; Linhas (A): 2 e 3, *vanH*; 4 e 5, *vanA*; 6 e 7, *vanX*; 8 e 9,*vanY*; Linhas (B): 2 e 3, genes *vanS*; 4 e 5, *orf2*; 6 e 7, *orf1* segmento de orf1F1→R1 (vide Quadro 3, Materiais e Métodos); 8 e 9, *orf1* segmento de orf1b→R1 (vide Quadro 3, Materiais e Métodos). ¹Apesar de não representado nesta figura, o tamanho dos segmentos amplificados referentes ao gene *vanZ* foram semelhantes para as amostras CL-6729 e A256.

Diante da alteração no tamanho do produto de amplificação em *vanS*, foi investigada a presença de inserções neste gene e/ounas regiões intergênicas associadas, bem como por todo o transposon. Para tal, foram estabelecidas composições de pares de oligonucleotídeos iniciadores diretos e reversos que permitiram a amplificação de mais de um gene no mesmo segmento amplificado. Dessa forma, foram avaliadas alterações nas regiões intergênicas dos seguintes segmentos gênicos:(i) IR $\rightarrow orf1$; (ii) $orf1 \rightarrow orf2$; (iii) $orf2 \rightarrow vanR$; (iv) $vanS \rightarrow vanH$;(v) $vanX \rightarrow vanY$; (vi) $vanY \rightarrow vanZ$; (vii) $vanZ \rightarrow$ IR. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 5.

Figura 5 – Gel representativo dos produtos da amplificação obtidos com a composição de oligonucleotídeos iniciadores com a finalidade de detectar alterações em regiões intergênicas no conjunto gênico vanA em amostras de Enterococcus (CL-6729 e A256)



Legenda: Linha 1: Padrão de pares de base (*100 bp Ladder*, Invitrogen Co.); Linhas pares: amostra CL-6729; Linhas ímpares: amostra A256; Linhas: 2 e 3,*orf1→orf2*; 4 e 5, *orf2→vanR*; 6 e 7, *vanS→vanH*; 8 e 9, *vanX→vanY*; 10 e 11, *vanY→vanZ*; 12 e 13,*vanZ→*IR; 14 e 15, IR→*orf1*. Foram consideradas bandas inespecíficas aquelas < 500 pb nas linhas 2, 3, e 11 e < 1.000 pb > 800 pb na linha 3.

Fonte: A autora, 2017.

Os resultados demonstraram que os produtos de amplificação da quase totalidade dos segmentos avaliados da amostra CL-6729 apresentaram um tamanho esperado, quando comparado com aqueles obtidos da amostra controle A256, indicando que as regiões

intergênicas nestes casos se mantinham preservadas. Entretanto, nenhum produto de amplificação foi observado para o segmento *vanS* \rightarrow *vanH* da amostra CL-6729, sugerindo alterações neste segmento. Estes dados reforçaram a hipótese de que a presença de uma inserção estaria aumentando, consideravelmente, o tamanho deste segmento, comprometendo assim a sua amplificação pelo protocolo de PCR utilizado.

Considerando-se as sequências de inserção mais frequentemente encontradas em *Enterococcus*, a investigação seguiu pela busca de IS*19*, IS*1216* e IS*1542* associadas a *vanS* de CL-6729. Os resultados obtidos a partir do segmento purificado de *vanS* sugeriram a presença apenas de IS*19* (Figura 6).

Figura 6 – Gel representativo da detecçãode IS19 associada ao gene vanS na amostra de E. faecium CL-6729



Legenda: Linha 1: Padrão de pares de base (*100 bp Ladder*, Invitrogen Co.); Linhas pares: amostra CL-6729; Linhas ímpares: amostra A256; Linhas: 2 e 3, negativo para detecção de IS*1216*, segmento F4→R4; 4 e 5, negativo para detecção de IS*1542*, segmento F1→R1; 6, positivo para IS*19* segmento vanSF→IS19R; 7, negativo para IS*19* segmento vanSF→IS19R; 8 e 9, negativo para detecção de IS*1216*, segmento F4→vanSR1; 10 e 11, negativo para detecção de IS*1542*, segmento F1→vanSR1; As setas apontam para: (1) e (2) as bandas correspondem ao amplicon purificado de *vanS* obtido de CL-6729 e de A256, respectivamente, e que não foram utilizados como molde para referida reação de amplificação; IS*19*, aponta a banda correspondente a detecção da amplificação da sequência de inserção. Os segmentos alvo podem ser identificados pelo nome do oligonucleotídeo e segundo Materiais e Métodos (Quadros 3 e 4).

Fonte: A autora, 2017.

A presença de IS19 em vanS também foi investigada por sequenciamento. Entretanto, não foi possível obter a sequência completa, do genealterado, devido a limitações do protocolo utilizado nesta etapa do estudo. Através do alinhamento das sequências obtidas com sequências disponíveis no GenBank, foi possível identificar a presença de IS19 inserida a montante (*upstream*) dos primeiros 119 pb do genevanS. A Figura 7 apresenta o resultado do

alinhamento realizado, indicando a adiçãode 568 pb, apresentando homologia de IS19, ao gene *vanS*. De fato os tamanhos preditos no GenBank para essas sequências indicam que o tamanho de IS19 é de 1.038 pb e o de *vanS* é de 1.154 pb. A presença desta inserção no gene resultaria, portanto, em um fragmento com aproximadamente 2.192 pb, que é compatível com o tamanho do produto de amplificação obtido por metodologia de PCR neste estudo (Figura 4). Sendo assim, reunindo os dados aqui apresentados com os disponíveis no GenBank, consideramos que Tn1546 presente na amostra CL-6729 apresentou como única alteração a presença de IS19 inserida no gene *vanS*.

Figura 7 –Alinhamento¹ das sequências de referência M97297.1 (*vanS* Tn1546) e AF169285.1 (IS19) obtidas do GenBank² com a sequência do segmento obtido da amostra *E. faecium*CL-6729 (continua)

M97297.1 E. faecium Tn1546	4605	4615	4625	4635	4645
vanS CL-6729 AF169285.1 E. faecium IS19					
M97297 1 E faecium In1546	4655	 4665 TTGAAAAATA	4675	 4685 CTATTCCAAA	4695
vanS CL-6729 AF169285 1/F faecium TS19					
	4705	4715	4725	4735	4745
M97297.1 E. faecium In1546 vanS CL-6729		GIAIAICGII	GCAATIGIIG	IGGIAGCAAI	
AF169285.1 E. faecium IS19					
	 4755	 4765	 4775	 4785	 4795
M97297.1 E. faecium Tn1546	TTGTATATTC	GTTCAATGAT	CCGAGGGAAA	CTTGGGGATT	GGATCTTAAG
AF169285.1 E. faecium IS19					
M97297.1 E. faecium Tn1546	4805 TATTTTGGAA	4815 AACAAATATG	4825 ACTTAAATCA	4835 CCTGGACGCG	4845 ATGAAATTAT
vanS CL-6729 AF169285.1 E. faecium IS19	TATTTTGGAA	AACAAATATG	ACTTAAATCA	CCTGGACGCG	ATGAAATTAT
M97297 1 E faecium To1546	4855 ATCAATATTC	4865	4875 AATATAGATA	4885 TCTTTATTTA	4895 TGTGGCGATT
vanS CL-6729	ATCAATATTC	CATACGGAAC	AATATAGATA	CCC	-GTGGTGCTA
AF169285.1 E. faecium 1519					
	5055	5065	5075	5085	5095
M97297.1 E. faecium Tn1546 vanS CL-6729	AACACATTAA GATACTTTTA	AACGGACTCT TA-ACATTCA	GGAAAAGCGA AGGAAATTAT	GAGCAGGATG GAG	CAAAGCTGGC
AF169285.1 E. faecium IS19	GATACTTTTA	TA-ACATTCA	AGGAAATTAT	GAG	AACTGTT
	 5105	···· ··· 5115	···· ··· 5125	···· ··· 5135	···· ··· 5145
M97297.1 E. faecium Tn1546	CGAACAAAGA	AAAAATGACG	TTGTTATGTA	CTTGGCGCAC	GATATTAAAA
AF169285.1 E. faecium IS19	ТСТА	ACATATACCA	CAATTGTGTA	CCAGAT	AAGATTAAAA
M97297.1 E. faecium Tn1546	5155 CGCCCCTTAC	5165 ATCCATTATC	5175 GGTTATTTGA	5185 GCCTGCTTGA	5195 CGAGGCTCCA
vanS CL-6729 AF169285.1 E. faecium IS19	ACCGAAG ACCGAAG	AAATACT AAATACT	GATCAACTGA GATCAACTGA	AGCAACGCGA AGCAACGCGA	TACAGTGATT TACAGTGATT
			···· ···		
M97297.1 E. faecium Tn1546	GACATGCCGG	TAGATCAAAA	GGCAAAGTAT	GTGCATATCA	CGTTGGACAA
AF169285.1 E. faecium IS19	ATTGCTTG ATTGCTTG	TGTTATATGG	GGCATAATTA	ATGGCTAT	-ACTAGCCAA
			···· ···		
M97297.1 E. faecium Tn1546	AGCGTATCGA	CTCGAACAGC	TAAT CGAC	GAGTTTTTTG	AGATTACACG
vanS CL-6729 AF169285.1 E. faecium IS19	AGAGCCACGT AGAGCCACGT	ATAGAGCGGT ATAGAGCGGT	TTGTTCCGTC	TTATTTCCTA	ATGGTG-ACT ATGGTG-ACT

Figura 7 –Alinhamento¹ das sequências de referência M97297.1 (*vanS* Tn1546) e AF169285.1 (IS19) obtidas do GenBank² com a sequência do segmento obtido da amostra *E. faecium*CL-6729. (conclusão)

M97297.1 E. faecium Tn1546 vanS CL-6729 AF169285.1 E. faecium IS19	
M97297.1 E. faecium Tn1546 vanS CL-6729 AF169285.1 E. faecium IS19	
M97297.1 E. faecium Tn1546 vanS CL-6729 AF169285.1 E. faecium IS19	
M97297.1 E. faecium Tn1546 vanS CL-6729 AF169285.1 E. faecium IS19	
M97297.1 E. faecium Tn1546 vanS CL-6729 AF169285.1 E. faecium IS19	5505 5515 5525 5535 5545 GCTGCATACA GTGAGGATAA CAGCATCATT GACATTACCG CGGGCCTCTC TATA-A CTCAACAAAA AAA TATA-A CTCAACAAAA AAA TATA-A CTCAACAAAA AGATCTTATT TTTATGGTCT TAAAATTCAT
M97297.1 E. faecium Tn1546 vanS CL-6729 AF169285.1 E. faecium IS19	-ATGATCGTT ACTAAGACTG GCTTTCCGAT TACTTACTCAATCA
M97297.1 E. faecium Tn1546 vanS CL-6729 AF169285.1 E. faecium IS19	5605 5615 5625 5635 5645 ATAAGCTAGC TG-CCATATT TGAAAAGTTC TATAGGCTGGACAAT GGAATCCAGG TGTCCATGAC GTGAAAGTGT TAGAGACTTT ATCGGAAGAA
M97297.1 E. faecium Tn1546 vanS CL-6729 AF169285.1 E. faecium IS19	
M97297.1 E. faecium Tn1546 vanS CL-6729 AF169285.1 E. faecium IS19	5705 5715 5725 5735 5745 AAGAAATTAT TGTTCAGCAT GGAGGGCAGA TTTACGCGGA AAGCAATGAT ATCCATGAAA AGCTTGCCCT TAAGGGCATT ACTATATCCG TTCCACCACG
M97297.1 E. faecium Tn1546 vanS CL-6729 AF169285.1∣E. faecium IS19	
M97297.1 E. faecium Tn1546 vanS CL-6729 AF169285.1 E. faecium IS19	5805 5815 5825 5835 5845 ATAAAAGGAG GTCCTAAGAG ATGTATATAA TTTTTTAGGA AAATC ACAAAGAAAA ACAGTTGAGA CTGTTTTTC TTCCTTAGAA AAATTAGGTT

Legenda: ¹GenBank, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/; alinhamento realizado com auxílio do aplicativo MEGA v.6.06, usando CLUSTALW; A, C, T, G, nucleotídeos adenina, citosina, timina e guanina, respectivamente; os números indicam a posição relativa à sequência completa de Tn*1546*.

Considerando a presença de IS19 em vanS, foi realizada uma análise hipotética comparativa dos modelos estruturais de VanS alterada versus a proteína nativa (usando a sequência traduzida de M97297.1). Para tal, foram utilizados os aplicativos PSIPRED (http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/) e TopPred 2 (http://www.sbc.su.se/~erikw/toppred2) para predição da estrutura hipotética de VanS modificada pela inserção.As análises demonstrarammodificações na composição de aminoácidos hidrofóbicos, indicativos de domínios transmembrana, apresentando dessa forma um ganho de região transmembranar (Figura 8).

Figura 8 – Predição¹ dos valores de hidrofobicidade indicativos de domínios transmembrana ao longo da sequência de aminoácidos da proteína *vanS* sem alteração (A) e com inserção de IS19 (B) como evidenciado na amostra *E. faecium* CL-6729



Legenda: *hydrofobicity* = hidrofobicidade

Nota: Realizada com auxílio do aplicativo TopPred 1.10; análise da sequência de aminoácidos sem alteração realizada com a sequência traduzida de M97297.

Fonte: A autora, 2017.

Modificações na disposição, bem como na composição de folhas β -pregueadas e α -hélices também podem ser observadas (Figura 9).

Figura 9 – Predição da organização estrutural da modelagem da proteína VanS sem alterações
(A) e com a inserção de IS19 (B) na amostra de *E. faecium* CL-6729, indicando o índice de confiança da predição, a presença de alfa-hélices, folhas-beta e alças nos modelos de estrutura secundária definida com auxílio do aplicativo PSIPRED.



Fonte: A autora, 2017.

Adicionalmente à investigação das alterações presentes em CL-6729 em comparação com a amostra A256, foi realizada uma análise da expressão dos genes *vanA*, *vanS* e *vanR* através da metodologia de PCR em tempo real quantitativo (ddCT). As análises foram feitas em três diferentes condições de crescimento: (i) planctônico em caldo BHI; (ii) do biofilme; e (iii) planctônico oriundo do biofilme. Os níveis de expressão de *vanA*, *vanR* e *vanS* foram normalizados tendo 16S rRNA como padrão.

Considerando-se o crescimento planctônico da amostra A256 em caldo BHI e sem adição de vancomicina como referência dos testes, os resultados demonstraram que a amostra *E. faecium* CL-6729 foi capaz de expressar o gene *vanA* independente da condição de crescimento avaliada, na presença e na ausência do antimicrobiano. Os valores de expressão de *vanA* por CL-6729 foram suplantados apenas pelos níveis observados a partir do crescimento planctônico de A256 em caldo BHI suplementado com vancomicina (Figura 10). Entretanto, não foi observada a expressão de *vanA* a partir do crescimento de A256 em caldo BHI na presença de vancomicina. Consideramos que o tempo de cultivo, 24 h, foi determinante neste resultado, em decorrência do provável consumo do antimicrobiano logo nas primeiras horas de cultivo. Este fato foi menos expressivo no cultivo em biofilmes.

Figura 10 – Níveis de expressão do gene *vanA* nas amostras *E. faecium* CL-6729 e *E. faecalis*





Legenda: VAN+, crescimento na presença de vancomicina;VAN-, crescimento na ausência de vancomicina; PlanctBiof, crescimento planctônico oriundo do biofilme (células não aderentes); PlancBHI, crescimento planctônico em caldo BHI (vide Materiais e Métodos, item 2.1.8.5.1); barras apresentam indicação do desvio padrão, baseado em três experimentos independentes.
Fonte: A entore 2017

Resultados similares à *vanA*foram observados para *vanS* e *vanR*. Dessa forma, na amostra CL-6729, independente das condições de cultivo e da presença ou ausência de vancomicina, a expressão destes genes foi identificada e quantificada por PCR em tempo real (Figura 11). Cabe ressaltar que, a presença de IS*19* em *vanS*, conforme identificado por metodologia de PCR e sequenciamento, não inibiu a sua expressão.

Figura 11 – Níveis de expressão dos genes vanS(A) e vanR (B) nas amostras E. faecium CL-6729 e E. faecalis A256 (controle) na forma planctônica e em biofilme na presença e ausência de vancomicina



Legenda: VAN+, crescimento na presença de vancomicina;VAN-, crescimento na ausência de vancomicina; PlanctBiof, crescimento planctônico oriundo do biofilme (células não aderentes); PlancBHI, crescimento planctônico em caldo BHI (vide Materiais e Métodos, item 2.1.8.5.1); barras apresentam indicação do desvio padrão, baseado em três experimentos independentes.

3.2 Aspectos Relacionados à Virulência de *E. faecium*: Principais Determinantes Genéticos e Formação de Biofilmes

Apenas a amostra CL-6729 apresentou produto de amplificação compatível com o gene *esp*, responsável pela expressão de uma proteína de superfície característica de *Enterococcus* sendo este o único determinante de resistência identificado. Assim, não foi detectada a presença dos genes *asa1* (susbstância de agregação), *cylA* (citolisina), *gelE* (gelatinase) e *hyl* (hialuronidase).

Para investigar os aspectos relacionados à produção de biofilmes por *E. faecium*, inicialmente, foi determinada uma curva de formação avaliando-se em períodos de tempo préestabelecidos, a quantidade de biomassa aderida ao poliestireno. As amostras CL-6729 e SS-1274 apresentaram valores variáveis de densidade ótica ao longo do período analisado (Figura 12). Algumas similaridades na dinâmica de formação dos biofilmes puderam ser observadas, como uma queda dos valores de DO_{570nm} nos tempos de 6 h, 24 h e 74 h, bem como um acentuado acúmulo de biomassa em 4 h, 8 h e 26 h. Entretanto, os valores foram maiores para a amostra CL-6729 (Figura 12 A), que em 4 h de incubação já apresentou uma acentuada quantidade de biomassa.

Figura 12 – Curvas de formação¹ de biofilmes pelas amostras de *E. faecium*CL-6729 (A) e SS-1274 (B)



Legenda: ¹Os biofilmes foram formados em placas de poliestireno, de fundo chato e de 96 poços. As linhas do gráfico foram unidas apenas para fins ilustrativos, as barras indicam o desvio padrão; não foram avaliados os períodos entre os pontos.

Adicionalmente, os resultados sugerem que a amostra SS-1274 apresenta uma taxa de formação de biofilmes relativamente mais lenta, pois valores considerados elevados $(DO_{570nm}>2,0)$ foram obtidos somente após 8 h de incubação. Excetuando-se o tempo de 74 h, CL-6729 apresentou valores mais elevados de DO que SS-1274, sugerindo uma maior capacidade de formação de biofilmes.

Os biofilmes de ambas as amostras de *E. faecium*, foram coradoscom os fluorocromos *Syto9* (verde) e *RUBY* (roxo), que tem especificidade para DNA e proteínas, respectivamente, e as preparações foram avaliadas por CLSM, em objetiva de 40X. Para cada preparação, foram analisados três campos aleatórios.

Em biofilmes formados por 24 h, as imagens obtidas revelaram a presença de estruturas tridimensionais ricas em proteína e DNA (Figura 13 A-D). Contudo, para ambas as amostras, proteína parece ser um constituinte alicerce, recobrindo toda área do substrato analisada (387,5 μ m2). A altura total dos biofilmes para ambas as amostras foi de 62,56 μ m. Já em 72 h de formação (Figura 13 E-H), pode-se observar que os biofilmes de ambas as amostras apresentaram maior quantidade de DNA extracelular distribuído por toda a estrutura.

Figura 13 – Biofilmes formados pelas amostras de *E. faecium* com 24h e 72 h de formação, corados com os fluorocromos *Syto9* e *SYPRO Ruby Protein* e visualizados por microscopia confocal a laser



Legenda: A – D, biofilmes com 24h de formação e corados com *Syto9* e SYPRO *Ruby Protein*; E – H, biofilmes com 72h de formação e corados com *Syto9* e SYPRO *Ruby Protein*; A, B, E e F - amostra SS-1274; C, D, G e H - amostra CL-6729; A, C, E, G - visão superior dos biofilmes; B, D, F, H –face lateral dos biofilmes; as imagens foram obtidas com objetiva de 40X e os *stacks* foram reunidos com auxílio do aplicativo *ImageJ* (NHI, Bethesda, EUA).
Fonte: A autora, 2017.

Para investigar a resposta de macrófagos J.774 em ensaios de interação com células planctônicas ou biofilmes das amostras CL-6729 e SS-1274, foi utilizada a dosagem de óxido nítrico usando a metodologia colorimétrica do reativo de Griess.

Os resultados demonstraram que, em geral, não foram observadas alterações significativas na concentração de nitrito nos sobrenadantes avaliados após os ensaios de interação em ambas as amostras e nas duas formas de crescimento avaliadas (biofilmes ou células planctônicas), quando comparados ao controle constando apenas macrófagos cultivados na presença do meio de cultura DMEM (Figura 14).

Entretanto, após 24h de interação de biofilmes e células planctônicas de *E. faecium* CL-6729 com J.774 observamos uma modulação negativa na produção de nitrito pelos macrófagos (p = 0,0015 para biofilmes e células planctônicas) em relação ao controle ausente de interação(Figura 14 A).

Figura 14 – Concentração de nitrito (NO₂⁻) após ensaio de interação entre as amostras de *E. faecium* CL-6729 (A) ou SS-1274 (B) com macrófagos pertencentes à linhagem
 J.774 em diferentes tempos





Através de ensaios imunoenzimáticos foram investigadas as concentrações das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-10 nos sobrenadantes coletados após interação de biofilmes e de células planctônicas, das amostras CL-6729 e SS-1274, com macrófagos pertencentes à linhagem J.774. As concentrações dessas citocinas foram dosadas após 30 min, 2 h e 24 h de interação nos sobrenadantes das culturas.

Não foram observadas alterações significativas na produção de TNF-α frente à amostra CL-6729 após 30 min de interação quando comparado ao controle (Figura 15 A). Entretanto, nas mesmas condições, valores significativos (p < 0,05) da produção desta citocina foram registrados nos ensaios com a amostra SS-1274, tanto com células planctônicas quanto com biofilmes (Figura 15B). As análises realizadas após 2 h de interação revelaram que ambas as amostras e nas duas formas de crescimento estimularam significativamente (p<0,001) a produção de TNF-α por macrófagos J.774 (Figuras 15C e 15D). Além disso, é possível observar que os biofilmes produzidos por CL-6729 estimularam a liberação de maiores concentrações desta citocina, que as células planctônicas. O contrário foi observado em SS-1274,com maiores valores obtidos nas interações com células planctônicas. Já os dados obtidos após 24 h de interação demonstraram uma inibição estatisticamente significativa da produção de TNF-α nos ensaios de ambas as amostras e nas duas formas de crescimento analisadas (Figuras 15E e 15F).

A avaliação da produção de IFN- γ após 30 min de interação revelou que somente células planctônicas de SS-1274 foram capazes de estimular, de forma significativa, a produção desta citocina (p<0,05) (Figuras 16A e 16B).

Da mesma forma, somente SS-1274 foi capaz de induzir a produção de IFN- γ após 2 h de interação com biofilmes e células planctônicas (p<0,001) (Figuras 16C e 16D). Após 24h de interação, biofilmes da amostra CL-6729 foram capazes de inibir a secreção de INF- γ , apresentando valores significativamente menores que o controle (p<0,05). Porém, apesar de serem observados valores menores de indução com células planctônicas de SS-1274, não é possível sugerir uma modulação negativa, pois não foram obtidos valores significativos nestes ensaios (Figuras 16E e 16F).

Figura 15 – Concentração de TNF-α presente no meio após ensaio de interação entre macrófagos da linhagem J.774 e biofilmes ou células planctônicas das amostras de*E. faecium*CL-6729 (A, C e E) e SS-1274 (B, D e F)



Legenda: Figuras A e B, após 30 min de interação; C e D, após 2 h de interação; E e F, após 24 h de interação. Biof., crescimento em biofilmes; Planc, células bacterianas em cultivo planctônico; MØ, macrófagos J.774; DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*. Asteriscos representam dados estatisticamente significativos, sendo (*** p < 0,0001), (** p < 0,01), (* p < 0,05).
Fonte: A autora, 2017.

Figura 16 – Concentração de INF-γ presente no meio após ensaio de interação entre macrófagos da linhagem J.774 e biofilmes ou células planctônicas das amostras de*E. faecium*CL-6729 (A, C e E) e SS-1274 (B, D e F)



Legenda: Figuras A e B, após 30 min de interação; C e D, após 2 h de interação; E e F, após 24 h de interação. Biof., crescimento em biofilmes; Planc, células bacterianas em cultivo planctônico; MØ, macrófagos J.774; DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*. Asteriscos representam dados estatisticamente significativos, sendo (*** p < 0,0001), (** p < 0,01), (* p < 0,05).
Fonte: A autora, 2017.

Em relação à produção de IL-6 foi observado que o tempo de interação de 30 min pode não ter sido suficiente para avaliação da produção desta interleucina, pois não foram observadas alterações, de acordo com os ensaios realizados (Figuras 17A e 17B).

Por outro lado, resultados significativos puderam ser observados após 2 h de interação com biofilmes e células planctônicas de CL-6729, que estimularam significativamente a produção de IL-6, assim como células planctônicas de SS-1274 (p<0,05) (Figuras 17C e 17D).

Após 24 h de interação, tanto biofilmes de CL-6729, quanto células planctônicas de SS-1274 estimularam elevada produção de IL-6 (p<0,0001) por macrófagos J.774 (Figuras 17E e 17F). Também é válido observar que o aumento da concentração de IL-6 nos ensaios realizados apresentou uma relação direta com o tempo de estímulo dos macrófagos. Após 24 h de cultura, observamos que biofilmes de CL-6729 e células planctônicas de SS-1274 induziram um aumento de cerca de 10X na produção de IL-6 quando comparados aos valores obtidos após 2 h de interação.

Os resultados obtidos nas dosagens de IL-10 demonstraram que após 30 min de interação somente células planctônicas de SS-1274 foram capazes de estimular significativamente a produção desta citocina (p<0,001) (Figuras 18A e 18B). Ambas as amostras foram capazes de estimular a produção de IL-10 de maneira significativa pelas duas formas de crescimento após 2h de interação (p<0,05) (Figuras 18C e 18D). Os dados obtidos após 24h demonstraram que células planctônicas das duas amostras bacterianas foram capazes de inibir a produção de IL-10, com valores significativamente menores em relação ao controle (p<0,05) (Figuras 18E e 18F).

Figura 17 – Concentração de IL-6 presente no meio após ensaio de interação entre macrófagos da linhagem J.774 e biofilmes ou células planctônicas das amostras de*E. faecium*CL-6729 (A, C e E) e SS-1274 (B, D e F)



Legenda: Figuras A e B, após 30 min de interação; C e D, após 2 h de interação; E e F, após 24 h de interação. Biof., crescimento em biofilmes; Planc, células bacterianas em cultivo planctônico; MØ, macrófagos J.774; DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*. Asteriscos representam dados estatisticamente significativos, sendo (*** p < 0,0001), (** p < 0,01), (* p < 0,05).
Fonte: A autora, 2017.

Figura 18 – Concentração de IL-10 presente no meio após ensaio de interação entre macrófagos da linhagem J.774 e biofilmes ou células planctônicas das amostras de*E. faecium*CL-6729 (A, C e E) e SS-1274 (B, D e F)



Legenda: Figuras A e B, após 30 min de interação; C e D, após 2 h de interação; E e F, após 24 h de interação. Biof., crescimento em biofilmes; Planc, células bacterianas em cultivo planctônico; MØ, macrófagos J.774; DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*. Asteriscos representam dados estatisticamente significativos, sendo (*** p < 0,0001), (** p < 0,01), (* p < 0,05).
Fonte: A autora, 2017. A interação entre macrófagos J.774 e *E. faecium* foi também avaliada por microscopia confocal de varredura a laser. Biofilmes incubados por 24h e corados com *Ruby Biofilm Matrix Stain* foram expostos por 30 min e por 1 h a uma suspensão de macrófagos corados com *Calcein Green Biofilm* (Figuras 19A e 19B, respectivamente). As imagens revelaram macrófagos portoda a estrutura, inclusive no interior dos biofilmes, mesmo no menor tempo estabelecido para interação (30 min). Através das imagens não foi possível observar diferenças significativas entre os tempos de incubação.

Figura 19 – Imagens representativas das análises por microscopia confocal de varredura a laser da interação entre biofilmes de*E. faecium*(amostra CL-6729) e macrófagos da linhagem J.774



Legenda: Imagens obtidas após 30 min (A) e 1 h (B) de interação entre macrófagos J.774 e a amostra de *E. faeci*um CL-6729; os biofilmes foram formados durante 24 h e corados com *Ruby Biofilm Matrix Stain* (roxo); Macrófagos J.774 foram corados com *Calcein Green Biofilm Stain* (verde); as imagens foram obtidas com objetiva de 40X e os *stacks* foram reunidos com auxílio do aplicativo *ImageJ* (NHI, Bethesda, EUA).

3.3 Panoramas Proteico e Genômico de E. faecium

A aplicação da técnica de eletroforese de proteínas (SDS-PAGE) revelou perfis com algumas diferenças entre células planctônicas e biofilmes, para ambas as amostras. Estes dados já haviam sido avaliados anteriormente em trabalhos de nosso grupo (MONTEIRO DA

SILVA, 2012). Esta técnica associada à plataforma de espectrometria de massa (ESI-Q-TOF) permitiu identificar uma diversidade de proteínas que foram diferentemente sintetizadas nas condições avaliadas. Os resultados obtidos são decorrentes da avaliação de células planctônicas e de biofilmes formados por 24 h em caldo BHI.

A análise comparativa das bandas, obtidas por extração de proteínas totais e SDS-PAGE, seguiu os seguintes critérios: diferenças de intensidade e exclusividade em uma das duas formas de crescimento estudadas – células planctônicas e biofilmes. A análise comparativa das diferenças na intensidade de certas bandas, nos géis de SDS-PAGE, foi verificada por análise visual e corroborada pela avaliação automatizada pelo softwareBioNumerics. As bandas foram então excisadas e, após processamento, avaliadas por espectrometria ESI-Q-TOF.

A Quadro 8 apresenta as proteínas caracterizadas e organizadas por função biológica característica e por origem – biofilme ou planctônica para cada amostra estudada. A análise funcional foi realizada na base de dados EMBL-Bank (*http://www.ebi.ac.uk/embl*). Como pode ser observado, foram identificadas diversas proteínas relacionadas a funções metabólicas nas células, particularmente nas preparações provenientes de biofilmes. Neste quadro foram incluídas as proteínas identificadas com *score* \geq 60, que garante com elevada segurança a identificação.

Quadro 8 – Caracterização¹ das proteínas de amostras de *Enterococcus faecium*, provenientes de células planctônicas e biofilmes, após separação por SDS-PAGE e identificação por espectrometria de massas (ESI-Q-TOF) (continua)

	Amostra / Tipo de crescimento			
Função biológica ² / Proteínas	SS-1274		CL-6729	
	BIOF	PLAN	BIOF	PLAN
Enovelamento de Proteínas:				
GroEL (HSP)	+	-	-	+
Fator trigger	-	-	-	+
PpiC-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	-	-	-	+
• Proteases:				
Proteína hipotética L0204	-	+	-	-
ClpE	-	+	-	-
UvrB/UvrC:AAA ATPase, região central	+	-	-	-
ATP-dependente metalopeptidase HflB	+	-	-	-
Peptidase V família M20	+	-	+	+
Proteína similar a família Clp; ORFX	-	-	+	-
Peptidase S1	-	-	+	-
• Síntese da parede celular:				
Peptidase M41, FtsH	-	-	+	+
VanA	-	-	+	-
PBP5 (proteína ligadora de penicilina)	+	-	-	-
L-lactato desidrogenase	-	-	+	-
FtsA	+	-	-	-
FtsZ	-	-	+	-
Reações de Oxi-Redução:				
Piridina oxiredutase FAD- dependente	-	-	+	+
Decarboxilase piridoxal-dependente	-	-	+	-
Alcool dehidrogenase contendo ferro	+	-	-	-
Aldeído-alcool dehidrogenase 2	+	-	-	-
NADH oxidase	+	-	-	-
Valina-tRNA sintetase de classe Ia	-	+	-	-
Translocação de polipeptídeos:				
SecA	-	-	+	-

Quadro 8 – Caracterização¹ das proteínas de amostras de *Enterococcus faecium*, provenientes de células planctônicas e biofilmes, após separação por SDS-PAGE e identificação por espectrometria de massas (ESI-Q-TOF) (continuação)

Função biológica ² / Proteínas		Amostra / Tipo de crescimento			
		SS-1274		CL-6729	
	BIOF	PLAN	BIOF	PLAN	
Metabolismo de Ácidos Nucléicos:					
RNA polimerase subunidade β	+	-	-	-	
DNA polimerase I	+	-	-	-	
Polirribonucleotideo nucleotidiltransferase	+	-	+	-	
DNA ligase NAD-dependente	+	-	-	-	
Ribonucleotídeo-difosfato redutase, subunid. α	+	-	-	-	
DNA girase, subunidade A	-	-	+	_	
GMP sintase	+	-	-	-	
IMP dehidrogenase	-	-	+	+	
Pirimidina-nucleosideo fosforilase	-	-	-	+	
Chiquimato trifosfato sintase - CTP	-	-	+	-	
Metabolismo de Proteínas e Aminoácidos:					
Isoleucina-tRNA sintetase de classe Ia	+	-	-	-	
Alanina-tRNA sintetase	+	-	-	-	
Álcool-dehidrogenase contendo ferro	-	+	-	-	
Fenilalanil-tRNA sintetase, subunidade β	+	-	-	-	
Valina-tRNA sintetase de classe Ia	+	-	-	-	
Leucina-tRNA ligase	+	-	+	-	
Fator de elongação G	+	-	-	+	
Glicina-tRNA sintetase	+	-	-	-	
Fator de iniciação 2, proteína ligante de GTP	+	-	-	-	
Metionil-tRNA sintetase de classe Ia, sub. β	+	+	+	-	
Proteína ribossomal S1, ligante de RNA	+	-	+	-	
Fator de elongação Tu	+	-	+	+	
Fator de elongação Ts	-	-	+	-	
Produto do gene <i>rpl</i> U	+	-	-	_	
Asparagina-tRNA sintetase de classe IIb	+	-	-	-	
Fator de liberação da cadeia polipeptídica	+	-	-	-	
Isoleucina-tRNA sintetase de classe Ia	+	-	-	-	
Fenilalanil-tRNA sintetase, subunidade β	+	-	+	-	

Quadro 8 – Caracterização¹ das proteínas de amostras de *Enterococcus faecium*, provenientes de células planctônicas e biofilmes, após separação por SDS-PAGE e identificação por espectrometria de massas (ESI-Q-TOF) (continuação)

	Amost	ra / Tipo	de cresc	cimento
Função biológica ² / Proteínas	SS-	1274	CL-	6729
	BIOF	PLAN	BIOF	PLAN
Tirosina descarboxilase	-	-	-	+
Arginina-tRNA sintetase, classe Ic	-	-	-	+
Lisina-tRNA sintetase	-	-	-	+
Glutamil-tRNA(Gln) amidotransferase sub. β	-	-	+	+
Arginina deiminase	-	-	+	+
Tirosina-tRNA sintetase de classe Ib	-	-	-	+
Produto do gene fusA	-	-	+	-
• Metabolismo de Carboidratos:				
Formato acetiltransferase	+	+	+	-
Piruvato dehidrogenase	-	-	+	-
Piruvato quinase	-	-	+	+
Fosfoenolpiruvato - proteína fosfotransferase	-	-	+	+
Aldose 1-epimerase	-	-	+	-
Enolase	-	-	+	+
Piruvato decarboxilase	-	-	+	-
6-fosfogliconato dehidrogenase	-	-	+	-
Acetil-CoA carboxilase, biotina carboxilase	-	-	+	-
Glutamina sintetase tipo I	-	-	+	-
Glicose-6-fosfato isomerase	-	-	+	+
Fosfoglicerato quinase	-	-	+	+
Ornitina carbamoiltransferase	-	-	+	+
Gliceraldeído-3-fosfato dehidrogenase de tipo I	-	-	+	+
Dihidrolipoamida acetiltransferase	-	+	-	-
Glicosil transferase, familia 2	+	-	_	-
Transcetolase	+	-	-	-
Diidroxiacetona quinase (DAK fosfatase)	+	-	-	-
Adenosilmetionina sintetase	+	-	-	-
Componente do sistema fosfotransferase	+	-	-	-
ABC transportador	+	-	-	-
Fosfopiruvato hidratase	-	-	-	+
Acetato quinase	-	-	-	+

Quadro 8 – Caracterização¹ das proteínas de amostras de *Enterococcus faecium*, provenientes de células planctônicas e biofilmes, após separação por SDS-PAGE e identificação por espectrometria de massas (ESI-Q-TOF) (conclusão)

	Amostra / Tipo de crescimento			
Função biológica ² / Proteínas	SS-1274		CL-6729	
	BIOF	PLAN	BIOF	PLAN
Biossíntese de ácidos graxos:				
Beta-cetoacil sintetase	+	-	-	+
Dehidrogenase alfa-cetoacido subunidade E2	-	-	+	+
Outras Funções e Acessórias:				
Chaperona DnaK (HSP)	-	-	+	+
ATP sintase F1, subunidade β	-	-	+	+
ATP sintase subunidade α	-	-	+	-
ATPase sódio-transportadora	-	-	+	-
HslU (HSP)	-	-	+	-
Lipoproteína de membrana	-	-	+	-

Legenda: ¹A caracterização das proteínas foi realizada com auxílio do *Mascot* (ver Materiais e Métodos), com escores iguais ou superiores a 60 e *p*<0,01; ²A função determinada por consulta a base de dados EMBL-Bank (http://www.ebi.ac.uk/embl); SDS-PAGE, eletroforese em gel de poliacrilamida acrescido de dodecil sulfato de sódio; BIOF, crescimento em biofilmes; PLAN, células bacterianas obtidas de cultivo planctônico; HSP, proteína de choque térmico (*heat shock protein*); +, presença; -, não detectado.

Fonte: A autora, 2017.

Análises por sequenciamento do genoma completo da amostra CL-6729 revelaram um tamanho com 2.922.811 pb. Um total de 314 *contigs* foram gerados, com N_{50} de 24.400 pb, o menor *contig* possuindo 301 pb e o maior apresentando 137,370 pb.

Para anotação estrutural e funcional dos genes foi feita utilizado a plataforma PATRIC 3.2.76. Todos os genes anotados foram confirmados por alinhamento usando ferramenta BLAST (NCBI, *National Center for Biotechnology Information*, EUA). Foram obtidos 3,125 genes preditos, 37,70% de conteúdo C+G, quatro operons de rRNA, 50 genes de tRNA (Figura 20). Através do sequenciamento também foi possível confirmar CL-6729 como integrante do MT-12 e do ST-78.



Figura 20 – Mapa circular¹ do genoma da amostra CL-6729 pertencente à espécie *E. faecium*

Legenda: ¹construído utilizando a ferramenta CGview; G, guanina; C, citosina; GC skew+; GC skew – (Assimetria do conteúdo GC nas fitas positiva e negativa).
Fonte: A autora, 2017.

Similar ao observado nas análises por espectrometria de massas, foram identificados genes relacionado a diferentes funções celulares, dentre os quais, aqueles associados ao metabolismo de carboidratos, divisão celular, metabolismo de ácidos nucleicos, os quais representaram cerca de 2.000 genes do total anotado.

O sequenciamento do genoma revelou a presença de determinantes de resistência a aminoglicosídeo ant(6)-Ia, aph(3')-III e aac(6')-aph(2''); macrolídeos msr(C) e erm(B) e os genes de resistência a glicopeptídeos vanA. Os genes pertencentes ao Tn1546 (vanH, vanR, vanA, vanX, vanY, vanZ e vanS), elemento carreador da resistência aos glicopeptídeos do fenótipo VanA, também foram identificados. Foi observado que o gene vanS anotado continha apenas 189 pb, cujo alinhamento ocorreu com 172 pb do início de vanS presente na referência M.97297 (GenBank). Isto significa 849 pb a menos que o tamanho de vanSdescrito na literatura, sugerindo que o restante da sequência do gene não pode ser anotada, corroborando com a presença de IS19, como já declarado nos resultados anteriores de PCR e sequenciamento (Figuras 4 a 7).

Mutações nos genes *gyrAeparC*, associadas a expressão de resistência às quinolonas, também foram identificadas. Para avaliar a presença de mutações nesses genes foi realizado um alinhamento dos genes anotados como subunidades das enzimas DNA girase e Topoisomerase IV, usando a ferramenta BLAST, com sequências de referência disponíveis no GenBank. Para *gyrA* e *parC*, as sequências de referência utilizadas foram AF060881 e AB017811, respectivamente. Para localização das regiões QRDRs de *parE* e *gyrB*, foi necessário inicialmente o alinhamento destes genes na amostra de *E. coli* K12 com o genoma da amostra *E. faecium* DO, ambos disponíveis no GenBank. Após a localização dessas regiões no genoma de *E. faecium*, estas foram comparadas com as sequências obtidas de CL-6729. As modificações identificadas nestes genes acarretam a mudança Ser-83 (AGT) --- Arg (CGT) da proteína GyrA; e Ser-80 (AGC) --- Ile (ATC) de ParC (onde Ser, serina; Arg, arginina; Ile, isoleucina). Nenhuma alteração foi observada nos genes *gyrB* e *parE*.

Foram identificados os genes *acm*, *efaAfm* e o gene responsável pela proteína de superfície sortase A, que codificam proteínas adesinas envolvidas na virulência, contudo, não haviam sido investigadas por PCR convencional.

Através da ferramenta *Phage Search Tool* – PHAST (disponível em http://phast.whishartlab.com) foi possível identificar três regiões relativas à presença de profagos no genoma de CL-6729, dentre estes um foi identificado intacto e outros dois incompletos (Quadro 9).Também, foi possível identificar 17 sequências de inserção (Quadro 10) caracterizadas pelo emprego da ferramenta *IS Blast Server (IS finder* – http://www-is.biotoul.fr). Foram preditos plasmídeos pertencentes às famíliasrepUS15 e rep17.

Tamanho da Região (em Kb)	Integridade	Escore	Fago	%GC
25,1	Intacto	150	PHAGE_Lister_2389_NC_003291	36,4
23,5	Incompleto	30	PHAGE_Entero_vB_IME197_NC_028671	36,3
6,1	Incompleto	50	PHAGE_Paenib_Xenia_NC_028837	36,1

Quadro 9 – Profagos identificados¹ no genoma da amostra CL-6729 de *E. faecium*

Legenda: ¹De acordo com o emprego da ferramenta PHAST (http://phast.whishartlab.com); %GC, percentual de guanina + citosina.
Fonte: A autora, 2017.

96

Sequência de Inserção		
Família (Grupo)	Identificação	Ongeni provaver
IS3 (IS150)	ISEnfa3	
IS3 (IS150)	ISEfa8	
IS3 (IS150)	ISEfa10	
IS3 (IS150)	IS1485	
ISL3	ISEfa5	
ISL3	ISEfa11	Enterococcus faecium
IS <i>1182</i>	ISEfa7	
IS <i>1380</i>	IS1678	
IS200 (IS605)	ISEfa4	
IS982	ISEfm1	
IS256	ISEfm2	
IS256	ISEf1	
IS256	IS16	
IS <i>30</i>	IS6770	Enterococcus faecalis
IS256	ISEnfa4	
IS256	IS256	Staphylococcus aureus
IS982	IS <i>19</i>	Lactococcus lactis

Quadro 10 – Sequências de Inserção (IS) identificadas¹ no genoma da amostra CL-6729 de *E. faecium*

Nota: E- value, 0,0 em todos os casos; Escores $\ge 850 \le 3,735$ Fonte: A autora, 2017.

4 DISCUSSÃO

O gênero *Enterococcus* inclui espécies comumente associadas às infecções relacionadas aos cuidados na saúde (IrAS), particularmente *E. faecium*, que albergam características demultirresistência e destacam-se por uma excepcional habilidade de disseminação no ambiente hospitalar (ARIAS; MURRAY, 2012). Tem sido atribuído a isto, um processo gradual de aquisição de fatores de resistência aos antimicrobianos e de virulência, que juntosfavoreceram o estabelecimento de um conjunto de amostras mais adaptadas. Estas, apresentam maior grau de similaridade genética dando origem ao que é considerado como o complexo clonal globalmente disperso, nomeado CC17 (CATTOIR; LECLERCQ, 2013; TOP; WILLEMS; BONTEN, 2008).

Este estudo teve por objetivo abordar, através de uma perspectiva abrangente e com o emprego de uma gama de diferentes metodologias, parte do universo de atributos apresentados por membros da espécie *E. faecium* que tem determinado um processo evolutivo cumulativo de adaptabilidade ao ambiente hospitalar. Neste sentido, foram utilizadas duas amostras bacterianas representantes desta espécie, porém isoladas em momentos históricos distintos: (i) SS-1274, derivada da amostra tipo da espécie, de origem humanae, de acordo com as informações que constam nas coleções de cultura onde foi originalmente depositada, representa um isolamento primário anterior à introdução da prática da antibioticoterapia (Orla Jensen, 1919; de acordo com dados em http://www.hpacultures.org.uk); (ii) CL-6729, uma amostra clínica isolada de infecção urinária durante um período de surto por VRE em vários hospitais do Estado do Rio de Janeiro.

Atualmente, é fato que tem-se observado um aumento na frequência de isolamento de *E. faecium* VRE em certas instituições no mundo, indicando que estes microrganismos permanecem evoluindo de forma dinâmica, assegurando sua permanência em locais de excepcional pressão seletiva, como o hospital. Dessa forma,diversos estudos têm buscado compreender a biologia desses clones mais adaptados, assim como os processos de aquisição e disseminação de determinantes de resistência e de virulência,fundamentais aoseu estabelecimento e persistência no ambiente hospitalar (LEAVIS; BONTEN; WILLEMS, 2006; LIM et al., 2017; PRIETO et al., 2016; VAN HAL et al., 2016; ZARRILI et al., 2005). Cabe ressaltar, também, que este ano (fevereiro de 2017) a Organização Mundial da Saúde incluiu *E. faecium* VRE em uma lista de 12 espécies bacterianas que representam atualmente grande ameaça à saúde humana (disponível em http://www.who.int/medicines/publications/

global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/ - último acesso abril de 2017). Esta lista foi elaborada numa tentativa de orientar e promover a investigação e desenvolvimento de novos antimicrobianos, como parte dos esforços da OMS para enfrentar a crescente frequência de amostras resistentes em todo o mundo.

Avaliamos a clonalidade da amostra clínica CL-6729, através de diferentes técnicas de tipagem molecular, para caracterizar sua importância epidemiológica em nível regional e também mundial. Para isso, foram feitas avaliações comparativas com amostras pertencentes a clones reconhecidamente dispersos em diferentes instituições hospitalares situadas no Estado do Rio de Janeiro, que haviam sido previamente analisadas em estudos de nosso grupo e cujos resultados encontram-se mantidos no banco de dados do laboratório. Os resultados de PFGE caracterizaram CL-6729 como pertencente ao complexo clonal prevalente em nosso meio, que a época encontrava-se disperso por mais de 20 hospitais, tanto públicos quanto privados. Adicionalmente, os dados obtidos com MLVA e MLST indicaram que esta amostra pertence aos tipos MT-12 e ST-78, respectivamente, sendo integrante, portanto, do CC17.

Além disto, de acordo com nossas análises feitas pelo emprego do algoritmoeBurst, para investigar a dispersão desse clone em países da América Latina, podemos verificar que ST-78 é variante em um único lócus (SLV, no inglês *single-locus variant*) do ST-17, que é descrito como tipo fundador do CC17.

Sabe-se que ST-78 foi relatado pela primeira vez no Brasil no estudo de Da Silva e colaboradores, em 2012. De acordo com a literatura e com as informações depositadas na base de dados de MLST para *E. faecium*, este tipo tem sido encontrado em pacientes hospitalizados de muitos países como França, Taiwan, Itália, Korea, Japão, Portugal, Paraguai, Alemanha, China, Hungria, Austria, Letônia e Holanda (FALLICOet al., 2011; FREITASet al., 2009; HSIEH et al., 2010; KHAN et al., 2010; KO et al., 2005; LIBISCH et al., 2008; QU et al., 2007; WATANABE et al., 2009; WERNER et al., 2008, 2011). Esses dados mostram o cenário alarmante e reafirmam a distribuição mundial dessas amostras.

Diante do quadro mundial de disseminação de espécies de*Enterococcus*resistentes à vancomicina, diversos estudos têm demonstrado a diversidade do elemento de transposição Tn*1546* como fonte de informação sobre a estrutura clonal dos isolados de *E. faecium* VRE nos hospitais de diversas regiões do mundo (CHA et al., 2013; LÓPEZ et al., 2012; NOVAIS et al., 2008; WARDAL et al., 2017). O conjunto gênico *vanA*, o de maior importância clínica dentre os determinantes de resistência já descritos em enterococos, é carreado pelo transposon Tn*1546*, o qual apresenta diferentes graus de heterogeneidade, associado com a presença de mutações pontuais, deleções e de várias sequências de inserção (CHA et al., 2012; GU et al.,

2009; HANDWERGER et al., 1995; KO et al., 2005; NAAS et al., 2005; WILLEMS et al., 1999).

Além do considerável impacto da presença de transposons na mobilidade e disseminação de genes de resistência (DEPARDIEU et al., 2007), sequências de inserção também podem exercer importante efeito na expressão destes determinantes, influenciando os níveis de transcrição de genes responsáveis pela manifestação do fenótipo resistente ou afetando os mecanismos de regulação (AUBERT et al., 2003; BOYD et al., 2000; COUTO et al., 2003; PERICHON et al., 2000).

Sendo assim, investigamos a integridade dos genes que compõem o elemento Tn1546 na amostra CL-6729. Os resultados demonstraram alterações significativas no tamanho do produto de amplificação do gene *vanS*. Diante disso, seguimos a investigação pela busca de alterações intergênicas, através de PCR por superposição (ou *overlapping*) para obtenção de segmentos que incluíssem essas regiões. Como não foi possível obter produto de amplificação da região entre os genes *vanS-vanH*, a hipótese inicial foi considerar a presença de uma inserção que, possivelmente, estaria aumentando o tamanho deste segmento, a ponto de ultrapassar a possibilidade de amplificação com o protocolo e reagentes utilizados.

Estudos anteriores já apontaram as seguintes sequências de inserção associadas ao Tn1546: IS3, IS19, IS1216V, IS1251, IS1476, IS1485, IS1542, IS1678, ISEfa4, ISEfa5, ISEfa10 e ISEfa11. De maneira específica, um complexo IS1216V-IS3 é o identificado com maior frequência no terminal 5' de Tn1546; enquanto que, nas regiões intergênicas de orf2vanR, vanX-vanY, vanS-vanH, as sequências IS1542, IS1678 e ISEfa, IS19 e IS1251, respectivamente, são as mais comumente encontradas. Outras, IS1476 e IS1485, podem estar, também, localizadas dentro do quadro de leitura dos genes vanY e orf1, respectivamente; e até mesmo uma IS dentro de outra, como já descrito para ISEfa4 que foi identificada inserida na IS1542. Entretanto, a IS1216V é a mais frequentemente descrita, pode estar inserida em diversos locais no transposon, como: entre os genes orf2-vanS e vanX-vanY, na região anterior a *vanR* e na extremidade esquerda do transposon, sendo associada a deleções extensas que, normalmente, abrangem as regiões deorf1 e orf2(CAMARGO et al., 2004; DARINI et al., 1999; GU et al., 2009; HUH et al., 2004; JENSEN et al., 1998; JUNG et al., 2005; KHAN et al., 2008; LOPEZ et al., 2010; MACKINNON et al., 1997; NOVAIS et al., 2004; SCHOUTEN et al., 2001; SIMJEE et al., 2002; SUNG et al., 2008; WERNER et al., 2008; WILLEMS et al., 1999; WOODFORD et al., 2001).

Diante disso, como estratégia de nosso estudo foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores específicos para as regiões direta (*foward*) e reversa (*reverse*) das sequências de

inserção, IS19,IS1216 e IS1542, e de *vanS*,tendo como molde o produto de amplificação do gene, proveniente de uma reação prévia de PCR. De fato, foi identificada a presença de IS19 no interior de *vanS*, que também foi confirmada pelo posterior sequenciamento do gene. Considerando dados semelhantes disponíveis na literatura, observamos que IS19 (também chamada ISEfm1, IS6770 ou ISEf1) já foi identificada em amostras de Enterococcuspodendo estar localizada em elementos genéticos diferentes, como os grupos gênicos de *vanD* e de *vanA*. Huh e colaboradores (2004) reportaram a presença de IS19 na região intergênica de *vanS-vanH*. Já Novais e colaboradores (2008) detectaram esta sequência de inserção em Enterococcus isolados de aves, associada à região intergênica de *vanX-vanY*.

De acordo com comparação da sequência parcial de IS19 obtida neste estudo, com a de referência depositada no GenBank (número de acesso AF169285; 1.038 pb), foi possível determinar que esta inserção, em Tn1546 da amostra de *E. faecium* CL-6729, estava localizada a partir dos primeiros 119 pb de *vanS* (que apresenta 1.154 pb). Não foram encontrados outros registros na literatura da presença de IS19 interrompendo o gene *vanS*, contudo já foram descritas outras sequências de inserção presentes neste gene. Depardieu e colaboradores (2003) detectaram a presença de IS*Efa4* em *vanS*_D (do conjunto gênico *vanD*) em *E. faecium*. Em outro estudo, Darini e colaboradores (1999) evidenciaram a presença de IS*1216V* interrompendo *vanS*, do conjunto gênico *vanA*, em uma amostra desta mesma espécie. Já López e colaboradores (2010) identificaram a sequência de inserção IS*Efa11* em uma amostra clínica de *E. faeciumvanA* interrompendo o gene *vanS* na posição 5332. Esta sequência apresentou 93% de similaridade com IS*Efa5* (IS*L3*)e codifica uma possível transposase de 431 aminoácidos.

Neste estudo, questionamos as possíveis modificações que a presença de IS19 poderia causar ao interromper a sequência gênica da proteína VanS. Considerando que a junção de VanS com o produto de IS19 tivesse formado uma sequência protéica híbrida, avaliamos, através de uma ferramenta de predição de hidrofobicidade e da estrutura protéica secundária, as prováveis alterações na estrutura da proteína. As análises demonstraram alterações na composição de aminoácidos hidrofóbicos, indicativos de domínios transmembrana, apresentando dessa forma, um ganho de região transmembranar. Modificações na disposição, bem como na composição de folhas β -pregueadas e α -hélices também puderam ser observadas. Tais modificações, apesar de hipotéticas, estariam resultando em alterações nos domínios efetores da proteína VanS, ou até mesmo tornando-a não funcional.

Considerando que a interrupção na sequência gênica pela presença de IS19 pudesse refletir em prejuízo à transcrição do gene, foi avaliada a expressão devanS, vanR e vanA, na

presença ou ausência de concentrações subinibitórias de vancomicina, por PCR em tempo real (qPCR). A concentração de vancomicina utilizada nos testes (0,125 μ g/mL – que corresponde a ¼ da CIM de SS-1274) foi escolhida por ter sido a que melhor sustentou o crescimento do inóculo inicial das amostras teste (CL-6729) e controle (A256), mantendo a capacidade de induzir resistência, além de proporcionar maior reprodutibilidade dos ensaios. Ainda para essas avaliações, também foi observada a expressão desses genes em diferentes formas de crescimento, como biofilme comparativamente ao crescimento planctônico.

Nossas análises por qPCR revelaram que a expressão dos três genes avaliados (*vanA*, *vanS* e *vanR*) estava funcional em ambas as amostras (teste e controle). Além disso, foi possível identificar que para a amostra CL-6729, a expressão da resistência à vancomicina era constitutiva. Este fato ainda é de ocorrência rara para enterococos e certamente está acompanhado de uma grande importância clínica. Para *E. faecium* CL-6729 foi observado que os níveis de expressão dos três genes foram similares e independente da presença de vancomicina no meio. Além disso, mesmo no crescimento em biofilme, onde a taxa metabólica é reconhecidamente reduzida e, portanto, menos suscetível a ação de antimicrobianos, foram detectados níveis similares de expressão dos genes alvo. A avaliação da expressão gênica em diferentes formas de crescimento corroborou os achados do quanto se apresenta de forma incomum a capacidade de resistência aos glicopeptídeos na amostra de *E. faecium* CL-6729. Cabe ressaltar que o funcionamento do sistema de resistência à vancomicina na ausência do antimicrobiano e em diferentes formas de cultivo foi também identificado por espectrometria de massas (Q-Tof). Por esta metodologia foi possível detectar a presença da proteína VanA com alto índice de confiança.

Diante desses achados consideramos que as alterações encontradas na proteína VanS, certamente relacionadas à presença de IS19 no gene *vanS*, tenha relação direta ou indireta com a apresentação constitutiva da resistência à vancomicina na amostra de *E. faecium* CL-6729. A expressão constitutiva de genes *van* devido às alterações presentes em VanS já foram relatadas na literatura. Por exemplo, Batista e colaboradores (1997) demonstraram este fato em uma amostra de enterococos apresentando o conjunto gênico *vanB*, onde mutações que resultaram na substituição de aminoácidos laterais à histidina na posição 233 da proteína VanS_B, possível sítio de autofosforilação, foram responsabilizadas pela expressão constitutiva da resistência. Da mesma forma, Boyd e colaboradores (2000) detectaram uma mutação em VanS que levou a uma proteína não funcional e ao fenótipo constitutivo *vanD* de resistência à vancomicina. López e colaboradores (2010) detectaram a presença de IS*Efa11* interrompendo *vanS* em uma amostra clínica de *E. faecium* apresentando fenótipo constitutivo *vanA*.

Entretanto, neste estudo não foi possível determinar o mecanismo que determina a expressão constitutiva da resistência à vancomicina na amostra de *E. faecium* CL-6729. Consideramos principalmente duas hipóteses: ou VanS modificada permite uma autofosforilação mesmo na ausência do antimicrobiano (ação direta), ou uma via alternativa pode estar funcional nesta amostra bacteriana (ação indireta).

Sabe-se que VanS é uma proteína fundamental na regulação do sistema *van* de resistência à vancomicina (ARTHUR et al., 1992; BATISTA et al., 1997; DEPARDIEU et al., 2003; FLETCHER, 1991; WRIGHT et al., 1993). Mais detalhadamente, a regulação da expressão dos genes *van* associados ao Tn*1546* ocorre através de um sistema-de-dois-componentes, *vanS/vanR*, em resposta à presença do glicopeptídeo no meio extracelular. A proteína VanS é uma histidina quinase transmembrana que apresenta o domínio senso extracelular (N-terminal) e o fosfatase/quinase citoplasmático (C-terminal), enquanto que VanR é citoplasmática e age como um regulador transcricional (BOOTH et al., 2011; CABRAL et al., 2011; GOODMAN; MARSHALL, 1995; JOUENNE et al., 2004; LATTIF et al., 2011; LEN et al., 2003; RATHSAM et al., 2005; SHIN et al., 2009; SILVA et al., 2011; WANG et al., 2012; WELIN et al., 2004).

Em VanS, o domínio quinase é composto por cinco regiões (denominadas H, F, G1, G2 e N), sendo uma delas (H) responsável pelas funções de autofosforilação e de fosfatase/quinase. Duas outras regiões (G1 e G2) correspondem aos sítios de ligação de ATP. Na presença do glicopeptídeo, o domínio citoplasmático de VanS catalisa a autofosforilação (dependente de ATP) de histidina e transfere o grupo fosfato para um resíduo de aspartato presente no domínio efetor de VanR (ARTHUR et al., 1992;1999; WRIGHT et al., 1993). A modulação dos níveis de fosforilação de VanR ocorre pela dupla ação de VanS que possui atividade fosfatase em condições não indutoras e quinase na presença dos glicopeptídeos (ARTHUR et al., 1997; 1999; DEPARDIEU et al., 2003; 2005; HOLMAN et al., 1994). A fosforilação de VanR aumenta a afinidade da porção efetora da proteína aos promotores e estimula a transcrição dos genes relacionados à expressão da resistência aos glicopeptídeos (DEPARDIEU et al., 2003; WRIGHT et al., 1993).

Sabe-se que, a atividade fosfatásica de VanS é necessária para a regulação negativa dos genes de resistência na ausência do glicopeptídeo, prevenindo o acúmulo de VanR fosforilado por acetilfosfato ou por outras quinases da célula (ARTHUR et al., 1996; 1999; DEPARDIEU et al., 2003; EVERS et al., 1996). Estudos anteriores utilizando *E. coli*, onde foram introduzidos promotores (PvanH-, PvanR- e PvanY-) responsáveis pela expressão de vanRSHAXYZ, demonstraram que VanR pode ser fosforilada na ausência de VanS,

provavelmente por outras quinases presentes na amostra "repórter" (HALDIMANN et al., 1997; SILVA et al., 1998). Além destes estudos, Arthur e colaboradores em 1997, também demonstraram a ativação constitutiva de VanR na ausência de VanS em uma amostra de *E. faecium vanA*.

Apesar de somente IS19 ter sido identificada por PCR em CL-6729, as análises por sequenciamento do genoma completo (WGS) detectaram a presença de IS*Efa4*, IS*Efa5*, IS*Efa8*, IS*fa10*, IS*Efa11*, IS16, IS256, IS1485, IS1678, IS*Enfa4* e IS*Efm2*. Cabe ressaltar que, IS16 também é utilizada como marcador de amostras de *E. faecium* associadas ao ambiente hospitalar e pertencentes ao CC17 (WARDAL et al., 2017; WERNER et al., 2011). Também foram detectadas por WGS a sequência de inserção IS*Enfa3* já identificada tanto associada ao elemento Tn*5382*, o qual carreia elementos *vanB-2* de resistência à vancomicina (CARIAS et al., 1998; LEE et al., 2003), quanto inserida em um alelo de *pbp5* determinando resistência à ampicilina (GARCÍA-SOLACHE et al, 2016; HANRAHAN et al., 2000; LU et al., 2005).

Sequências de inserção são os menores e mais frequentes elementos transponíveis conhecidos em procariotas. Estes elementos são reconhecidamente envolvidos na geração de diversidade genética, bem como modificando a expressão gênica. Exercem, portanto, importante papel na evolução dos microrganismos, promovendo inativação gênica e plasticidade genômica. Já foi reportado que, a quantidade de IS presentes em diferentes amostras bacterianas seja de magnitude extremamente variável, por razões ainda desconhecidas. Entretanto, é consensual que uma maior quantidade de IS em uma dada amostra tenha correlação positiva com a maior frequência de transferência horizontal de genes, tamanho do genoma, virulência e adaptação ao hospedeiro (LEE et al., 2016; SIGUIER et al., 2014; TOUCHON; ROCHA, 2007; VAN SCHAICK; WILLEMS, 2010).

Além dos elementos relacionados à resistência à vancomicina, nossas análises por sequenciamento do genoma total (WGS) de CL-6729 revelaram a presença de determinantes de resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos [ant(6)-Ia, aph(3')-III e aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia] e macrólídeos [msr(C) e erm(B)]; além de mutações em genes relacionados à resistência à quinolonas (gyrA e parC).

O fenótipo HLAR está reconhecidamente presente em frequência elevada entre amostras de *Enterococcus*, e tem o gene*aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* como determinante clinicamente mais importante nestes microrganismos (CHOW et al., 2000; FERRETTI; GILMORE; COURVALIN, 1986; KAK et al., 2000; LECLERCQ et al., 1992). Somando-se ao arsenal de determinantes de resistência identificados por análises de WGS, foram

identificados, também, genes de resistência a macrolídeos [msr(C) e erm(B)] cuja expressão resulta na inibição da síntese proteica por ligação à subunidade 50S do ribossomo.

Devido à frequente detecção de resistência entre amostras de *Enterococcus*, antimicrobianos pertencentes à classe dos macrolídeos não são mais utilizados no tratamento das enterococcias (JONAS; MURRAY; WEINSTOCK, 2001; EUCAST, 2011). Os dois mecanismos mais comuns que causam resistência a macrolídeos em *Enterococcus* são a modificação do alvo causada por uma enzima que metila uma adenina específica no RNA ribossomal 23S, a qual é codificada pelo gene *ermB* e por uma bomba de efluxo codificada pelos genes *mef* (A/E) e *msr* (PORTILLO et al., 2000;SCHWAIGER; BAUER, 2008; SINGH et al., 2001;SUTCLIFFEet al., 1996). Genes *mrs*(*C*) codificam uma bomba de efluxo de transporte do tipo ABC para macrolídeos e estreptrogramina B. Os níveis de resistência resultantes da expressão desta bomba são geralmente mais baixos que os produzidos pela modificação do alvo causada pelas metilases ribossômicas codificadas pelos genes *erm* (GRAHAM et al., 2009; PORTILLO et al. 2000; ZOU et al., 2011).

A resistência a quinolonas, juntamente com a resistência à ampicilina, compreendem marcadores do complexo clonal 17 (CC17) (CATTOIR; GIARD, 2014; HOLLEBECK; RICE, 2012; TOPet al., 2008). Quinolonas possuem como alvo a DNA girase e a topoisomerase IV, as quais são essenciais para a sobrevivência bacteriana. Cada enzima é composta por um heterotetrâmero, no qual a DNA girase é composta por duas subunidades GyrA e duas GyrB e a topoisomerase IV composta por duas subunidades ParC e duas ParE. GyrA é homóloga a ParC e GyrB a ParE (ALDRED et al., 2014; WANG, 1996). A resistência é geralmente decorrente de mutações pontuais em ambas as enzimas. Tais mutações tem sido comumente localizadas no domínio amino terminal de GyrA (resíduos 67 a 106 para E. coli) ou ParC (resíduos 63 a 102) e estão próximas ao sítio ativo de tirosinas (Tyr122 para GyrA e Tyr120 para ParC), os quais são covalentemente ligados ao DNA em um intermediário enzimático, em ambas as enzimas (LAPONOGOV et al., 2009; 2013; MORAIS et al., 1997; WOHLKONIG et al., 2010). Este domínio tem sido chamado de região determinante de resistência às quinolonas ouQRDR (do inglês quinolone resistance-determining region) de GyrA e ParC (CATTOIR; GIARD, 2014; HOLLEBECK; RICE, 2012; YOSHIDA et al., 1990). O sítio Ser83 é o mais comum de mutação em*E.coli*, sendo seguido em frequência por Asp87; e esta maior prevalência de mutações nesses sítios aparentemente se repete em outras espécies bacterianas (ALDRED et al, 2014;DRLICA et al., 2009; HOOPER, 2003). Consequentemente, a presença de mutações em QRDR de ambos GyrA/ParC e GyrB/ParE dimimui a afinidade da quinolona ao complexo enzima-DNA (WOHLKONIG et al., 2010).

De acordo com os dados obtidos do sequenciamento do genoma total, foram encontrados os genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE* os quais relevaram a presença das mutações Ser83-Arg em GyrA e Ser80-Ile em ParC. Não foram observadas mutações em GyrB e ParE. Similares resultados já foram obtidos em amostras de *E. faecium*, particularmentepertencentes ao CC17 (LEAVIS et al., 2006). Além disso, dados de estudos anteriores revelaram que apesar de mutações em domínios específicos de GyrB e ParE já terem sido identificadas e, também, estarem associadas a resistência às quinolonas, parecem ser substancialmente menos frequentes entre amostras de *Enterococcus* (BREINES et al., 1997; LEAVIS et al., 2006; YOSHIDA et al., 1991).

As análises por WGS revelaram, também, a presença de profagos no genoma da amostra CL-6729. A presença desses elementos em enterococos tem sido relatada há mais de 70 anos, considerando os trabalhos pioneiros de Clark & Clark (1927) e de Evans (1934). Desde então, diversos tipos de fagos apresentando uma variabilidade genética e morfológica, já foram encontrados associados a diversas espécies pertencentes à divisão Firmicutes, de bactérias Gram positivas. Nestes microrganismos, os bacteriófagos são considerados importantes vetores na transferência horizontal de genes de virulência e de resistência aos antimicrobianos (MAZAHERI et al., 2010; PARASION et al., 2012).

Em S. aureus, por exemplo, genes associados a proteínas de evasão do sistema imune (VAN WAMEL et al., 2006; TORMO et al., 2008), assim como à leucocidina de Panton-Valantine (PRÉVOST et al., 1995), são codificados em bacteriófagos. Também já foi demonstrado que fagos são responsáveis pela codificação de genes de virulência importantes na patogênese das infecções causadas por *Streptococcus pyogenes* (AZIZ et al., 2004; 2005; BANKS; LEI; MUSSER, 2003). Em enterococos, o maior número de estudos se concentra nas espécies *E. faecium* e *E. faecalis* e apontam para a importância desses vetores na aquisição de características de resistência aos antimicrobianos e virulência (BREDE et al., 2011; HORIUCHI et al., 2012; ; LEE; PARK, 2012; MAZAHERI et al., 2010; 2011; PARASION et al., 2012; YASMIN et al., 2010).

Em nosso estudo detectamos a presença de três profagos, cujas sequências, quando comparadas no GenBank, indicaram sua detecção inicial em diferentes microrganismos, sendo um proveniente de*E. faecalis*, um de *Listeria* e outro de *Paenibacillus*. O profago vB_EfaS_IME197, descritoe caracterizado recentemente em *E. faecalis*por Cheng e colaboradores (2016),possui DNA dupla fita de 41.307 pb, além de dois tRNAs e um gene de integrase, o qual sugere que este é um fago lisogênico. Além disso, possui os genes necessários para formação da estrutura viral, regulação e modificação genética (repressor, antirepressor, iniciação da replicação e regulação da transcrição), genes que participam da lise
do hospedeiro (lisinas e holinas), genes que possuem funções adicionais como proteínas de recombinação, glicerofosforil diester fosfodiesterase, proteína D de ligação à colina entre outras. Já o profago 2389, pertencente à família *Siphoviridae*, é descrito comumente associado a diferentes gêneros de bactérias Gram positivas, além de *Listeria*, como*Lactococcus* e *Streptococcus* (BRÜSSOW; DESIERE, 2001).

O terceiro profago identificado neste estudo (bacteriófago Xenia), cuja sequênciase apresentou de forma incompleta, é um fago lítico oriundo de *Paenibacillus larvae*, que já foi sequenciado e caracterizado,possuindo um genoma com 41.149 pb e um total de 77 genes (STAMEREILERSet al., 2016; TSOURKAS et al., 2015). Consideramos importante destacar que o encontro deste profago na amostra CL-6729 nos parece um dado bastante interessante. A troca genética entre *Enterococcus* e membros do gênero *Paenibacillus*, microrganismos Gram positivos, esporulados, fundamentalmente oriundos de ambientes naturais (solo) e também empregados como biopesticidas, é sugerida particularmente em função da resistência adquirida à vancomicina (GRADY et al., 2016; PATEL, 2000). Estudos anteriores já demonstraram a presença do operon *vanA* em diferentes espécies de *Paenibacillus*, com uma organização gênica muito semelhante ao encontrado em *vanA* e *vanB* de *Enterococcus*, indicando a existência de um ancestral comum. Adicionalmente, foi também sugerido e destacado a possível participação do emprego de biopesticidas na cadeia de disseminação, aquisição e persistência de genes de resistência aos antimicrobianos (GUARDABASSI et al., 2005; HASMAN et al., 2006; PATEL et al., 2000).

As análises por WGS também revelaram a presença de dois plasmídeos pertencentes à famílias rep17 e repUS15.Plasmídeos são importantes colaboradores da disseminação de genes de resistência e virulência, contribuindo para o estabelecimento de surtos por microrganismos multirresistentes(FREITASet al., 2016; FOLSTERet al., 2017; LIet al., 2016).Jensen e colaboradores (2012) classificaram e caracterizaram diferentes plasmídeos de acordo com os genes *rep*, os quais incluem 19 famílias (*rep family*). A família rep17 contém o plasmídeo conjugativo pRUMque apresenta uma estrutura em mosaico, que indica recombinação por co-integração e transposição (GRADY; HAYES, 2003). Recentemente Wardal e colaboradores (2017) relataram a presença de rep17_{pRUM} carreando o conjunto gênico *vanA* de resistência à vancomicina em *E. faecium*isolados de 42 instituições hospitalares na Polônia em um período de 1997 a 2010. Entretanto, nossos resultados não permitiram fazer essa relação para que possamos afirmar que os genes associados à Tn*1546* em CL-6729 estejam associados a esse plasmídeo.

Já a família rep15agrupa três plasmídeos encontrados em *S. aureus*, os quais incluem pSK41, pLW043 e pUSA300. O plasmídeo psK41 codifica resistência aos antimicrobianos e possui cópias integradas do plasmídeo pUB110; pLW043 está associado à amostras de*S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA), como também a transferência da resistência à vancomicina (Tn*1546*) para*S. aureus*; e pUSA300 éimportante na disseminação da resistência à meticilina(DIEP et al., 2006; RAMSAY et al., 2016; WEIGEL et al., 2003).

Diante do atual cenário de *E. faecium* como protagonista de uma série de infecções relacionadas aos cuidados na saúde, e da importância do papel dos biofilmes como coadjuvantes nesses processos, avaliamos também os aspectos associados à formação de biofilmes pelas amostras de *E. faecium*, dentre estes, a interação dessas estruturas com macrófagos.

A formação de biofilmes por enterococos, seja amostras VRE, ou mesmo sensíveis à vancomicina (VSE), em infecções associadas ao ambiente hospitalar, particularmente as decorrentes de dispositivos médicos, é uma reconhecida grave ameaça ao paciente hospitalizado. Considera-se que biofilmes conferem uma proteção aos microrganismos contra os agentes antimicrobianos pela própria constituição ou estado metabólico do microrganismo (DONLAN;COSTERTON, 2002). Diante de microrganismos multirresistentes, como é o caso de amostras VRE de *E.faecium*, essa capacidade só vem agravar e contribuir para a dificuldade de sua erradicação. Além disso, em biofilmes polimicrobianos, a transferência horizontal de genes entre espécies, ou até mesmo gêneros distintos, passa a ser uma possibilidade adicional, aumentando a preocupação relativa à temida dispersão da resistência à vancomicina para outras espécies, como *S. aureus*, particularmente para amostras resistentes à meticilina (PALMER;KOS; GILMORE, 2010).

Os resultados relativos à cinética de formação de biofilmes revelaram que a amostra multirresistente CL-6729 apresentou, relativamente, uma maior biomassa na maioria dos tempos analisados. Pode-se observar também que esta amostra atingiu valores elevados de densidade óptica logo nas primeiras 4 horas de incubação, sugerindo uma maior agilidade nos processos iniciais de formação, em relação à amostra SS-1274. Estes resultados podem ainda estar relacionados à presença de *esp*, que poderia contribuir para uma maior aderência ao substrato. Estudos de Heikes, Bonten e Willems (2007) revelaram que mutantes para *esp* formaram menos biofilmes e apresentaram uma menor capacidade em aderir ao poliestireno, dados que estão de acordo como nossos achados.

As análises porWGS, incluídas neste estudo, demonstraram que CL-6729 também alberga o gene *acm* (*adhesin of collagen from E. faecium*), que codifica para uma adesina de

colágeno e de outras proteínas da matriz extracelular. Esta proteína pertence à subfamília de adesinas bacterianas designadas MSCRAMMs, que são consideradas importantes elementos nos estágios iniciais da infecção, interagindo especificamente com integrantes de matriz, como colágeno, fibronectina e laminina (DUPRÈ et al., 2003; NALLAPAREDDY et al., 2003; PAGANELLI et al., 2013; SILLANPÄÄ et al., 2009). Acm é expressa somente por amostras associadas ao ambiente hospitalar e, portanto, fazem parte da chamada clade HA ou subclasse A1. Genes que codificam esta proteína foram encontrados inativos em amostras comensais, pela presença de sequências de inserção ou *stop* códons, em contrapartida, o gene *acm* foi encontrado intacto em todas as amostras isoladas de endocardite (NALLAPAREDDY et al., 2008; PAGANELLI et al., 2013). Também, o gene *efaA_{fm}*, que codifica para uma adesina de parede celular, foi detectado através das análises por WGS. A função desta proteína ainda não está completamente esclarecida, mas acredita-se que tenha participação na aderência de *E.faecium* a diferentes superfícies, o que pode vir influenciar na maior eficiência para a formação de biofilmes (SOHEILI et al., 2014).

Além disso, detectamos por sequenciamento do genoma a presença do gene responsável pela síntese de sortase A. As sortases são responsáveis pela ancoragem covalente de proteínas de superfície, que apresentam um motivo LPXTG, à parede celular (MARRAFFINI;DEDENT;SCHNEEWIND, 2016). Estudos anteriores demonstraram que a deleção do gene da sortase afetou os estágios de aderência, resultando em decréscimo na formação de biofilmes por *E. faecalis* (GUITON et al., 2009; KEMP et al., 2006). Além disso, Guiton e colaboradores (2010) demonstraram que mutantes da amostra de referência *E. faecalis*OG1RF,que não expressam sortase A, apresentaram uma diminuição na ordem de 10³ UFC quando recuperadas de cateteres implantados na bexiga e nos rins de animais de experimentação, quando comparados à amostra selvagem. Os autores destacaram que os resultados obtidos sugeriram que a sortase A desempenha um papel importante na patogênese das infecções urinárias associadas a cateteres e de etiologia enterocócica. Porém sua participação efetiva na formação de biofilmes ainda não foi descrita. De qualquer forma, cabe lembrar que a origem clínica de *E. faecium* CL-6729 é infecção do trato urinário.

Tais características possuem fundamental importância se extrapolarmos para uma situação clínica, onde esta amostra teria uma maior rapidez na resposta ao estímulo para formação de biofilme, o que pode refletir uma instalação mais rápida no hospedeiro ou em dispositivos médicos, com subsequente dispersão. É interessante observar também que a amostra sensível apresentou um desenho da curva muito similar a da amostra multirresistente, denotando uma semelhança no processo de desenvolvimento apesar de apresentarem

diferentes valores para a quantificação da biomassa aderida. Assim, nossos dados nos parece indicar que a bagagem genética relacionada à virulência e à resistência naturalmente favorece o sucesso de um determinado clone, muito mais que a formação de biofilme, que apesar de também contribuir para o fato, se mostrou uma característica comum nessas amostras.

Após análise da cinética de crescimento dos biofilmes, foram escolhidos dois tempos (períodos) de formação, como base para avaliação pelas demais metodologias empregadas neste estudo. Para a maioria das avaliações complementares, utilizamos biofilmes formados por 24 horas e por 72 horas. Considerou-se extrapolar que o primeiro período (24 horas) seria o representativo, provavelmente, de uma fase de maior destacamento, devido à abrupta queda na biomassa, como observado na curva de formação, e que na maioria das vezes está relacionado a uma maior "diferenciação" nas células que se destacam, representando um período de dispersão. Enquanto que o segundo (72 horas), representaria biofilmes com um maior número de estruturas maduras e tridimensionais, diante dos elevados valores de biomassa identificados.

É reconhecido que a disponibilidade de nutrientes é um dos fatores que influenciam no desenvolvimento de biofilmes (MOHAMED;HUANG, 2007). Assim, neste estudo, não descartamos a possibilidade de que essa influência tenha sido exercida para a queda dos valores de DO obtidos e registrados na curva de formação, para ambas as amostras, nas primeiras 24 horas. Tais efeitos podem refletir o consumo dos nutrientes presentes no meio de cultura (BHI) e consequente produção de ácidos, acarretando no destacamento da estrutura. A troca do meio de cultura, a cada 24 h, acarretou em um aumento na biomassa, que pode ser decorrente da renovação de nutrientes e estabilização do pH. De qualquer forma, consideramos que avaliar esta etapa traria dados interessantes com prováveis aspectos diferentes de maiores períodos de formação. Baldassari e colaboradores (2001), analisando a formação de biofilmes por *Enterococcus*, também associaram a maior disponibilidade de nutrientes com o aumento das taxas de formação.

Outro fator que desempenha um importante papel para o desenvolvimento de biofilmes é a substância polimérica extracelular (EPS). A distribuição de seus componentes varia de um microrganismo para outro e é dependente das condições de crescimento, mas tipicamente compreende proteínas, polissacarídeos e DNA (BERNE et al., 2010; WATNICK;KOLTER, 2002). EPS também providencia uma base estrutural e muitas propriedades de defesa de um biofilme maduro (TART; WOZNIAK, 2008). Algumas espécies bacterianas, como certas enterobactérias (espécies de *Klebsiella* e *Enterobacter*), formam biofilmes com pouca variedade de componentes associados à EPS. Já membros da

espécie *Streptococcus pneumoniae* são hábeis em produzir substância polimérica extracelular com constituição química diversa (DAVEY; O'TOOLE, 2000).

A constituição da EPS pode ser influenciada pelas condições de cultivo, tais como pH, temperatura e até mesmo pela metodologia utilizada para a obtenção de biofilmes *in vitro*, como substrato, tempo de cultivo, dentre outras (GOLLER; ROMEO, 2008). Estes dados corroboram nossos achados quetambém indicam que condições de cultivo, e particularmente o tempo de formação, interferem na composição da EPS de biofilmes de *E. faecium*. Isto pode ser avaliado pelas imagens obtidas na microscopia confocal de varredura a laser, que demonstraram que nas primeiras 24 h de desenvolvimento, o substrato parece estar recoberto por proteínas. A imagem obtida revelou um "tapete" protéico recobrindo todo o substrato (neste caso vidro), que consideramos que possa ser composto por células bacterianas e/ou mesmo proteínas secretadas, que aparentemente funcionariam como "alicerce" para a sustentação dos biofilmes. Já em biofilmes formados por 72 horas pode-se observar uma grande concentração de DNA extracelular nas análises por microscopia confocal.

Estas comunidades bacterianas são bem conhecidas pela resistência natural aos antimicrobianos, no entanto, resultados disponíveis de análises relativas à sua interação com componentes do sistema imune ainda são raros e pouco conclusivos (CASTRO et al., 2017; JOHNSON et al., 2016;SECOR et al., 2016). Sabe-se, entretanto, que a resposta imune a biofilmes é complexa e os dados obtidos até o momento em estudos anteriores permanecem contraditórios. Biofilmes podem suprimir e superestimular o sistema imune, e é provável que esta resposta diferencial dependa de muitos fatores, incluindo: a condição imunológica do hospedeiro, a localização anatômica destas estruturas, as espécies que as compõem e os antígenos específicos detectados pelo sistema imune (JOHNSON et al., 2016;SECOR et al., 2016).

Estudos prévios já demonstraram diferentes tipos de resposta do sistema imune frente à infecção por *Enterococcus*, bem como a identificação de mecanismos associados à evasão do microrganismo, particularmente relacionados à espécie *E. faecalis*. Neste contexto, já foi visto que membros desta espécie são capazes de induzir morte celular de macrófagos, PMNs e linfócitos (KIRSCHNEK et al., 2004; LEE et al., 2004; MIYAZAKI et al., 1993). Zou e Shankar (2016) demonstraram que *E. faecalis* são capazes de sobreviver no interior de macrófagos por períodos maiores de tempo que outros gêneros/espécies bacterianas, como *Lactococcus lactis* e *E. coli*. Por outro lado, apesar de um número inferior de relatos relacionados à *E. faecium* e sua interação com o sistema imune, Gröbner e colaboradores (2010) identificaram que microrganismos desta espécie também foram capazes de induzir morte celular, por mecanismo diferente de apoptose, em macrófagos J774.A1 por inibição da ativação de procaspase 3.

Porém, pouco se sabe sobre a resposta do sistema imune na presença de biofilmes formados por esses microrganismos. Diante disso, neste estudo foi realizada uma análise da interação entre biofilmes e células planctônicas de *E. faecium* e macrófagos pertencentes à linhagem J.774, durante diferentes tempos (30 minutos, 2 horas e 24 horas). Investigamos a resposta dos macrófagos através da dosagem indireta de óxido nítrico (NO) e das citocinas INF- γ , TNF- α , IL-6 e IL-10.

Espécies reativas de nitrogênio produzidas pela enzima induzível denominada óxido nítrico sintase (iNOS) desempenham um importante papel na morte de microrganismos dentro das células fagocíticas (FANG et al., 2004; VAZQUEZ-TORRES et al., 2000). Sua produção é realizada por diversas células como macrófagos derivados de monócitos, macrófagos alveolares e monócitos de sangue periférico, neutrófilos, hepatócitos, fibroblastos, células da medula óssea e osteoblastos (GRABOWSKI; MACPHERSON; RALSTON, 1996; HUNT; GOLDIN, 1992; MONCADA; HIGGS, 1993; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; RIANCHOet al., 1995).

Estas células classicamente são estimuladas quando expostas às endotoxinas bacterianas ou citocinas inflamatórias como a IL-1, TNF e IFNγ (GRABOWSKI; MACPHERSON; RALSTON, 1996; VAN'THOFF; RALSTON, 1997). Por outro lado, citocinas IL-4, IL-10, IL-13 e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) inibem a indução de iNOS em certos tipos de células (KNOWLES & MONCADA, 1994; NUSSLER & BILLIAR, 1993).

Como a meia vida do NO é da ordem de segundos, medições diretas do mesmo são difíceis, apesar de serem feitas com técnicas de quimioluminescência. Entretanto, o mais comum é avaliá-lo indiretamente medindo o acúmulo de nitrato (NO₃) e nitrito (NO₂⁻) no meio (Green et al, 1982). Diante disso, neste estudo foi utilizado o método colorimétrico de Griess para análises da concentração de nitrito no sobrenadante coletado, após a interação de células planctônicas ou biofilmes das amostras CL-6729 e SS-1274 com macrófagos J.774, como medição indireta da produção de NO.Não obtivemos alterações nos níveis de NO₂⁻ durante os ensaios com macrófagos J.774 nos tempos avaliados de interação com biofilmes ou células planctônicas quando comparado ao controle (DMEM + M ϕ) nas duas amostras. Contudo, após 24 horas observamos uma modulação negativa dos níveis de nitrito por biofilmes e células planctônicas de CL-6729. Esses dados apresentaram correlação com as dosagens obtidas para TNF- α e INF- γ (que induzem a produção de NO) após 24horas de interação dos macrófagos com biofilmes e células planctônicas, cujos resultados também

demonstraram uma modulação negativa, estatisticamente significativa, na síntese dessas citocinas. Entretanto, a produção deIFN- γ por macrófagos é controversa, considerando-se que classicamente esta citocina é característica de linfócitos T. Por outro lado, análises quanto ao estímulo pelo vírus da encefalomielite murina (HIMEDA et al., 2010),pela proteína maspina(WANG et al., 2007), e *Leishmania amazonensis*(SANTANAet al., 2017) já relataram a expressão de INF- γ por macrófagos. Neste estudo incluímos a análise de expressão desta citocina considerando a peculiaridade do modelo estudado (biofilmes), considerando-se também o número restrito de estudos disponíveis na literatura. Nossos dados sugerem que J.774 produza essa citocina que sofreu modulação negativa pelos modelos avaliados.

Em conjunto esses dados sugerem uma inibição da atividade dos macrófagos, justificando a hipótese de uma incapacidade dessas células em agir sobre biofilmes. Contudo, consideramos a necessidade de abordagens utilizando um maior número de metodologias que venham a permitir uma maior segurança para confirmação desses dados.

Apesar de não observarmos uma inibição na produção de NO após 2horas de interação entre macrófagos e biofilmes ou células planctônicas, obtivemos uma indução significativa da produção de IL-10, que está relacionada à inibição da indução de iNOS(LIEW, 1994).Já em relação a produção de IL-6, foi visto que após 2 horas de interação ocorreu uma indução positiva decorrente do estímulo tanto com biofilmes, quanto células plactônicas de CL-6729. Para amostra SS-1274, o aumento na produção de IL-6 foi decorrente apenas do estímulo determinado no ensaio com células bacterianas provenientes do cultivo planctônico.

Sendo assim, os resultados obtidos neste estudo sugerem que há uma resposta dos macrófagos às células planctônicas e biofilmes de *E. faecium*, com um perfil misto de citocinas.

A capacidade de interação entre biofilmes e macrófagos pode ser também evidenciada pelas análises em microscopia confocal de varredura a laser. Neste caso a interação entre biofilmes e macrófagos foi representada pela capacidade destas células se apresentarem tanto na superfície da biomassa aderida, quanto em seu interior, contradizendo, neste último caso, o paradigma correntemente exposto na literatura sobre a barreira física que os biofilmes supostamente representariam para as células do sistema imune (DONLAN; COSTERTON, 2002).

Os estudos dedicados à compreensão da persistência e da versatilidade dos biofilmes têm contado com auxílio de ferramentas de proteômica. A necessidade do conhecimento dos mecanismos que regem a heterogeneidade da expressão gênica entre células planctônicas e biofilmes, que acarretam fenótipos distintos entre si e capazes de responder de forma totalmente diferente às diversas condições, tem sido alvo de muitos estudos na área (FUX et al., 2005;GHIGO, 2003; PHILLIPS; BOGYO, 2005; SAUER et al., 2003).

Sabendo da importância de se elucidar as características expressas por células bacterianas em um biofilme, realizamos uma investigação inicial, através de espectrometria de massas ESI-Q-TOF das diferentes proteínas expressas pelas células, presentes nessas estruturas, em comparação às células planctônicas, quando cultivados por períodos de 24 horas. As análises revelaram que, nacondição de biofilme, as duas amostras apresentaram proteínas envolvidas em diferentes funções como: metabolismo de carboidratos, proteínas e ácidos nucléicos, enovelamento de proteínas, biossíntese de ácidos graxos, proteases, reações de oxirredução, síntese da parede celular e translocação de polipeptídeos. As análises em nosso estudo tiveram por objetivo uma investigação inicial e, portanto, foi proveniente de uma seleção de algumas regiões no gel de SDS-PAGE, que visualmente apontasse diferenças de intensidade entre bandas equivalentes (biofilmes *versus* planctônicas). A partir desta escolha aleatória foi possível identificar um maior número e diversidade de proteínas a partir dos perfis da amostra CL-6729. Porém, consideramos que, de forma cautelosa, os dados obtidos devam ser utilizados como suporte para avaliações futuras que empreguem metodologias quantitativas de espectrometria de massas.

De qualquer forma, é interessante registrar que o perfil protéico das células dos biofilmes, das duas amostras de *E. faecium* avaliadas,demonstrou a presença de proteínas relacionadas à divisão celular, metabolismo de carboidratos e de ácidos nucléicos. Este fato foi relativamente inesperado, pois conceitualmente biofilmes seriam estruturas que albergam células em um estado metabolicamente pouco ativo, similar a um perfil proteômico de células em estado estacionário do cultivo planctônico (DOMKA et al., 2007; HAMILTON et al., 2009). Contudo, seria necessário analisar quantitativamente essas proteínas, pois níveis basais de síntese podem estar sendo detectados através da técnica empregada. Além disso, células em diferentes estágios de crescimento, presentes nos diversos estratos da estrutura aderida, podem ter influenciado nesses resultados.

De acordo com Stoodley e colaboradores (2002), o modelo de desenvolvimento dos biofilmes compreende um ciclo de cinco estágios: planctônico, adesão, formação de microcolônias, maturação e dispersão. Durante os processos de desenvolvimento, há escassez nutricional e acúmulo de metabólitos, fazendo com que as células retornem ao estado planctônico (KARATAN; WATNICK, 2009). Logo, uma possível interpretação para nossos dados é que parte das células presentes nos biofilmes conservou a maquinaria metabólica para

prontamente reverter ao modo de células planctônicas. Nossa hipótese pode também ser respaldada pelos dados obtidos com a curva de formação dos biofilmes, que demonstrou que em 24 horas de formação os valores de DO, que mediram a biomassa, caíram vertiginosamente, possivelmente apontando para um momento de dispersão/destacamento. Entretanto, Resch e colaboradores (2006), em estudos de proteômica de biofilmes de *S. aureus*, sugeriram que as células podem se apresentar metabolicamente ativas nas fases tardias do desenvolvimento dessas estruturas, o que corroboraria nossos achados.

Já se sabe que as células dos biofilmes possuem uma alta tolerância ao estresse. Contudo, proteínas relacionadas ao estresse podem ser expressas diferentemente em biofilmes e em células planctônicas (STEWART;COSTERTON, 2002). Em nosso estudo, proteínas relacionadas ao estresse foram encontradas em ambas as condições. Nos biofilmes da amostra CL-6729 a chaperona DnaK, membro da família de proteínas Hsp70 (*heat shock protein* – 70) foi identificada. Esta desempenha um importante papel no controle da qualidade conformacional de proteínas e está envolvida em diferentes atividades como prevenção da agregação, enovelamento e desagregação (MARTÍNEZ-ALONSO et al., 2010). Alguns membros desta família são constitutivamente expressos; enquanto outros, são induzidos por vários fatores ambientais ou condições de crescimento (BREHMER et al., 2001). Existem, também, especulações sobre o papel dessas proteínas na adesão dos microrganismos, particularmente quando na forma extracelular. Esta afirmativa foi decorrente do estudo de Schaumburg e colaboradores (2004) que evidenciou a uma forte interação com plasminogênio, em experimentos de ressonância de plasma de superfície (SPR, do inglês surface plasmon resonance). A partir desses dados, os autores sugeriram que essas proteínas devam atuar também como receptores para o plasminogênio humano.

Outras proteínas de estresse celular foram identificadas em células planctônicas da amostra CL-6729, como as proteínas GroEL (pertencentes a família Hsp-60), identificada também nos biofilmes de SS-1274. A proteína GroEL é uma chaperona que age na maioria dos casos em um nível pós-tradução, no auxílio do enovelamento de alguns polipeptídeos e o fator *trigger*, uma abundante chaperona que se liga reversivelmente ao ribossomo interagindo com a cadeia polipeptídica nascente, cooperando, muitas vezes, com DnaK para o enovelamento (AGASHE et al. 2004; GEORGOPOULOS, 2006).

Em adição, encontramos em CL-6729 a proteína GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), a qual é uma enzima glicolítica responsável pela conversão de gliceraldeído 3-fosfato em 1,3 difosfoglicerato. Tem sido relatado que esta proteína em *Streptococcus suis* é uma proteína de superfície que medeia a aderência celular e desenvolve um importante papel

na infecção e invasão (BRASSARD et al., 2004; WANG; LU, 2007). O mesmo foi relatado para *S. pneumoniae* onde esta proteína parece estar envolvida na aderência a plasminogênio humano (MOREAU et al., 2017). Devido a sua variada função, estudos propuseram o uso de GAPDH para o desenvolvimento de vacinas contra *Edwardsiella tarda* (KAWAI et al., 2004; LIU et al., 2005), *S. pneumoniae* (JOMAA et al., 2005) e *Bacillus anthracis* (DELVECCHIO et al., 2006).

Além disso, proteínas como DnaK, GroEL, enolase e GAPDH estão entre as mais comuns proteínas *moonlighting*. Muitas proteínas possuem mais de uma função, além da função biológica principal.Este fenômeno é conhecido como *moonlighting*, onde proteínas conhecidas pela função metabólica ou chaperonas desempenham outras funções, muitas vezes envolvidas na virulência. Estas podem ser secretadas através de uma via desconhecida ou estarem envolvidas com aderência e modulação de processos de sinalização celular (HENDERSON; MARTIN, 2011; HENRY et al., 2015; JEFFERY, 2016; MAGUIRE; COATES; HENDERSON, 2002).

Nossos resultados também demonstraram proteínas envolvidas na síntese da parede celular em células dos biofilmes. Estes são justificáveis diantes de relatos similares como os divulgados por Resch e colaboradores (2006) que evidenciaram um aumento na expressão de proteínas que participam da síntese do peptideoglicano em biofilmes de *S. aureus*; e de Sanui e Gregory (2009), que demonstraram o aumento na expressão de proteínas que participam da via glicolíticanessas estruturas de*Streptococcus mutans*.De forma geral, nossos resultados indicaram que a amostra CL-6729, multirresistente e pertencente ao CC17, se mostrou mais especializada quanto aos processos envolvidos com a formação de biofilmes, apresentando uma maior versatilidade no perfil geral de expressão de proteínas, se comparada à amostra SS-1274.

Os dados obtidos através do genoma total da amostra CL-6729 trouxeram uma gama de informações quanto ao arsenal genético exibido por esse microrganismo. Entretanto, não foi possível, durante o tempo de elaboração deste estudo, realizar o sequenciamento do genoma da amostra SS-1274, impedindo comparações através do emprego desta metodologia. Também, até onde é de nosso conhecimento, ainda não se encontra disponível nos bancos de dados de domínio público o sequenciamento do genoma de SS-1274, para que pudéssemos utilizar para fins comparativos. Entretanto, Oana e colaboradores (2002), utilizando métodos de amplificação e sequenciamento parcial construíram um mapa do cromossomo de várias amostras de *E. faecium* incluindo SS-1274 (nomeada no artigo original como ATCC19434). Os autoresrelataram que, entre os resultados obtidos, foi evidenciado que o tamanho do cromossomo identificado foi

de cerca de 2,9 Mb. Diante disso, uma hipótese para a diferença encontrada seria a possibilidade de acúmulo de elementos genéticos na amostra clínica, responsável pelo maior número de características de virulência e de resistência aos antimicrobianos, como demonstrado nos resultados obtidos com as diferentes metodologias empregadas neste estudo. Entretanto, as análises comparativas de Oana e colaboradores demonstraram que o genoma desta espécie porde variar em cerca de 17% identificando entre as amostras avaliadas tamanhos que variaram de 2.550 kb a 2.995 kb. Dados mais recentes, utilizando WGS também apontam para uma considerável variação no tamanho do genoma entre amostras desta espécie com os seguintes resultados disponíveis na literatura: de 2,50 Mb a 3, 14 Mb no estudo de Qin et al. (2012), em uma análise comparativa de 21 genomas; 2,897 Mb, no estudo deMello et al. (2016); e2,697 Mb, segundo relato de Michielset al. (2016). De qualquer forma, consideramos que as diferenças entre as amostras analisadas neste estudo possam ser baseadas na variação de características apresentadas, que devem refletir o dinâmico processo evolutivo ao qual esses microrganismos têm sido submetidos.

Assim, consideramos que os resultados obtidos neste estudo apontam para a aquisição de atributos que certamente favoreceram o sucesso desse microrganismo na conquista do ambiente hospitalar. Entretanto, cabe destacar que de acordo comnossos dados, a habilidade de formar biofilmes se mostrou uma característica comum às amostras estudadas, não refletindo, portanto, uma vantagem adaptativa *per si*em grupos ou complexos clonais, que atingiram sucesso destacado na capacidade de adquirir genes de resistência e virulência. Porém, mesmo assim nossos resultados permitem sugerir que diferenças sutis, como maiores taxas de crescimento e de formação de biofilmes, uma provável maior rapidez de resposta e expressão de proteínas associadas às diferentes etapas do metabolismo, possam ter se somadoà aquisição cumulativa de genes extracromossômicos, provenientes de diversoselementos genéticos móveis, reunindo portanto, reais vantagens seletivas à sobrevivência e persistência no ambiente hospitalar.

Este estudo, que avaliou amostras de uma mesma espécie, porém representativas de condições de pressão seletiva completamente diferentes, tem a pretensão de fornecer subsídios para o entendimento da construção da diversidade de amostras bacterianas diferentes porém pertencentes a uma mesma espécie. Sem dúvida, podemos lançar mãos de várias hipóteses que, a partir dos resultados obtidos, seriam construídas dianteda existência de prováveis inúmeros eventos genéticos que vieram a proporcionar a estes microrganismos, que há poucas décadas atrás ainda eram considerados apenas como comensais, a especialização de grupos clonais, determinando a conquista de novos ambientes. Além disso, a capacidade de estimular ou até mesmo de não fazê-lo, dissimulando portanto a ação de células do sistema imune, como

demonstrado em ensaios com células planctônicas e biofilmes, sugerem que *E. faecium* se constitui em uma espécie cujas características intrínsecas facilitaram sua progressão ao status atual de patógeno hospitalar de alto risco.

Assim, consideramos que independente do estado de crescimento, planctônico ou biofilme, a compreensão dos mecanismos envolvidos na mudança de status de microrganismo comensal para patogênico faz-se necessária não somente através da identificação dos fatores de virulência e resistência aos antimicrobianos envolvidos, como também do esclarecimento quanto às vias integradas ao sistema imune do hospedeiro que estejam contribuindo para o seu estabelecimento. Neste sentido, os resultados obtidos neste estudo pretendem se somar a dados da literatura na busca do entendimento dos aspectos envolvidos na plasticidade genômica desses microrganismos, para que possam ser definidas eficazes estratégias de controle à sua progressão como patógeno humano.

CONCLUSÃO

Este estudo realizou uma análise comparativa de duas amostras pertencentes à espécie *E. faecium*, sendo uma amostra padrão e outra isolada de infecção urinária. Ambas foram caracterizadas, através de testes fenotípicos e moleculares e de acordo com a susceptibilidade aos antimicrobianos, SS-1274 apresentou-se sensível a diversos antimicrobianos e CL-6729 multirresistente.

O emprego de três técnicas de tipagem molecular – PFGE, MLVA e MLST – indicou que a amostra CL-6729 é relacionada ao CC17 um complexo clonal de distribuição global.

Polimorfismos associados ao elemento Tn1546, particularmente relacionados à presença de IS19 no genevanS, sugeriram ser a causa da mudança de comportamento para expressão da resistência à vancomicina, de induzido para constitutivo.Alterações na expressão da resistência à vancomicina podem vir a representar uma estratégia evolutiva para uma via de resistência que utilize um mecanismo que independe da presença da droga.

Como não foi possível determinar o mecanismo responsável pela expressão constitutiva da resistência à vancomicina, consideramos a hipótese da manutenção de uma via de fosforilação ativa sem a necessidade de uma ativação inicial de uma proteína sensora de superfície. A fosforilação de uma proteína intracelular atuante na desrepressão dos genes envolvidos na resistência representaria um menor gasto energético, pela possibilidade do uso compartilhado de fosfatasesrelacionadas ao metabolismo celular, o que poderia vir a indicar uma estratégia de otimizaçãoda resistência à vancomicina em *E. faecium*.

As amostras CL-6729 e SS-1274 apesar de terem apresentado valores distintos na quantificação de biofilmes, determinaram um comportamento semelhante identificado pelo perfil da curva de formação dessas estruturas. Porém, os resultados desses ensaios também permitiram sugerir que SS-1274 possuiu uma taxa de formação de biofilme mais lenta, em relação à amostra CL-6729. Este fato sugere queapesar da capacidade de formação de biofilmes ter se mostrado uma característica comum, se associarmos aos demais dados de virulência (presença de adesinas evidenciada por metodologias de PCR e de WGS), conclui-se que CL-6729 provavelmente alberga uma "bagagem"adicional para formação dessas estruturas, que pode ter influência em uma maior eficiência de formação. Este fato também poderia contribuir parauma maior capacidade de persistência no hospedeiro e no ambiente hospitalar.

Análises de interação com macrófagos da linhagem J.774 demonstraram que estas células são capazes de interagir com biofilmes de *E. faecium*. Mais especificamente, demonstraram que biofilmes e células planctônicas de ambas as amostras incluídas neste

estudo foram capazes de modular a atividade de macrófagos. Contudo concluímos que são necessários estudos futuros para investigar a efetividade da ação fagocítica frente a biofilmes de *E. faecium*, assim como determinar quais os processos celulares estariam envolvidos.

De forma geral, a análise por espectrometria de massas foi capaz de demonstrar parte do universo de proteínas presentes em ambas as amostras de *E. faecium*a partir de bandas selecionadas de ensaios por SDS-PAGE. Os dados obtidos foram capazes de revelar e alertar para uma gama de proteínas que podem estar envolvidas em diferentes funções celulares, mesmo aquelas com uma função inicialmente metabólica, como as proteínas *moonlighting*encontradas. Entretanto, consideramos a necessidade do emprego de técnicas com abordagens quantitativas, que possibilitem o uso de ensaios*off*-gel, para que conclusões mais definitivas possam ser traçadas, frente as prováveis variações entre amostras distintas e diferentes condições de crescimento.

O sequenciamento do genoma da amostra CL-6729, revelou um conteúdo pleno de determinantesjá bem relatados como responsáveis pela expressão de fatores envolvidos na resistência aos antimicrobianos e na virulência, incluindo formação de biofilmes. A presença de elementos genéticos transferíveis, sequências de inserção e profagos oriundos de espécies e gêneros bacterianos diversos, indicam uma destacada intensidade de trocas genéticas, que certamente demandam eventos recombinação, sugerindo um processo evolutivo especialmente dinâmico.

Este estudo demonstrou a versatilidade genética de *E. faecium*em uma análise comparativa entre amostras isoladas em momentos históricos distintos, considerando-se a pressão seletiva determinada pelos antimicrobianos. O maior acúmulo de características de virulência e resistênciae a presença considerável de elementos genéticos transferíveis, como evidenciado em CL-6729, certamente tem influência diretana escalada desta espécie bacteriana do anonimato comensal para o protagonismo nos quadros infecciosos, particularmente osde origem hospitalar. Ressaltamos que este estudo alerta para a evidenciação de que o caminho evolutivo deste patógeno oportunista para um patógeno de alto risco, como vem sendo traçado em diversos outros países, também é evidente em nosso meio. Assim, é fundamental o acompanhamento contínuo dessas amostras visando identificar o pronto surgimento de novos atributos, para que seja possível atuar no seu controle.

REFERÊNCIAS

ABELE-HORN, M.et al. Molecular epidemiology of hospital-acquired vancomycin-resistant *Enterococci. J. Clin. Microbiol.*, v. 44, p. 4009-4013, 2006.

ABRIOUEL, H. et al. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 123, n. 1-2, p. 38-49, 2008.

AGASHE, V.R. et al. Function of trigger factor and DnaK in multidomain protein folding: increase in yield at the expense of folding speed. *Cell*, v. 117, p. 199-209, 2004.

AGUDELO HIGUITA, N.I; HUYCKE, M.M. Enterococcaldisease, epidemiology, and implications for treatment., In: GILMORE, M.S. et al. (Ed). Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary. 2014.

AKPAKA, P.E. et al. Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from Bermuda. *PLoS One.*,v. 12, n. 3, p. e0171317, 2017.

AKTÜRK, Het al. Results of four-year rectal vancomycin-resistant enterococci surveillance in a pediatric hematology-oncology ward: from colonization to infection. *Turk. J. Haematol.*, v. 33, n. 3, p. 244-247, 2016.

ALBUQUERQUE, V.S. *Enterococcus* resistentes a níveis elevados de gentamicina (HLGR): caracterização fenotípica, detecção de genes de resistência e diversidade genética. (dissertação). Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 2001.

ALDRED, K.J.; KERNS, R.J.; OSHEROFF, N. Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry*, v. 53, p. 1565-1574, 2014.

ALOTAIBI, F.E.; BUKHARI, E.E. Emergence of vancomycin-resistant enterococci at a teaching hospital, Saudi Arabia. *Chin. Med. J.*,v. 130, n. 3, p.340-346, 2017.

ANDERSON, G.G.; O'TOLLE, G.A. Innate and inducet resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr. Top. Microbiol.Immunol.*, v. 322, p. 85-105,2008.

ARABESTANI, M. R.; NASAJ, M.; MOUSAVI, S. M. Correlation between Infective Factors and Antibiotic Resistance in Enterococci Clinical Isolates in West of Iran. *Chonnam Med J.*, 53(1): 56-63. Jan. 2017.

ARIAS, C.A.; MURRAY, B.E. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 10, p. 266-78, 2012.

ARTHUR, M.et al. Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptideoglycan precursors in Enterococcus faecium BM4147. J Bacteriol, 175:117-127. 1993.

ARTHUR, M. et al. The VanS sensor negatively controls VanR-mediated transcriptional activation of glycopeptide resistance genes of Tn*1546* and related elements in the absence of induction. *J. Bacteriol.*, v. 179, p. 97-106, 1997.

ARTHUR, M.; DEPARDIEU F.; COURVALIN P. Regulated interactions between partner and non-partner sensors and responses regulators that control glycopeptide resistance gene expression in enterococci.*Microbiology*, v. 145, p. 1849-1858, 1999.

ARTHUR, M.; MOLINAS, C.; COURVALIN, P. The VanS-VanR two-component regulatory system controls synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *J. Bacteriol.*,v. 174, p. 2582-2591, 1992.

ARTHUR, M.; QUINTILLIANI, R. J. R. Regulation of VanA- and VanB-type glycopeptide resistance in *Enterococci. Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 45, p. 375-38,2001.

ARTHUR, M.; REYNOLDS P.; COURVALIN, P. Glycopeptide resistance in enterococci. *Trends Microbiol.*, v. 4, p. 401-407, 1996.

ASLANGUL, E. et al. Relationship between the level of acquired resistance to gentamicin and synergism with amoxicillin in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob*. *Agents Chemother.*, v.49, p. 4144-4148, 2005.

AUBERT, D.; NAAS, T.; NORDMANN, P. IS1999 increases expression of the extendedspectrum beta-lactamase VEB-1 in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol., v. 185, n. 17, p. 5314-5319, 2003.

AZEVEDO, A.S. et al. Impact of polymicrobial biofilms in catheter-associated urinary tract infections. *Crit Rev Microbiol.*,v. 30, p. 1-17, 2016.

AZIZ, R. K.et al. Mosaic prophages with horizontally acquired genes account for the emergence and diversification of the globally disseminated M1T1 clone of *Streptococcus pyogenes*. J. Bacteriol., v. 187, p. 3311-3318,2005.

AZIZ, R.K.et al. Post-proteomic identification of a novel phage-encoded streptodornase, Sda1, in invasive M1T1 *Streptococcus pyogenes*. *Mol. Microbiol.*,v. 54, p. 184-197,2004.

BALDASSARRI, L. et al. Glycosaminoglycans mediate invasion and survival of *Enterococcus faecalis* into macrophages. *J. Infect. Dis.*, v. 191, p. 1253-1262, 2005.

BALDASSARRI, L. et al. *Enterococcus* spp. produces slime and survives in rat peritoneal macrophages. *Med. Microbiol. Immunol.*, v. 190, n. 3, p. 113-120, 2001.

BANKS, D.J.; LEI B.; MUSSER J.M. Prophage induction and expression of prophageencoded virulence factors in group A *Streptococcus* serotype M3 strain MGAS315. *Infect. Immun.*, v. 71, p. 7079-7086, 2003.

BAO, Y. et al. Pfs promotes autolysis-dependent release of eDNA and biofilm formation in *Staphylococcus aureus. Med. Microbiol. Immunol.*, v. 204, n. 2, p. 215-226, 2015.

BAPTISTA, M. et al. Mutations leading to increased levels of resistance to glycopeptides antibiotics in VanB-type enterococci. *Mol. Microbiol.*, 25:93-105, 1997.

BARBOSA-RIBEIRO, M. et al. Antimicrobial susceptibility and characterization of virulence genes of *Enterococcus faecalis*isolates from teeth with failure of the endodontic treatment. *J.Endod.*, v. 42, n. 7, p. 1022-1028, 2016.

BAYLAN, O.et al. The relationship between antibiotic resistance and virulence factors in urinary *Enterococcus* isolates. *Mikrobiyol. Bul.*, v. 45, p. 430-445,2011.

BERNE, C. et al. Adhesins involved in attachment to abiotic surfaces by Gram-negative bacteria. *Microbiol. Spectr.*, v. 3, n. 4, doi:10.1128/microbiolspec.MB-0018-2015, 2015.

BERNE, C.; KYSELA, D.T.; BRUN, Y.V. A bacterial extracellular DNA inhibits settling of motile progeny cells within a biofilm. *Mol. Microbiol.*,v. 77, n. 4, p. 815-29, 2010.

BHARDWAJ, S.B. et al. Biofilm formation by drug resistant enterococci isolates obtained from chronic periodontitis patients. *J. Clin. Diagn. Res.*, v. 11, n. 1, p. DC01-DC03, 2017.

BIAVASCO, F. et al. VanA-type enterococci from humans, animals, and food: species, distribution, population structure, Tn*1546* typing and location, and virulence determinants. *Appl. Environm.Microbiol.*,v. 73, p. 3307-3319, 2007.

BILLSTRÖM, H.; SULLIVAN, A.; LUND, B. Cross-transmission of clinical *Enterococcus faecium* in relation to *esp* and antibiotic resistance. *J. Appl. Microbiol.*, v. 105, n. 6, p. 2115-2122, 2008.

BONORA, M.G. et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates causing hospital outbreaks in northern Italy belong to the multilocus sequence typing C1 lineage. *Microb. Drug Resist.*, v. 10, n. 2, p.114-123, 2004.

BONORA, M.G.et al. Phylogenetic analysis of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* genotypes associated with outbreaks or sporadic infections in Italy. *Microb. Drug Resist.*, v.13, n. 3, p. 171-177, 2007.

BOOTH, S.C. et al. Differences in metabolism between the biofilm and planktonic response to metal stress. *J.Proteome Res.*,v. 10, p. 3190-3199,2011.

BOUDJEMAA, R. et al. Newinsight into daptomycin bioavailability and localization in *Staphylococcus aureus*biofilms by dynamic fluorescence imaging. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 60, n. 8, p. 4983-4990, 2016.

BOYD, D.A. et al.Molecular characterization of the *vanD* gene cluster and a novel insertion element in a vancomycin-resistant *Enterococcus* isolated in Canada. *J. Clin. Microbiol.*, v. 38, n. 6, p. 2392-2394, 2000.

BRAGA, T.T.; AGUDELO, J.S.; CAMARA, N.O. Macrophages during the fibrotic process: M2 as friend and foe. *Front.Immunol.*, v. 6, p. 602,2015.

BREDE, D.A. et al. Complete genome sequence of the commensal *Enterococcus faecalis* 62, isolated from a healthy Norwegian infant. *J. Bacteriol.*, v.193, n. 9, p. 2377,2011.

BREHMER, D. et al. Tuning of chaperone activity of Hsp70 proteins by modulation of nucleotide exchange. *Nat. Struct. Biol.*, v.8, p. 427-432, 2001.

BREINES, D.M. et al. Quinolone resistance locus *nfxD* of *Escherichia coli* is a mutant allele of *parE* gene encoding a subunit of topoisomerase IV. *Antimicrob. Agents Chemother.*,v. 41, p. 175-179, 1997.

BRIANDET, R.; HERRY, J.; BELLON-FONTAINE, M. Determination of the van der Waals, electron donor and electron acceptor surface tension components of static Gram-positive microbial biofilms. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, v. 21, n. 4, p. 299-310,2001.

BROWN, A.R.; TOWNSLEY, A.C.; AMYES, S.G.B. Diversity of Tn1546 elements in clinical isolates of glycopeptide-resistant enterococci from Scottish hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 45, p. 1309-1311,2001.

BRÜSSOW, H.; DESIERE, F. Comparative phage genomics and the evolution of Siphoviridae: insights from dairy phages. *Mol. Microbiol.*, v.39, n. 2, p. 213-222, 2001.

BRYSON, K.et al. Protein structure prediction servers at University College London. *Nucleic Acids Res.*, v. 33, p. W36-38,2005.

BUIJSSEN, K.J. et al. Influence of surface roughness on silicone rubber voice prostheses on in vitro biofilm formation and clinical lifetime in laryngectomised patients. *Clin. Otolaryngol.*,doi: 10.1111/coa.12856 25, 2017.

CABALLERO GÓMEZ, N. et al. Comparative proteomic analysis of *Listeria monocytogenes* exposed to enterocin AS-48 in planktonic and sessile states. *Int. J. Food Microbiol.*,v. 167, n. 2, p. 202-207, 2013.

CABRAL, M.P. et al. Proteomic and functional analyses reveal a unique lifestyle for*Acinetobacter baumannii*biofilms and a key role for histidine metabolism. *J. Proteome Res.*, v. 10, p. 3399-3417, 2011.

CAMARGO, I.L. et al. Identification of an unusual VanA element in glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* in Brazil following international transfer of a bone marrow transplant patient. *Can. J. Microbiol.*, v. 50, n. 9, p. 767-770, 2004.

CARIAS, L.L. et al.Genetic linkage and cotransfer of a novel, *vanB*-containing transposon (Tn5382) and a low-affinity penicillin-binding protein 5 gene in a clinical vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolate. *J. Bacteriol.*, v. 180, n. 17, p. 4426-4434, 1998.

CASTRO, S.A. et al. *Porphyromonas gingivalis* gingipains cause defective macrophage migration towards apoptotic cells and inhibit phagocytosis of primary apoptotic neutrophils. *Cell Death Dis.*, v. 8, n. 3, p. e2644, 2017.

CATTANEO C. et al. Recent increase in enterococci, viridans streptococci, *Pseudomonas* spp. and multiresistant strains among haematological patients, with a negative impact on

outcome. Results of a 3-year surveillance study at a single institution. *Scand. J. Infect. Dis.*, v. 42, p. 324-332, 2010.

CATTOIR, V.; GIARD, J. C. Antibiotic resistance in *Enterococcus faecium* clinical isolates. *Expert Rev. Anti Infect.Ther.*, v. 12, n. 2, p. 239-248, 2014.

CATTOIR, V.; LECLERCQ, L. Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: is it time to divorce?*J. Antimicrob.Chemother.*, v. 68, p. 731-742,2013.

CELIK, S.; CAKIRLAR, F.K.; TORUN, M.M. Presence of vancomycin, aminoglycosides, and erythromycin resistance genes in enterococci isolated from clinical samples in Turkey. *Clin. Lab.*, v. 60, n. 11, p. 1801-1806,2014.

CERCENADO, E. *Enterococcus*: phenotype and genotype resistance and epidemiology in Spain. *Enferm. Infect. Microbiol.Clin.*,v. 29 (Suppl 5), p. 59-65,2011.

CHA, J.O. et al. Comparison of genetic epidemiology of vancomycinresistant*Enterococcus faecium* isolates from human andpoultry. *J. Med. Microbiol.*, v. 61, p. 1121-1128, 2012.

CHA, J.O. et al. Diversity of Tn1546 in vanA-positive Enterococcus faecium clinical isolates with VanA, VanB, and VanD phenotypes and susceptibility to vancomycin. J. Appl. Microbiol., v.15, n. 4, p. 969-976, 2013.

CHANG, C.M.et al. Characterisation of vancomycin-resistant enterococci from hospitalised patients at a tertiary centre over a seven-year period. *J. Hosp. Infect.*,v. 74, n. 4, p. 377-384,2010.

CHÁVEZ-GALÁN, L. et al. Much more than M1 and M2 macrophages, there are also CD169(+) and TCR(+) macrophages. *Front. Immunol.*,v. 6, p. 263, 2015.

CHENG, S. et al. Complete genome sequence of a new *Enterococcus faecalis*bacteriophage, vB_EfaS_IME197. *Genome Announc.*,v. 4, n. 5, p. e00827-16, 2016.

CHOI, H.J.et al. Loss of vancomycin resistance not completely dependent on the Tn1546 element in *Enterococcus faecium* isolates.*Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v.69, n. 1, p. 105-10, 2011.

CHOTIPRASITSAKUL, D. et al. Epidemiology and control of the first reported vancomycin resistant *Enterococcus* Outbreak at a tertiary-care hospital in Bangkok, Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.*, v. 47, n. 3, p. 494-502, 2016.

CHOU, Y.Y.et al. Vancomycin-resistant enterococcal bacteremia: comparison of clinical features and outcome between *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *J. Microbiol. Immunol.Infect.*, v. 41, p. 124-129, 2008.

CHOW, J.W. Aminoglycoside resistance in enterococci. *Clin. Infect. Dis.*,v. 31, p. 586-589, 2000. CHUA, S.L. et al. Selective labelling and eradication of antibiotic-tolerant bacterial populations in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nat. Commun.*,v. 7, p. 10750, 2016.

CILO, B.D. et al. *Investigation* of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* outbreak in neonatal intensive care unit. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, v. 7, n. 12, p. 5342-5347, 2014.

CLARK, N.C.et al. Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from U.S. hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 37, p. 2311-2317,1993.

CLARK, P.F.; CLARK, A.S. A bacteriophage active against a virulent hemolytic *Streptococcus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 24, n. 7, p. 635-639, 1927.

CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard – Tenth Edition. Clinical Laboratory Standards Institute Document M07-A10. Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 3:29-30. 2015.

CLSI. Perfomance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. Clinical Laboratory Standards Institute Document M100-25, West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2:72-75. 2015

COMALADA, M. et al. Arginine and macrophage activation. *Methods Mol. Biol.*, v. 844, p. 223-235, 2012.

COQUE, T.M. et al. High occurrence of esp among ampicillin-resistant and vancomycinsusceptible *Enterococcus faecium* clones from hospitalized patients. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 50, p. 1035-1038, 2002.

CORREA, A.A. et al. Small hospitals matter: insights from the emergence and spread ofvancomycin-resistant enterococci in 2 public hospitals in inner Brazil. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 82, n. 3, p. 227-233, 2015.

COSTA, M.K.M. Caracterização fenotípica e molecular de amostras de *Enterococcus* spp. isoladas em hospitais da cidade do Natal/RN. [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 2012.

COSTERTON, J.W. et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.*, v. 41, p. 435-464, 1987.

COURVALIN, P. Vancomycin resistance in Gram-positive cocci. *Clin. Infect. Dis.*, v. 42, p. 25-34, 2006.

COUTO, I. et al. Development of methicillin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus sciuri* by transcriptional activation of the mecA homologue native to species. *J. Bacteriol.*, v. 185, n. 2, p. 645-653, 2003.

CRETI, R.et al. Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. *J. Med. Microbiol.*, v. 53, p. 13-20, 2004.

DA SILVA, L.P. et al.Genetic features and molecular epidemiology of *Enterococcus faecium* isolated in two university hospitals in Brazil. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*,v. 74, n. 3, p. 267-271, 2012.

DARINI, A.L. et al. Disruption of *vanS* by IS1216V in a clinical isolate of *Enterococcus faecium* with VanA glycopeptide resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 43, n. 4, p. 995-996, 1999.

DAVEY, M.E.; O'TOOLE, G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics.*Microbiol.Mol. Biol. Rev.*, v. 64, n. 4, p. 847-867, 2000.

DAVIES, L.C; TAYLOR, P.R. Tissue-resident macrophages: then and now. *Immunology*,v. 144, n. 4, p. 541-548, 2015.

DAW, K.et al. Biofilm and planktonic *Enterococcus faecalis* elicit different responses from host phagocytes in vitro. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*,v. 65, n. 2, p. 270-282,2012.

D'AZEVEDO, P.A.; DIAS, C.A.; TEIXEIRA, L.M. Genetic diversity and antimicrobial resistance of enterococcal isolates from Southern region of Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 48, n. 1, p. 11-16,2006.

DE ANGELIS, M. Comparative proteomic analysis of biofilm and planktonic cells of *Lactobacillus plantarum* DB200. *Proteomics*, v. 15, n. 13, p. 2244-2257, 2015.

DE BEEN, M. et al. Core genome multilocus sequence typing scheme for high-resolution typing of *Enterococcus faecium*. J. Clin. Microbiol., v. 53, n. 12, p. 3788-3797, 2015.

DE BEEN, M. et al. Recent recombination events in the core genome are associated with adaptive evolution in *Enterococcus faecium*. *Genome Biol. Evol.*, v. 5, n. 8, p. 1524-1535, 2013.

DE MELLO, S.S. High-quality draft genome sequence of the multidrug-resistant clinical isolate*Enterococcus faecium*VRE16. *Genome Announc.*,v. 4, n. 5, p. e00992-16, 2016.

DE MULDER, T. et al. Exploring the methanogen and bacterial communities of rumen environments: solid adherent, fluid and epimural. *FEMS Microbiol Ecol.*,doi:10.1093/femsec/fiw251, 2016.

DELCARU, C. et al. Microbial biofilms in urinary tract infections and prostatitis: etiology, pathogenicity, and combating strategies. *Pathogens*, v. 5, n. 4, p. 65, 2016.

DEMUYSER, L.; JABRA-RIZK, M.A.; VAN DIJCK, P. Microbial cell surface proteins and secreted metabolites involved in multispecies biofilms. *Pathog. Dis.*,v. 70, n. 3, p. 219-230, 2014.

DEPARDIEU F. et al. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 20, p. 79-114, 2007.

DEPARDIEU, F.; COURVALIN, P.; KOLB, A. Binding sites of VanRB and sigma70 RNA polymerase in the *vanB* vancomycin resistance operon of *Enterococcus faecium* BM4524. *Mol. Microbiol.*, v. 57, p. 550-564, 2005.

DEPARDIEU, F.; REYNOLDS, P. E.; COURVALIN, P. VanD-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* 10/96A. *Antimicrob Agents Chemother.*, v. 47, n. 1, p. 7-18, 2003.

DE SANTANA, F. R. et al. High dilutions of antimony modulate cytokines production and macrophage - Leishmania (L.) amazonensis interaction in vitro. *Cytokine*. 92:33-47. Apr. 2017.

DESHPANDE, L.M. et al. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from North America and Europe: a report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*,v. 58, n. 2, p. 163-70, 2007.

DI ROSA, R. et al. Relationship between biofilm formation, the enterococcal surface protein (Esp) and gelatinase in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *FEMS Microbiol Lett.*, v. 256, p. 145-50, 2006.

DIEP, B.A. et al. Compleate genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-aquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Lancet 367, 731–739. 2006.

DING, A.H.; NATHAN, C F.; STUEHR, D.J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.*, v. 141, n. 7, p. 2407-2412, 1988.

DJURIC, O. et al. Antimicrobial resistance of selected invasive bacteria in a tertiary care center:results of a prospective surveillance study. *J. Infect. Dev. Ctries.*, v. 10, n. 12, p. 1325-1331, 2016.

DOMKA, J.et al. Temporal gene expression in *Escherichiacoli* K-12 biofilms. *Environ. Microbiol.*, v.9, p. 332-346, 2007.

DONABEDIAN, S. et al. PCR fragment length polymorphism analysis of vancomycinresistant *Enterococcus faecium.J. Clin .Microbiol.*, v. 38, p. 2885-2888, 2000.

DONLAN, R.M. Biofilm elimination on intravascular catheters: importantconsiderations for the infectious disease practitioner. *Clin. Infect.Dis.*, v. 52, n. 8, p. 1038-1045, 2011.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 15, p. 167-193, 2002.

DRLICA, K. et al. Quinolones: action and resistance updated. *Curr. Top. Med. Chem.*, v. 9, p. 981-998, 2009.

DUNNE Jr, W.M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 15, p. 155-166, 2002.

DUPRÈ, I.et al. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates colleted in Sardinia (Italy). *J. Med. Microbiol.*, v. 52, p. 491-498, 2003.

EARSS-NET. European Antimicrobial Resistance Surveillance Network. [acesso em 2016 Set 7]. Disponível em http://www.earss.rivm.nl.

ECKERT, C. et al. Functional analysis of AtlA, the major N-acetylglucosaminidase of *Enterococcus faecalis*. J. Bacteriol., v. 188, p. 8513-8519, 2006.

EDWARDS, J.P. et al. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J. Leukoc. Biol.*, v. 80, p. 1298-1307, 2006.

EDWARDS, J.R. et al. National Healthcare Safety Network (NHSN) report: Data summary for 2006 through 2008. *Am. J. Infect. Control*, v. 37, p.783-805, 2009.

EMANEINI, M. et al. Prevalence of high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in an Iranian hospital. *J. Prev. Med. Hyg.*, v. 57, n. 4, p. E197-E200, 2016.

EVANS, A. C. The prevalence of *Streptococcus* bacteriophage. *Science*, v. 80, n. 2063, p. 40-41, 1934.

EVERS, S.; COURVALIN, P. Regulation of VanB-type vancomycin resistance gene expression by the VanSB-VanRB two-component regulatory system in *Enterococcusfaecalis* V583.*J. Bacteriol.*, v. 178, p. 1302-1309, 1996.

FACKLAM, R.R.; CARVALHO, M.G.S.; TEIXERA, L.M. History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of enterococci. In: GILMORE, M.S. et al (Ed) The Enterococci. pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance. ASM Press, Washington, DC. P. 1-54. 2002.

FAKIH, M G. et al. Definitional change in NHSN CAUTI was associated with an increase in CLABSI events: evaluation of a large health system. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, v. 23, p. 1-5,2017.

FALLICO, L.et al. Molecular epidemiology of *Enterococcus faecium* isolates from an Italian hospital. *Infection*, v. 39, n. 2, p. 127-33, 2011.

FANG, F.C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 2, n. 10, p. 820-832, 2004.

FEIL, E.J, et al. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J. Bacteriol.*,v. 186, p. 1518-1530, 2004.

FERGUSON, D.M. et al. Virulence Genes among *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*isolated from coastal beaches and human and nonhuman sources in southern California and Puerto Rico. *J. Pathog.*,v.2016, p. 3437214. 2016.

FERNÁNDEZ, L. et al. Downregulation of autolysin-encoding genes by phage-derived lytic proteins inhibits biofilm formation in *Staphylococcusaureus*. *Antimicrob*. *Agents Chemother*.,doi: 10.1128/AAC.02724-16, 2017.

FILIPOVÁ M.; BUJDÁKOVÁ H. Factors of virulence and mechanisms of resistance to aminoglycosides in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* with high-level gentamicin resistance. *Epidemiol. Mikrobiol.Imunol.*, v. 54, p. 65-74, 2005.

FLETCHER M. The physiological activity of bacteria attached to solid surfaces. *Adv. Microb. Physiol.*, v.32, p. 53-85,1991.

FOGLIA, G. et al. Molecular analysis of *Tn1546-like* elements mediating high-level vancomycin resistance in *Enterococcus gallinarum*. *J. Antimicrob. Chemother.*,v. 52, p. 772-775, 2003.

FOLSTER, J. P. et al Characterization of Resistance Genes and Plasmids from Outbreaks and Illness Clusters Caused by Salmonella Resistant to Ceftriaxone in the United States, 2011-2012. Microb Drug Resist, 23(2):188-193. Mar. 2017.

FONG, J.; YILDIZ, F.H. Biofilm matrix proteins. *Microbiol.Spectr.*, v.3, n. 2, doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0004-2014, 2015.

FONTANA, R. et al. Intrinsic penicillin resistance in enterococci. *Microb. Drug Resist.*, v. 2, p. 209-213, 1996.

FREITAS, A.R. et al. Dispersion of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* isolates belonging to major clonal complexes in different Portuguese settings. *Appl Environ Microbiol.*, v.75, p. 4904-4908. 2009.

FREITAS, A.R. et al. Microevolutionary events involving narrow host plasmids influences local fixation of vancomycin-resistance in *Enterococcus* populations. *PLoS One*, v. 8, n.3, p. e60589, 2013.

FREITAS, A.R. et al. Multilevel population genetic analysis of *vanA* and *vanBEnterococcus faecium* causing nosocomial outbreaks in 27 countries (1986-2012). J. Antimicrob. Chemother., v. 71, n. 12, p. 3351-3366, 2016.

FUX, C.A. et al. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.*,v. 13, p. 34-40. 2005.

GALLOWAY-PEÑA, J.R. et al. Diversity of the *fsr-gelE*region of the *Enterococcusfaecalis* genome but conservation in strains with partial deletions of the *fsr* operon. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 77, n. 2, p. 442-451, 2011.

GALLOWAY-PEÑA, J.R. et al. Genomic and SNP analyses demonstrate a distant separation of the hospital and community-associated clades of *Enterococcusfaecium*. *PLoS One*, v. 7, p. e30187, 2012.

GALLOWAY-PEÑA, J.R.et al. Analysis of clonality and antibiotic resistance among early clinical isolates of *Enterococcus faecium* in the United States. *J. Infect. Dis.*,v. 200, p. 1566-73, 2009.

GARCÍA-SOLACHE, M. et al. Homologous recombination within large chromosomal regions facilitates acquisition of β -Lactam and vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.*,v. 60, n. 10, p.5777-5786, 2016.

GARRISON, A.T. et al. Structure-activity relationships of a diverse class of halogenated phenazines that targets persistent, antibiotic-tolerant bacterial biofilms and *Mycobacterium tuberculosis. J. Med. Chem.*, v. 59, n. 8, p 3808-3825, 2016.

GAWRYSZEWSKA, I. et al. Distribution of antimicrobial resistance determinants, virulenceassociated factors and CRISPR loci in isolates of *Enterococcus faecalis* from various settings and genetic lineages. *Pathog. Dis.*, v. 75, n. 2, 2017.

GEORGOPOULOS, C. Toothpicks, serendipity and the emergence of the *Escherichia coli*DnaK (Hsp70) and GroEL (Hsp60) chaperone machines. *Genetics*,v. 174, p. 1699-1707, 2006.

GHIGO, J.M. Are there biofilm-specific physiological pathways beyond a reasonable doubt?.*Res. Microbiol.*, v. 154, p. 1-8, 2003.

GINHOUX, F.; JUNG, S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 14, n. 6, p. 392-404, 2014.

GOLLER, C.C.; ROMEO, T. Environmental influences in biofilm development. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, v. 322, p. 37-66, 2008.

GOMES, B.C. et al. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. *Food Microbiol.*,v. 25, p.668-675, 2008.

GONZALEZ-MEJIA, M.E.; DOSEFF, A. I. Regulation of monocytes and macrophages cell fate. *Front. Biosci.*, v. 14, p., 2413-2431, 2009.

GOODMAN, A.E.; MARSHALL, K.C. Genetic responses of bacteria at surfaces, In:COSTERTON, J.W.;LAPPIN-SCOTT, H.M. (Ed.), Microbial biofilms, Cambridge University Press, Cambridge, UK, p. 80-98. 1995.

GRABOWSKI, P.S.; MACPHERSON, H.; RALSTON, S.H. Nitric-oxide production incells derived from the human joint. *Br. J. Rheumatol.*, v.35, p.207-212, 1996.

GRADY, R. E.; HAYES, F. Axe-Txe, a broad-spectrum protein toxin–antitoxin system specified by a multidrug-resistant, clinical isolate of *Enterococcus faecium*. Mol. Microbiol. 47, 1419–1432. 2003.

GRADY, E.N. et al. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microb*. *Cell Fact.*, v. 15, p. 203, 2016.

GRAHAM, J.P.et al. Antibiotic resistant enterococciand staphylococci isolated from flies collectednear confined poultry feeding operations.*Sci. Total Environm.*, v. 407, p. 2701-2710, 2009.

GREEN, L.C.et al. Analyses of nitrate, nitrite and [15N]nitrate in biological fluids.*Anal. Biochem.*, v.126, p. 131-138, 1982.

GRÖBNER, S. et al.Lysozyme activates *Enterococcus faecium* to induce necrotic cell death in macrophages. *Cell Mol. Life Sci.*,v. 67, n. 19, p. 3331-3344, 2010.

GU, L. et al. A new Tn1546 type of VanB phenotype–vanA genotype vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates in mainland China. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*,v. 63, p. 70-75, 2009.

GUARDABASSI, L. et al. Glycopeptide resistance *vanA* operons in *Paenibacillus* strains isolated from soil.*Antimicrob. Agents Chemother.*, v.49, n. 10, p. 4227-4233,2005.

GUITON, P.S. et al. Enterococcal biofilm formation and virulence in an optimized murine model of foreign body-associated urinary tract infections. *Infect. Immun.*, v. 78, n. 10, p. 4166-4175, 2010.

GUITON, P.S.et al. Contribution of autolysin and sortase A during *Enterococcus faecalis* DNA-dependent biofilm development. *Infect. Immun.*, v. 77, p. 3626-3638,2009.

GULHAN, T. et al. Characterization of *Enterococcus faecalis* isolates originating from different sources for their virulence factors and genes, antibiotic resistance patterns, genotypes and biofilm production. *Iran J. Vet. Res.*, v. 16, n. 3, p. 261-266, 2015.

GUZMAN PRIETO, A.M. et al. Global emergence and dissemination of enterococci as nosocomial pathogens: attack of the clones? *Front.Microbiol.*, v.26, n.7, p. 788, 2016. HALDIMANN, A. et al. Transcriptional regulation of the *Enterococcus faecium* BM4147 vancomycin resistance gene cluster by the VanS-VanR two-component regulatory system in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, v. 179, n. 18, p. 5903-5913, 1997.

HALL, M.R.; McGILLICUDDY, E.; KAPLAN, L.J. Biofilm: basic principles, pathophysiology, and implications for clinicians. *Surg. Infect. (Larchmt)*, v. 15, n. 1, p. 1-7, 2014.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 2, n. 2, p. 95-108, 2004.

HAMMOND, E.N. et al. Effect of United States buckwheat honey on antibiotic-resistant hospital acquired pathogens. *Pan. Afr. Med. J.*, v. 25, p. 212,2016.

HANCOCK, L.E.; PEREGO, M. The *Enterococcus faecalis fsr* two-component system controls biofilm development through production of gelatinase. *J. Bacteriol.*,v. 186, p. 5629-5639, 2004.

HANDWERGER, S. et al. Heterogeneity of the *vanA* gene cluster in clinicalisolates of enterococci from the Northeastern UnitedStates. *Antimicrob. Agents Chemother.*,v. 39, p. 362-368, 1995.

HANKE, M.L.; KIELIAN, T. Deciphering mechanisms of staphylococcal biofilm evasion of host immunity. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, v. 2, p. 62,2012.

HANRAHAN, J.; HOYEN, C.; RICE, L.B. Geographic distribution of a large mobile element that transfers ampicillin and vancomycin resistance between *Enterococcus faecium* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 44, n. 5, p. 1349-1351, 2000.

HÄNSCH, G.M. "Host defence against bacterial biofilms: "mission impossible"?," *ISRN Immunol.*, vol. 2012, 2012.

HARRINGTON, S.M. et al. Vancomycin resistance, *esp*, and strain relatedness: a 1-year study of enterococcal bacteremia. *J. Clin. Microbiol.*, v. 42, p. 5895-5898, 2004.

HARTHUG, S. et al. The Norwegian Enterococcal Study Group: The prevalence of faecal carriage of ampicillin-resistant and high-level gentamicin-resistant enterococci among inpatients at 10 major Norwegian hospitals. *J. Hosp. Infect.*, v. 50, p. 145-154, 2002.

HASMAN,H. et al. Heterologous expression of glycopeptide resistance *vanHAX* gene clusters from soil bacteria in *Enterococcusfaecalis*. J. Antimicrob. Chemother., v. 57, n. 4, p. 648-53, 2006.

HEGSTAD, K. et al. Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Clin. Microbiol.Infect.*, v.16, p. 541-554, 2010.

HEIDARI, H. et al. High incidence of virulence factors among clinical *Enterococcus faecalis* isolates in southwestern Iran. *Infect Chemother.*, v.49, n. 1, p. 51-56, 2017.

HEIKENS, E.; BONTEN, M.J.M.; WILLEMS, R.J.L. Enterococcal surface protein Esp is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162. *J. Bacteriol.*, v. 189, p. 8233-8240, 2007.

HENDRICKX, A.P. et al. SgrA, a nidogen-binding LPXTG surface adhesion implicated in biofilm formation, and EcbA, a collagen binding MSCRAMM, are two novel adhesins of hospital-acquired *Enterococcus faecium*. *Infect. Immun.*, v. 77, n. 11, p. 5097-106, 2009.

HENRY, E. et al. Beyond glycolysis: GAPDHs are multi-functional enzymes involved in regulation of ROS, autophagy, and plant immune responses. *PLoS Genet.*, v. 11, n. 4, p. e1005199, 2015.

HENSEL, K.O. et al.Nursing staff fluctuation and pathogenic burden in the NICU-effective outbreak management and the underestimated relevance of non-resistant strains. *Sci Rep.*, v. 7, p. 45014, 2017.

HERRERA, S. et al. Characterization and rapid control of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*(VREF) outbreak in a renal transplant unit in Spain: the environment matters. *Enferm. Infecc. Microbiol.Clin.*, v. 35, n. 1, p. 5-11, 2017.

HIDRON, A.I. et al Daptomycin resistance in *Enterococcus faecalis* prosthetic valve endocarditis. *J. Antimicrob. Chemother.*,v. 61, p. 1394-1396, 2008.

HIMEDA T. et al. Cytokine/chemokine profile in J774 macrophage cells persistently infected with DA strain of Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV). J Neurovirol. 16(3):219-29. May. 2010.

HIRT, H.; SCHLIEVERT, P.M.; DUNNY, G.M. In vivo induction of virulence and antibiotic resistance transfer in *Enterococcus faecalis* mediated by the sex pheromone-sensing system of pCF10. *Infect. Immun.*, v. 70, p. 716-723, 2002.

HOFER, U. Biofilms: turning tides for quorum sensing. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 14, n. 2, p. 64, 2016.

HOGARDT, M. et al. Current prevalence of multidrug-resistant organisms in long-term care facilities in the Rhine-Main district, Germany, 2013. *Euro.Surveill.*, v. 20, n. 26, 2015.

HØIBY, N.et al. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents*, v. 35, p. 322-332, 2010.

HOLLENBECK, B.L.; RICE, L.B. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in *Enterococcus. Virulence*, v. 3, n. 5, p. 421-569, 2012.

HOLMAN, T.R. et al. Identification of the DNA-binding site for the phosphorylated VanR protein required forvancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Biochemistry*, v. 33, p. 4625-4631, 1994.

HOLMBERG, A.; RASMUSSEN, M. Mature biofilms of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* are highly resistant to antibiotics. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 84, n. 1, p. 19-21, 2016.

HOMAN, W.L.et al. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. J. Clin. Microbiol., v. 40, p. 1963-1971, 2002.

HOOPER, DC. Mechanisms of quinolone resistance. In: HOOPER, DC.; RUBINSTEIN, E.(Ed). Quinolone antimicrobial agents. 3rd. Washington, D.C: ASM Press; 2003. p. 41-67.

HORIUCHI, T. et al. Complete genomesequence of bacteriophage BC-611 specifically infecting *Enterococcus faecalis* strain NP-10011. J. Virol., v.86, n. 17, p. 9538-9539, 2012.

HSIEH, Y.C. et al. Clonal spread of CC17 vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* with multilocus sequence type 78 (ST78) and a novel ST444 in Taiwan. *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 29, p. 25-30, 2010.

HUGHES, G., WEBBER, M.A. Novel approaches to the treatment of bacterial biofilm infections. *Br. J. Pharmacol.*,doi:10.1111/bph.13706,2017.

HUH, J.Y. et al. Distribution of insertion sequences associated with Tn1546-like elements among *Enterococcus faecium* isolates from patients in Korea. J. Clin. Microbiol., v. 42, n. 5, p. 1897-1902, 2004.

HUNT, N.C., GOLDIN, R.D. Nitric oxide production by monocytes in alcoholic liver disease. *J. Hepatol.*, v. 14, n. 2-3, p. 146-150, 1992.

JEFFERY, C.J. Protein species and moonlighting proteins: very small changes in a protein's covalent structure can change its biochemical function. *J. Proteomics*, v. 134, p. 19-24, 2016.

JENSEN, E.T. et al. Human polymorphonuclear leukocyte response to *Pseudomonas* aeruginosa grownin biofilms. *Infect. Immun.*, v. 58, p. 2383-2385, 1990.

JENSEN, L. B. et al. A classification system for plasmids from enterococci and other Grampositive bacteria.J Microbiol Methods. 80(1):25-43. Jan. 2010.

JENSEN, L.B. Internal size variations in Tn1546-like elements due to the presence of IS1216V. FEMS Microbiol.Lett., v. 169, n. 2, p. 349-354, 1998.

JESAITIS, A.J. et al. Compromised host defense on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: characterization of neutrophil and biofilm interactions. *J.Immunol.*, v. 171, p. 4329-4339. 2003.

JETT, B.D.; HUYCKE, M.M.; GILMORE, M.S. Virulence of enterococci. *Clin. Microbiol.*, v. 7, p. 462-478, 1994.

JIMÉNEZ-ALCAIDE, E. et al. Healthcare-associated urinary tract infections in patients with a urinary catheter: Risk factors, microbiological characteristics and patterns of antibiotic resistance. *Arch. Esp. Urol.*, v. 68, n. 6, p. 541-550, 2015.

JOHNSON, C.J. et al. The extracellular matrix of *Candida albicans*biofilms impairs formation of neutrophil extracellular traps. *PLoS Pathog.*, v. 12, n. 9, p. e1005884, 2016.

JOLIVET, S. et al. First nosocomial outbreak of *vanA*-type vancomycin-resistant *Enterococcus raffinosus* in France. J. Hosp. Infect., v. 94, n. 4, p. 346-350, 2016.

JONAS, B.M.; MURRAY, B.E.; WEINSTOCK, G.M. Characterization of EmeA, a NorA homolog and multidrug resistance efflux pump, in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob*. *Agents Chemother.*, v. 45, n. 12, p. 3574-3579, 2001.

JOUENNE, T. et al. Proteomics of biofilm bacteria. *Curr. Proteomics*, v. 1, p. 211-219, 2004. JUNG, W.K. et al. Phenotypic and genetic characterization of vancomycin-resitant enterococci from hospitalized humans and from poultry in Korea. *FEMS Microbiol.Lett.*, v. 260, p. 193-200, 2006.

JUNG, W.K.et al. Nucleotide sequence of IS1678, an insertion sequence in the vanA cluster of enterococci. Antimicrob. Agents Chemother., v. 49, n. 4, p. 1666-1667, 2005.

KÅHRSTRÖM, C.T. Biofilms: watching bacteria build their homes. *Nat. Rev. Microbiol.*,v. 10, n. 9, p. 597, 2012.

KAISER, F. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 88, p. 255-262, 2003.

KAK V.; CHOW, J.W. Acquired antibiotic resistance in enterococci. In: GILMORE M.S. et al. (Ed). The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance. ASM Press, Washington DC. P. 355-83, 2002.

KAK, V. et al. In-vitro synergistic activity of the combination of ampicillin and arbekacin against vancomycin-and high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecium* with the *aph*(2")-*Id* gene. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*,v. 37, n. 4, p. 297-299, 2000.

KARATAN, E.; WATNICK, P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 73, p. 310-347, 2009.

KAWALEC, M. et al. Hospital outbreak of vancomycin-resitant enterococci caused by a single clone of *Enterococcus raffinosus* and several clones of *Enterococcus faecium*. *Clin. Microbiol. Infect.*, v. 13, p. 893-901, 2007.

KHAN, M.A. et al. High prevalence of ST-78 infection associated vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from hospitals in Asunción, Paraguay. *Clin. Microbiol. Infect.*,v. 16, 624-627, 2010.

KHAN, S.A.et al. Heteroresistance to vancomycin and novel point mutations in Tn1546 of *Enterococcus faecium* ATCC 51559. *Int. J. Antimicrob. Agents*,v. 31, n. 1, p. 27-36, 2008.

KIRMUSAOGLU, S. et al. The effect of urinary catheters on microbial biofilms and catheter associated urinary tract infections. *Urol. J.*,v. 14, n. 2, p. 3028-3034, 2017.

KIRSCHNEK, S. et al. Necrosis-like cell death induced by bacteria in mouse macrophages. *Eur. J. Immunol.*, v. 34, n. 5, p. 1461-1471, 2004.

KLARE, I.et al. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *Int. J. Food Microbiol.*, v.88, p. 269-290, 2003.

KLEIN, M.I. et al. *Streptococcus mutans*-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. *Front. Cell Infect. Microbiol.*, v. 5, p. 10, 2015.

KNOWLES, R.G.; MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.*, v.298, p.249-258, 1994.

KO, K.S. et al. Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from Korea. *J. Clin. Microbiol.*, v. 43, p. 2303-2306, 2005.

KOTEVA, K. et al. A vancomycin photoprobe identifies the histidine kinase VanSsc as a vancomycin receptor. *Nat. Chem. Biol.*, v. 6, 327-329, 2010.

KRISHNAN, M.et al. Multi metal assessment on biofilm formation in offshore environment. *Mater Sci. Eng. C. Mater Biol. Appl.*,v. 73, p. 743-755, 2017.

KRISTIAN, S.A. et al. Biofilm formation induces C3a release and protects *Staphylococcus epidermidis* from IgG and complement deposition and from neutrophil dependent killing. *J. Infect.Dis.*, v. 197, p. 1028-1035, 2008.

KRISTICH, C.J.et al. Esp-independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. J. *Bacteriol.*, v. 186, p. 154-163, 2004.

KUZDAN, C. et al. Three-year study of health care-associated infections in a Turkish pediatric ward. J. Infect. Dev. Ctries., v. 8, n. 11, p. 1415-1420, 2014.

KWON, K.H. et al. Occurrence of antimicrobial resistance and virulence genes, and distribution of enterococcal clonal complex 17 from animals and human beings in Korea. *J. Vet. Diagn. Invest.*,v. 24, p. 924-931, 2012.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227(5259), p. 680-685, 1970.

LAI, C.K. et al. Ahospital-wide screening programme to control an outbreak of vancomycinresistant enterococci in a large tertiary hospital in Hong Kong. *Hong Kong Med. J.*,v. 23, n. 2, p. 140-149, 2017. LANDERSLEV, K.G. et al. Polyclonal spread of *vanAEnterococcus faecium* in central Denmark region, 2009-2013, investigated using PFGE, MLST and WGS. *Int. J. Antimicrob.Agents*, v. 48, n. 6, p. 767-768, 2016.

LAPONOGOV, I. et al. Structural insight into the quinolone-DNA cleavage complex of type IIA topoisomerases. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, v. 16, p. 667-669, 2009.

LAPONOGOV, I. et al. Structure of an 'open' clamp type II topoisomerase-DNA complex provides a mechanism for DNA capture and transport. *Nucleic Acids Res.*, v. 41, p. 9911-9923, 2013.

LAPPIN-SCOTT, H.M.; BASS, C. Biofilm formation: attachment, growth, and deattachment of microbes from surfaces. *Am. J. Infect. Control*, v. 29, p. 250-251, 2001.

LARRU, B.et al.Bloodstream infections in hospitalized children: epidemiology and antimicrobial susceptibilities. *Pediatr. Infect.Dis. J.*, v. 35, n. 5, p. 507-510, 2016.

LATTIF, A,A.et al. Lipidomics of *Candida albicans* biofilms reveals phase-dependent production of phospholipid molecular classes and role for lipid rafts in biofilm formation. *Microbiology*, v. 157, p. 3232-3242, 2011.

LEAVIS, H.L.; BONTEN, M.J.M.; WILLEMS, R.J.L. Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance. *Cur. Opin.Microbiol.*, v. 9, p. 454-460, 2006.

LEAVIS, H.L.et al. High-level ciprofloxacin resistance from point mutations in *gyrA* and *parC* confined to global hospital-adapted clonal lineage CC17 of *Enterococcus faecium*. J. *Clin.Microbiol.*, v.44, n. 3, p. 1059-1064, 2006.

LEBRETON, F. et al. D-Ala-D-Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus faecium. Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 55, p. 4606-4612, 2011.

LECLERCQ, R. et al. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium. N. Engl. J. Med.*,v. 319, n. 3, p. 157-161, 1988.

LEE, H. et al. Insertion sequence-caused large-scale rearrangements in the genome of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*,v. 44, n. 15, p. 7109-7119, 2016.

LEE, J.H. et al. Genetic diversity and antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis*isolates from traditional korean fermented soybean foods. *J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 26, n. 12, doi:10.4014/jmb.1612.12033, 2017.

LEE, S.C. et al. Identification of subclinical transmission of vancomycin-resistant *Enterococcus* within an intensive care unit in Taiwan. *J. Microbiol. Immunol.Infect.*, v. 49, n. 5, p. 749-759, 2016.

LEE, W. et al. Sonicated extract of *Enterococcus faecalis* induces irreversible cell cycle arrest in phytohemagglutinin-activated human lymphocytes. *J. Endod.*, v. 30, n. 4, p. 209-212, 2004.

LEE, W. G. et al. Reduction in glycopeptide resistance in vancomycin-resistant enterococci as a result of *vanA* cluster rearrangements. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 48, p. 1379-1381, 2004.

LEE, W.G.; KIM, W. Identification of a novel insertion sequence in *vanB2*-containing *Enterococcus faecium. Lett. Appl. Microbiol.*, v. 36, n. 3, p. 186-190, 2003.

LEE, Y.D.; PARK, J.H. Complete genome sequence of enterococcal bacteriophage SAP6. *J. Virol.*, v. 86, n. 9, p. 5402-5403, 2012.

LEMOINE, L.; HUNTER, P.R. Enterococcal urinary tract infections in a teaching hospital. *Eur. J. Clin.Microbiol.*, v. 6, p. 574-575, 1987.

LEN, A.C. et al. Cellular and extracellular proteome analysis of *Streptococcus mutans* grown in a chemostat. *Proteomics*, v. 3, p. 627-646, 2003.

LESTER, C.H. et al. Emergence of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* in Danish hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 62, p. 1203-1206, 2008.

LEWIS, K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*,v. 45, p. 999-1007, 2001.

LI J. et al. An Outbreak of Infections Caused by a *Klebsiella pneumoniae* ST11 Clone Coproducing *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-2 and RmtB in a Chinese Teaching Hospital. Chin Med J (Engl). 5;129(17):2033-9. Sep. 2016.

LIAO, Y. et al. Morphological and proteomic analysis of biofilms from the Antarctic archaeon, *Halorubrum lacusprofundi*. *Sci. Rep.*,v.6, p. 37454, 2016.

LIBISCH, B. et al. Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. clinical isolates from Hungary and Serbia. *Scand. J. Infect. Dis.*, v.40, p. 778-784, 2008.

LIEW FY.Regulation of nitric oxide synthesis in infectious and autoimmune diseases. Immunol Lett. 43(1-2):95-8. Dec. 1994.

LIM, S.Y. et al. Comparative genome analysis of multiple vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from two fatal cases. *Infect. Genet. Evol.*, v. 49, p. 55-65,2017.

LOBDELL, K.W.; STAMOU, S.; SANCHEZ, J.A. Hospital-acquired infections. *Surg. Clin. North Am.*, v. 92, n. 1, p. 65-77, 2012.

LÓPEZ, M, et al. Tn*1546* structures and multilocus sequence typing of *vanA*-containing enterococci of animal, human and food origin. *J. Antimicrob.Chemother.*, v. 65, p. 1570-1575, 2010.

LÓPEZ, M. et al. Diversity of clones and genotypes among vancomycin-resistant clinical *Enterococcus* isolates recovered in a Spanish hospital. *Microb. Drug Resist.*, v. 18, n. 5, p.484-491, 2012.

LOSENSKY, G. et al. Shedding light on biofilm formation of *Halobacterium salinarum* R1 by SWATH-LC/MS/MS analysis of planktonic and sessile cells. *Proteomics*,v. 17, n. 7. doi: 10.1002/pmic.201600111, 2016.

LU, J.J. et al. The *vanB2* gene cluster of the majority of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from Taiwan is associated with the pbp5 gene and is carried by Tn5382 containing a novel insertion sequence. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 49, n. 9, p. 3937-3939, 2005.

MACKINNON, M.G. et al. Identification and characterization of IS1476, an insertion sequence-like element that disruptsVanY function in a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strain. *Antimicrob. Agents Chemother.*,v. 41, p 1805-1807, 1997.

MARRAFFINI, L.A.; DEDENT, A.C.; SCHNEEWIND, O. Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 70, n. 1, p. 192-221, 2006.

MARSHALL, K.C. Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity and control at surfaces. *Features*, v. 58, p. 202-207, 1992.

MARTINEZ, F.O. et al. Macrophage activation and polarization. *Front. Biosci.*, v. 13, p. 453-461, 2008.

MARTÍNEZ-ALONSO, M. et al. Side effects of chaperone gene co-expression in recombinant protein production. *Microb. Cell Fact.*,v. 9, p. 64, 2010.

MATHEW, S.; YAW-CHYN, L.; KISHEN A. Immunogenic potential of *Enterococcusfaecalis* biofilm under simulated growth conditions. *J. Endod.*,v. 36, p. 832-836, 2010.

MAZAHERI, N.F.R.; BARTON, M.D.; HEUZENROEDER, M.W. Bacteriophage-mediated transduction of antibiotic resistance in enterococci. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 52, n. 6, p. 559-564, 2011.

MAZAHERI, N.F.R.; BARTON, M.D.; HEUZENROEDER, M.W. Novel Bacteriophages in *Enterococcus* spp. *Curr. Microbiol.*, v. 60, n. 6, p. 400-406, 2010.

MAZZEFFI, M.et al. Healthcare-associated infections in cardiac surgery patients with prolonged intensive care unit stay. *Ann. Thorac. Surg.*, v. 4975, n. 17, p. 30013-30019, 2017.

MCGOWAN, J.E. Debate-guidelines for control of glycopeptide-resistant enterococci (GRE) have not yet worked. *J. Hosp. Infect.*, v. 57, p. :281-284, 2004.

MENDES, R.E. et al.Longitudinal (2001-14) analysis of enterococci and VRE causing invasive infections in European and US hospitals, including a contemporary (2010-13) analysis of oritavancin in vitro potency. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 71, n. 12, p. 3453-3458, 2016.

MERQUIOR, V.L.C. et al. Analysis of electrophoretic whole-cell protein profiles as a tool for characterization of *Enterococcus* species. *Curr. Microbiol.*, v. 25, p. 149-153, 1994.

MICHIELS, J.E. et al. Draft genome sequence of *Enterococcus faecium* strain LMG 8148. *Stand. Genomic Sci.*, v. 11, n. 1, p. 63, 2016.

MIRNEJAD, R.et al. Identification of aminoglycoside resistance genes by triplex PCR in *Enterococcus* spp. isolated from ICUs. *Infez.Med.*, v. 24, n. 3, p. 222-229, 2016.

MITTAL, R.et al. Macrophage inflammatory protein-2, neutrophil recruitment and bacterial persistence in an experimental mouse model of urinary tract infection. *Microbes Infect.*,v. 6, n. 14, p. 1326-1332, 2004.

MIYAZAKI, S.et al.Cytotoxic effect of hemolytic culture supernatant from*Enterococcus faecalis* on mouse polymorphonuclear neutrophils and macrophages. *Microbiol. Immunol.*,v. 37, n. 4, p. 265-270, 1993.

MOCHE, M.et al. Time-resolved analysis of cytosolic and surface-associated proteins of *Staphylococcus aureus* HG001 under planktonic and biofilm conditions. *J. Proteome Res.*, v. 14, n. 9, p. 3804-3822, 2015.

MOHAMED, J.A.; HUANG, D. B. Biofilm formation by enterococci. *J. Med. Microbiol.*,v. 56, p. 1581-1588, 2007.

MOHAMED, J.A.; MURRAY, B.E. Lack of correlation of gelatinase production and biofilm formation in a large collection of *Enterococcus faecalis* isolates. *J Clin.Microbiol.*, v.43, p. 5405-5407, 2005.

MOHAMED, J.A.et al. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect. Immun.*, v. 72, p. 3658-3663, 2004

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.*, v.329, p.2002-2010, 1993.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol.Rev.*, v. 43, p.109-142, 1991.

MONTEIRO DA SILVA, B. Formação de biofilmes por Enterococcus faecium sensível e multirresistente aos antimicrobianos: características à proteômica. [Dissertação]. Rio de Janeiro. Universidade do Estado do Rio de Janeiro,2012.

MONTESERIN, N.; LARSON, E. Temporal trends and risk factors for healthcare-associated vancomycin-resistant enterococci in adults. *J. Hosp. Infect.*, v. 94, n. 3, p. 236-241, 2016.

MORAIS CABRAL, J.H. et al. Crystal structure of the breakage-reunion domain of DNA gyrase. *Nature*, v. 388, p. 903-906, 1997.

MOREAU, C. et al. Deciphering key residues involved in the virulence-promoting interactions between *Streptococcus pneumoniae* and human plasminogen. *J. Biol. Chem.*, v. 292, n. 6, p. 2217-2225, 2017.

MOSSER, D.M. The many faces of macrophage activation. J. Leukoc. Biol., v. 73, p. 209-212, 2003.

MOSSER, D.M.; EDWARDS, J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.*, v.8, n. 12, p. 958-969, 2008.

MUKHERJEE, R.; CHATTERJI, D. Proteomics and mass spectrometric studies reveal planktonic growth of *Mycobacterium smegmatis* in biofilm cultures in the absence of *rpoZ. J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed.Life Sci.*, v. 861, n. 2, p. 196-202, 2008.

NAAS, T. et al. First nosocomial outbreak ofvancomycin-resistant *Enterococcus faecium* expressing aVanD-like phenotype associated with a *vanA* genotype.*J. Clin.Microbiol.*, v. 43, p. 3642-3649, 2005.

NADELL, C.D.; XAVIER, J.B.; FOSTER, K.R. The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiol. Rev.*, v.33, n. 1, p. 206-224, 2009.

NAGARAJAN, R.; HENDRICKX, A.P.; PONNURAJ, K. The crystal structure of the ligandbinding region of serine-glutamate repeat containing protein A (SgrA) of *Enterococcusfaecium* reveals a new protein fold: functional characterization and insights into its adhesion function. *FEBS J.*, v. 283, n. 16, p. 3039-3055, 2016.

NALLAPAREDDY, S.R.; WEINSTOCK, G.M.; MURRAY, B.E. Clinical isolates of *Enterococcusfaecium* exhibit strain-especific collagen binding mediated by Acm, a new member of the MSCRAMM family. *Mol. Microbiol.*, v. 47, p. 1733-1747, 2003.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat.Rev.Immunol.*,v. 6, p. 173-182, 2006.

NAUSEEF, W.M. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol.Rev.*, v. 219, p. 88-102, 2007.

NIU, H. et al. The prevalence of aminoglycoside-modifying enzyme and virulence genes among enterococci with high-level aminoglycoside resistance in Inner Mongolia, China. *Braz. J. Microbiol.*, v. 47, n. 3, p. 691-696, 2016.

NNISS. National Nosocomial Infections SurveillanceSystem Report, data summary from January 1992 through June 2003. *Am. J. Infect. Control.*, v. 31, p. 481-498, 2003.

NOVAIS, C. et al. Local genetic patterns within a vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* clone isolated in three hospitals in Portugal. *Antimicrob. Agents Chemother.*,v. 48, n. 9, p. 3613-3617, 2004.

NOVAIS, C.et al. Diversity of Tn1546 and its role in the dissemination of vancomycinresistant enterococci inPortugal. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 52, p. 1001-1008, 2008.

NOVAK, M.L.; KOH, T.J. Macrophage phenotypes during tissue repair. *J. Leukoc. Biol.*,v. 93, n. 6, p. 875-881, 2013.

NUSSLER, A.K.; BILLIAR, T.R. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J. Leukoc. Biol.*, v.2, p.171-178, 1993.

O'TOOLE G, KAPLAN HB, KOLTER R. Biofilm formation as microbial development. *Ann Rev Microbiol.* 54; 49–79. 2000.

OANA, K.et al. Physical and genetic map of *Enterococcus faecium* ATCC19434 and demonstration of intra- and interspecific genomic diversity in enterococci. *FEMS Microbiol.Lett.*, v. 207, n. 2, p. 133-139, 2002.

OBST; U.; SCHWARTZ, T.; VOLKMANN, H. Antibiotic resistant pathogenic bacteria and their resistance genes in bacterial biofilms. *Int. J. Artif. Organs*, v. 29, p. 387-394,2006.

OKADA, A,; HANGAI, M.; ODA, T. Bacteremia with an iliopsoas abscess and osteomyelitis of the femoral head caused by *Enterococcus avium* in a patient with end-stage kidney disease. *Intern. Med.*, v. 54, n. 6, p. 669-74, 2015.

OLIVEIRA, M. et al. Virulence traits and antibiotic resistance among enterococci isolated from dogs with periodontal disease. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 46, p. 27-31, 2016.

ORELL, A.; FRÖLS, S.; ALBERS, S.V. Archaeal biofilms: the great unexplored. *Ann. Rev. Microbiol.*, v. 67, p. 337-354, 2013.

ORSI, G.B.; CIORBA, V. Vancomycin resistant enterococci healthcare associated infections. *Ann. Ig.*, v. 25, n. 6, p. 485-492, 2013.

OSKOUI, M.; FARRO, K.H. Distribution of insertion sequences associated with Tn1546 and clonal diversity of vancomycin-resistant enterococci isolated from patients in Tehran, Iran. *Iran J. Microbiol.*, v. 2, p. 15-22, 2010.

PAGANELLI, F. L.et al. *Enterococcus faecium* biofilm formation: identification of major autolysin AtlAEfm, associated Acm surface localization, and AtlAEfm-independent extracellular DNA Release. *MBio.* 16;4(2):e00154. Apr. 2013.

PALAZZO, I.C. et al. Changes invancomycin-resistant *Enterococcus faecium* causing outbreaks in Brazil. *J. Hosp. Infect.*, v. 79, n. 1, p. 70-74, 2011.

PALEPOU, M.F.I. et al. Molecular analysis of diverse elements mediating VanA glycopeptide resistance in enterococci. *J. Antimicrob.Chemother.*, v. 42, p. 605-612, 1998.

PALMER K.L. et al.Comparative genomics of enterococci: variation in *Enterococcusfaecalis*, clade structure in *E. faecium*, and defining characteristics of *E. gallinarum* and *E. casseliflavus*. *MBio*, v. 3, n. 1, p. e00318-11, 2012.

PALMER, K.L.; KOS, V.N.; GILMORE, M.S. Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance. *Curr. Opin.Microbiol.*, v. 13, p. 632-639, 2010.

PANESSO, D. et al. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: a prospective, multicenter study in South American hospitals. *J. Clin. Microbiol.*,v. 48, p. 1562-1569 2010.

PARASION, S.et al. Isolation and characterization of a novel bacteriophage φ 4D lytic against *Enterococcus faecalis*strains. *Curr.Microbiol.*, v.65, n. 3, p. 284-289, 2012.
PARK, A.J.et al.Tracking the dynamic relationship between cellular systems and extracellular subproteomes in *Pseudomonas aeruginosa*biofilms. *J. Proteome Res.*, v. 14, n. 11, p. 4524-4537, 2015.

PATEL, R. Enterococcal-type glycopeptide resistance genes in non-enterococcal organisms. *FEMS Microbiol.Lett.*, v. 185, n. 1, p. 1-7,2000.

PATEL, R. et al. The biopesticide *Paenibacillus popilliae* has a vancomycin resistance gene cluster homologous to the enterococcal VanA vancomycin resistance gene cluster. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 44, n. 3, p. 705-709, 2000.

PERCIVAL, S.L. Importance of biofilm formation in surgical infection. *Br. J. Surg.*, v. 104, n. 2, p. e85-e94, 2017.

PEREZ, A.C. et al. Residence of *Streptococcus pneumoniae* and *Moraxella catarrhalis* within polymicrobial biofilm promotes antibiotic resistance and bacterial persistence in vivo. *Pathog. Dis.*, v.70, n. 3, 280-288, 2014.

PERICHON, B. et al. Glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* BM4416 is a VanD-type strain with an impairedD-Alanine:D-Alanine ligase. *Antimicrob. Agents Chemother.*,p. 44, n. 5, p. 1346-1348, 2000.

PHILLIPS, C.I.; BOGYO, M. Proteomics meets microbiology: technical advances in the global mapping of protein expression and function. *Cell.Microbiol.*, v.7, p. 1061-1076, 2005.

PINHOLT, M. et al. Multiple hospital outbreaks of *vanAEnterococcusfaecium* in Denmark, 2012-13, investigated by WGS, MLST and PFGE. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 70, n. 9, p. 2474-2482, 2015.

PIRKKO-LIISA, M. et al. Purification and substrate specificity of a strongly hydrophobic extracellular metalloendopeptidase ("gelatinase") from *Streptococcus faecalis* (strain OGI-10). *J. Biol. Chem.*, v. 264, p. 3325-3334, 1989.

PORTILLO, A. et al. Macrolide resistance genes in *Enterococcus* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 44, p. 967-971, 2000.

PRADEEP KUMAR, S.S.; EASWER, H.V.; MAYA NANDKUMAR, A. Multiple drug resistant bacterial biofilms on implanted catheters - a reservoir of infection. *J. Assoc. Phys. India*, v. 61, n. 10, p. 702-707, 2013.

PRÉVOST, G. et al. Panton-Valentine leucocidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infect. Immun.*,v. 63, p. 4121-4129, 1995.

PUZON, G.J. et al. Comparison of biofilm ecology supporting growth of individual *Naegleria* species in a drinking water distribution system. *FEMS Microbiol. Ecol.*,v. 93, n. 4, doi: 10.1093/femsec/fix017, 2017.

QAYYUM, S. et al. Protein translation machinery holds a key for transition of planktonic cells to biofilm state in *Enterococcus faecalis*: A proteomic approach. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 474, n. 4, p. 652-659, 2016.

QIN X. et al. Complete genome sequence of *Enterococcus faecium* strain TX16 and comparative genomic analysis of *Enterococcus faecium* genomes. *BMC Microbiol.*,v. 12, p. 135, 2012.

QIN, X. et al. Characterization of *fsr*, a regulator controlling expression of gelatinase and serine protease in *Enterococcus faecalis* OG1RF. J. Bacteriol., v. 183, p. 3372-3382, 2001.

QIN, X. et al. Effects of *Enterococcus faecalis* fsr genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. *Infect. Immun.*,v. 68, p. 2579-2586, 2000.

QU, T.T. et al. Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci in Hangzhou, China. J. Antimicrob. Chemother., v. 60, n. 6, p. 1403-1405, 2007.

QUINTILIANI, R. Jr; COURVALIN, P. Characterization of Tn1547, a composite transposon flanked by the IS16 and IS256-like elements, that confers vancomycinresistance in *Enterococcusfaecalis* BM4281. *Gene*, v. 172, n. 1, p. 1-8, 1996.

RAMSEY, M.; HARTKE, A.; HUYCKE, M. The physiology and metabolism of enterococci. 2014 Feb 15. In: GILMORE, M.S. et al. (Ed). Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.

RANI, S.A. et al. Spatial patterns of DNA replication, protein synthesis, and oxygen concentration within bacterial biofilms reveal diverse physiological states. *J. Bacteriol.*, v.189, p. 4223-4233, 2007.

RASMUSSEN, B. Filamentous microfossils in a 3,235-million-year-old volcanogenic massive sulphide deposit. *Nature*, v. 405, p. 676-679, 2000.

RATHSAM, C. et al. Up-regulation of competence- but not stress-responsive proteins accompanies an altered metabolic phenotype in *Streptococcus mutans* biofilms. *Microbiology*, v. 151, p. 1823-1837, 2005.

RAVEN, K.E.et al. A decade of genomic history for healthcare-associated *Enterococcus* faecium in the United Kingdom and Ireland. Genome Res., v. 26, n. 10, p. 1388-1396, 2016.

RENK, H. et al. *Enterococcus faecium* mediastinitis complicated by disseminated *Candida parapsilosis* infection after congenital heart surgery in a 4-week-old baby. *Case Rep. Infect. Dis.*, v. 2015, doi:10.1155/2015/543685, 2015.

RESCH, A. et al. Comparative proteome analysis of *Staphylococcus aureus* biofilm and planktonic cells and correlation with transcriptome profiling. *Proteomics*, v. 6, p. 1867-1877, 2006.

RESENDE, M. et al. Emergence of *vanA* vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a hospital in Porto Alegre, South Brazil. *J. Infect Dev. Ctries.*, v. 8, n. 2, p. 160-167, 2014.

RIANCHO, J.A. et al. Expression and functional role of nitric oxide synthase in osteoblastlike cells. *J. Bone Miner. Res.*, v.10, n.3, p.439-446, 1995. RIBAS, R.M. et al. Vancomycin-resistant VanA phenotype *Enterococcus faecalis*. First case in Minas Gerais state and epidemiological considerations. *Braz. J. Infect. Dis.*, v. 11, p. 439-440, 2007.

RICE, L.B.et al. β-Lactam antibiotics and gastrintestinal colonization with vancomycinresistant enterococci. J. Infect. Dis., v. 189, p. 1113-1118, 2004.

RICKARD, A.H. et al. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol.*, v.11, p. 94-100, 2003.

ROBERTS, A.P.; MULLANY, P. Oral biofilms: a reservoir of transferable, bacterial, antimicrobial resistance. *Expert Rev. Anti Infect.Ther.*, v.8, p. 1441-1450, 2010.

ROUSSEAU, M.et al. Bladder catheterization increases susceptibility to infection that can be prevented by prophylactic antibiotic treatment. *JCI Insight*, v. 1, n. 15, p. e88178, 2016.

ROWSON, C.; TOWNSEND R. Biofilms: prevention and treatment. Br. J. Hosp. Med., (Lond), v. 77, n. 12, p. 699-703, 2016.

ROZDZINSKI, E. et al. Aggregation substance-mediated adherence of *Enterococcus faecalis* to immobilized extracellular matrix proteins. *Microb. Pathog.*,v. 30, p. 211-220, 2001.

RUDY, M.et al. Antibiotic susceptibility analysis of *Enterococcus* spp. isolated from urine. *Przegl Lek.*, v. 6, p. 473-476, 2004.

SABOUNI, F. et al. High frequency of vancomycin resistant *Enterococcus faecalis* in children: an alarming concern. *J. Prev. Med. Hyg.*, v. 57, n. 4, p. E201-E204, 2016.

SÁNCHEZ-VALENZUELA, A. et al. Multilevel population genetic analysis of *vanA* and *vanBEnterococcus faecium* causing nosocomial outbreaks in 27 countries (1986-2012). *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 71, n. 12, p. 3351-3366, 2016.

SANDOE, J.A. et al. Correlation between enterococcal biofilm formation in vitro and medicaldevice-related infection potential in vivo. J. Med. Microbiol., v. 52, p. 547-550, 2003.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SANUI, T.; GREGORY, R.L. Analysis of *Streptococcus mutans* biofilm proteins recognized by salivary immunoglobulin A. *Oral Microbiol. Immunol.*, v. 24, p. 361-368, 2009.

SATAKE, S. et al. Detection of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, v. 35, p. 2325-2330, 1997.

SAUER, K. The genomics and proteomics of biofilm formation. Genome Biol., v. 4, p. 219. 2003.

SAVA, I.G. Enterococcal surface protein contributes to persistence in the host but is not a target of opsonic and protective antibodies in *Enterococcus faecium* infection. *J Med Microbiol.*, v. 59, p. 1001-1004, 2010.

SCHAUMBURG, J. et al. The cell wall subproteome of *Listeriamonocytogenes*. *Proteomics*, v. 4, p. 2991-3006, 2004.

SCHERR, T.D. et al. Global transcriptome analysis of *Staphylococcus aureus* biofilms in response to innate immune cells. *Infect. Immun.*,v. 81, n. 12, p. 4363-4376, 2013.

SCHLEIFER, K.H.; KLIPPER-BALZ, R. Transfer of *Streptococcal faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 34, p. 31-34, 1984.

SCHLIEVERT, P.M. *Enterococcus faecalis* endocarditis severity in rabbits is reduced by IgG Fabs interfering with aggregation substance. *PLoS One*, v. 5, n. 10, p. e13194, 2010.

SCHOUTEN, M.A. et al. Molecular analysis of Tn*1546-like* elements in vancomycinresistant enterococciisolated from patients in Europe shows geographic transposon type clustering.*Antimicrob. Agents Chemother.*, v.45, n. 3, p. 986-989, 2001.

SCHWAIGER K.; BAUER J. Detection of the erythromycin rRNA methylase gene *erm*(*A*) in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob*. *Agents Chemother*.,v. 52,p. 2994-2995, 2008.

SECOR, P.R. et al. Filamentous bacteriophage produced by *Pseudomonas aeruginosa* alters the inflammatory response and promotes noninvasive infection in vivo. *Infect. Immun.*,v. 85, n. 1, p. e00648-16, 2016.

SENEVIRATNE, C.J. et al. Unraveling the resistance of microbial biofilms: has proteomics been helpful? *Proteomics*, v. 12, n. 4-5, p. 651-665, 2012.

SERBINA, N.V. et al Monocyte-mediated defense against microbial pathogens *Annu. Rev. Immunol.*, v. 26, p. 421-452, 2008.

SHANKAR, V. et al. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infect. Immun.*,v. 67, p. 193-200, 1999.

SHARIFI-RAD, M.et al. First case of *vanA*-positive *Enterococcus mundtii* in human urinary tract infection in Iran. *New Microbes New Infect.*, v. 11, p. 68-70, 2016.

SHIN, J.H.et al. Proteomic analysis of *Acinetobacter baumannii* in biofilm and planktonic growth mode. *J. Microbiol.*,v. 47, p. 728-735, 2009.

SHOKOUHI, S. et al. Genotypic characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. in tertiary center, Iran. *Infect. Disord. Drug Targets*, 2017.

SIEVERT, D.M. et al. National Healthcare Safety Network (NHSN) Team and Participating NHSN Facilities. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.*, v. 34, n. 1, p. 1-14, 2013.

SIFRI, C.D. et al. Virulence effect of *Enterococcus faecalis* protease genes and the quorumsensing locus *fsr* in *Caenorhabditis elegans* and mice. *Infect. Immun.*, v. 70, p. 5647-5650, 2002. SIGUIER, P.; GOURBEYRE, E.; CHANDLER, M. Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 38, n. 5, p. 865-891, 2014.

SILLANPÄÄ, J. et al. Distribution of genes encoding MSCRAMMs and pili in clinical and natural populations of *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.*,v. 47, n. 4, p. 896-901. 2009. SILVA, M.S. et al. Analysis of the biofilm proteome of *Xylella fastidiosa*. *Proteome Sci.*, v. 9, p. 58, 2011.

SILVA, M.T.; CORREIA-NEVES, M. Neutrophils and macrophages: the main partners of phagocyte cell systems. *Front. Immunol.*, v. 3, p. 174, 2012.

SIMJEE, S.et al. Characterization of Tn1546 in vancomycin-resistant*Enterococcus faecium* isolated from canine urinary tract infections: evidence ofgene exchange between human and animal enterococci. J. Clin.Microbiol., v. 40, n. 12, p. 4659-4665, 2002.

SINGH K.V.; MALATHUM K.; MURRAY B.E. Disruption of an *Enterococcusfaecium*species-specificgene, a homologue of acquired macrolide resistancegenes of staphylococci, is associated withan increase in macrolide susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.*,v. 45, p. 263-266, 2001.

SLETVOLD H.et al. Tn*1546* is part of a larger plasmid-encoded genetic unit horizontally disseminated among clonal *Enterococcus faecium* lineages. *J. Antimicrob.Chemother.*, v. 65, p. 1894-1906, 2010.

SOHEILI,S. et al. Wide distribution of virulence genes among *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* clinical isolates. *Scientific World J.*, v.2014, p. 623174. 2014.

SOOD, S. et al. Enterococcal infections & antimicrobial resistance. *Ind. J. Med. Res.*, v.28, p. 111-121, 2008.

SPORMAN, A.M. Physiology of microbes in biofilms. *Curr. Top. Microbiol.Immunol.*, v. 322, p. 17-36, 2008.

STAMEREILERS, C. et al. Comparative genomics of 9 novel *Paenibacilluslarvae* bacteriophages. *Bacteriophage*, v.6, n. 3, p. e1220349, 2016.

STEWART, P.S.; COSTERTON, J.W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*, v. 14, p. 135-138, 2002.

STEWART, P.S.; FRANKLIN, M.J. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 6, p. 199-210, 2008.

STIPETIC, L.H. et alA novel metabolomic approach used for the comparison of *Staphylococcus aureus* planktonic cells and biofilm samples. *Metabolomics*, v. 12, p. 75, 2016.

STOODLEY, P.et al. Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *J. Ind. Microbiol.Biotechnol.*, v.29, p. 361-367, 2002.

STOTHARD, P.; WISHART, D.S. Circular genome visualization and exploration using CGView. *Bioinformatics*, v. 21, n. 4, p. 537-539, 2005.

STRATEVA, T. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates collected in Bulgaria. *Braz J Infect Dis.*, v. 20, n. 2, p. 127-133, 2016. SU, Y.A. et al. Nucleotide sequence of the gelatinase gene (*gelE*) from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. *Infect. Immun.*, v.59, p. 415-420, 1991.

SUNG, K.; KHAN, S.A.; NAWAZ, M.S. Genetic diversity of Tn1546-like elements in clinical isolates of vancomycin-resistant enterococci. *Int. J. Antimicrob.Agents*, v. 31, n. 6, p. 549-554, 2008.

SUTCLIFFE, J. et al. Detection of erythromycin-resistant determinantsby PCR. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 40, p. 2562-2566, 1996.

TALEBI, M. et al. Molecular structure and transferability of *Tn1546-like* elements in *Enterococcus faecium* isolates from clinical, sewage, and surface water samples in Iran. *Appl. Environm.Microbiol.*, v. 74, p. 1350-1356, 2008.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

TART, A.H.; WOZNIAK, D.J. Shifting paradigms in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm research. In:*Bacterial Biofilms* (ed. Romeo T.) Springer, Heidelberg. p. 193–206, 2008.

TEIXEIRA, L.M. et al. *Enterococcus*. In: JORGENSEN, J.H. et al. (Org) MCM, 11th ed. ASM Press. Washington DC, EUA. p. 403-421, 2015.

TELGMANN, U.; HORN, H.; MORGENROTH, E. Influence of growth history on sloughing and erosion from biofilms. *Water Res.*, v. 38, p. 3671-3684, 2004.

TENDOLKAR, P.M. et al. Enterococcal surface protein Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis. Infect. Immun.*, v. 72, p. 6032–6039, 2004.

TENDOLKAR, P.M.; BAGHDAYAN, A.S.; SHANKAR, N. The N-terminal domain of enterococcal surface protein, Esp, is sufficient for Esp-mediated biofilm enhancement in *Enterococcus faecalis. J. Bacteriol.*, v.187, p. 6213–6222, 2005.

THOMAS, V.C. A fratricidal mechanism is responsible for eDNA release and contributes to biofilm development of *Enterococcus faecalis*. *Mol. Microbiol.*, v. 72, n. 4, p. 1022-1036, 2009.

THURLOW, L.R. et al. Gelatinase contributes to the pathogenesis of endocarditis caused by *Enterococcus faecalis*. *Infect. Immun.*, v.78, p. 4936-4943, 2010.

THURLOW, L.R. et al. *Staphylococcus aureus* biofilms prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation in vivo. *J. Immunol.*, v. 186, n. 11, p. 6585-6596, 2011.

TOLEDO-ARANA, A. et al. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl. Environm. Microbiol.*,v. 67, p. 4538–4545, 2001.

TOP, J. et al. Emergence of clonal complex 17 *Enterococcus faecium* in the Netherlands. J. *Clin. Microbiol.*, v. 46, p. 214-219, 2008.

TOP, J.; WILLEMS, R.; BONTEN, M. Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen. *FEMS Immunol.Med. Microbiol.*, v. 52, n. 3, p. 297-308, 2008.

TOP, J.et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, a novel typing scheme to study the genetic relatedness and epidemiology of *Enterococcus faecium* isolates. *J. Clin.Microbiol.*, v. 42, p. 4503-4511, 2004.

TORELL, E. et al. Clonality among ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* isolates in Sweden and relationship with ciprofloxacin resistance. *Clin. Microbiol. Infect.*, v.9, p. 1011-1019, 2003.

TORMO, M.A. et al. *Staphylococcus aureus* pathogenicity island DNA is packaged in particles composed of phage proteins. *J. Bacteriol.*, v. 190, p. 2434-2440, 2008.

TOUCHON, M.; ROCHA, E.P. Causes of insertion sequences abundance in prokaryotic genomes. *Mol. Biol. Evol.*, v. 24, n. 4, p. 969-981,2007.

TRAN, T.T. et al. Whole-genome analysis of a daptomycin-susceptible *Enterococcus faecium* strain and its daptomycin-resistant variant arising during therapy. *Antimicrob Agents Chemother.*, v.57, n. 1, p. 261-268, 2013.

TREITMAN, A.N. Emerging incidence of *Enterococcus faecium* among hospital isolates. J. Clin. Microbiol., v. 43, p. 462-463, 2005.

TSOURKAS, P.K. et al. Complete genome sequences of nine phages capable of infecting *Paenibacillus larvae*, the causative agent of american foulbrood disease in honeybees. *Genome Announc.*, v. 3, n. 5, p. e01120-15, 2015.

URISH, K.L. et al. Antibiotic-tolerant *Staphylococcus aureus*biofilm persists on arthroplasty materials. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, v.474, n. 7, p. 1649-1656, 2016.

UTTLEY, A.H.et al. Vancomycin-resistant enterococci. Lancet, v. 1, p. 57-58, 1988.

VALDEZATE, S. et al. Large clonal outbreak of multidrug-resistance CC17 ST17 *Enterococcus faecium* containing Tn5382 in a Spanish hospital. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 63, p. 17-20, 2009.

VAN HAL, S.J. et al. Evolutionary dynamics of *Enterococcus faecium* reveals complex genomic relationships between isolates with independent emergence of vancomycin resistance.*Microb.Genom.*, v. 2, n. 1,doi:10.1099/mgen.0.000048, 2016.

VAN HAL, S.J.et al. Polyclonal emergence of *vanA* vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Australia. *J. Antimicrob.Chemother.*, v. 28, p. pii:dkw539, 2016.

VAN SCHAIK, W.; WILLEMS, R.J. Genome-based insights into the evolution of enterococci. *Clin. Microbiol. Infect.*, v. 16, n. 6, p. 527-532, 2010.

VAN SCHAIK, W.et al. Pyrosequencing-based comparative genome analysis of the nosocomial pathogen *Enterococcus faecium* and identification of a large transferable pathogenicity island. *BMC Genomics*, v. 11, p. 239, 2010.

VAN TYNE, D.; GILMORE, M.S. Friend turned foe: evolution of enterococcal virulence and antibiotic resistance. *Ann. Rev. Microbiol.*, v. 68, p. 337-356, 2014.

VAN WAMEL, W.J. et al. The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on beta-hemolysin-converting bacteriophages. *J. Bacteriol.*, v. 188, p. 1310-1315, 2006.

VAN'T HOF, R.J.; RALSTON, S.H. Cytokine-induced nitric oxide inhibits bone resorption by inducing apoptosis of osteoclast progenitors and suppressingosteoclast activity. *J. Bone Mineral Res.*, v..12, p.1797-1804,1997.

VANCANNEYT, M. et al. Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. *Appl. Environm.Microbiol.*, v.68, n. 3, p. 1381-1391, 2002.

VANKERCKHOVEN, V. et al. Genotypic diversity, antimicrobial resistance, and virulence factors of human isolates and probiotic cultures constituting two intraspecific groups of *Enterococcus faecium* isolates.*Appl. Environm.Microbiol.*, v. 74, n. 14, p. 4247-4255, 2008.

VANKERCKHOVEN, V.et al. Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. J. Clin. Microbiol., v. 42, n. 10, p. 4473-4479, 2004.

VAZQUEZ-TORRES, A. et al. Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxidesynthase in experimental salmonellosis. I. Effects on microbial killing byactivated peritoneal macrophages in vitro. *J. Exp. Med.*, v. 192, n. 2, p. 227-236, 2000.

VERGIS, E.N.et al. Association between the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin, and enterococcal surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. *Clin. Infect. Dis.*, v. 35, p. 570–575, 2002.

VILELA, M.A. et al. Identification and molecular characterization of Van A-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in northeast of Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 101, n. 7, p. 715-719, 2006.

VON HEIJNE, G. Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J Mol Biol.*, v. 225, n. 2, p. 487-494, 1992.

WALKER, T.S. et al. Enhanced*Pseudomonas aeruginosa* biofilm development mediated by human neutrophils. *Infect. Immun.*, v.73, n. 6, p. 3693-3701, 2005.

WANG, D.Z. et al. Environmental microbial community proteomics: status, challenges and perspectives. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 17, n. 8, p. pii:E1275, 2016.

WANG, J.C. DNA topoisomerases. Annu. Rev. Biochem., v. 65, p. 635–692, 1996.

WANG, Y. et al. Comparative proteomic analysis of *Streptococcus suis* biofilms and planktonic cells that identified biofilm infection-related immunogenic proteins. *PLoS One*,v. 7, n. 4, p. e33371,2012.

WANG Y. et al. Maspin inhibits macrophage phagocytosis and enhances inflammatory cytokine production via activation of NF-κB signaling. Mol Immunol. 82:94-103. Feb. 2016.

WARDAL, E.et al. Diversity of plasmids and Tn1546-type transposons among VanA *Enterococcus faecium* in Poland. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v.36, n. 2, p. 313-328, 2017.

WATANABE, S. et al. Genetic diversity of Enterococci harboring the high-level gentamicin resistance gene *aac(6')-le-aph-(2")-la* or *aph(2")-le* in a Japanese hospital. *Microb. Drug Resist.*, v.15, p. 185–194, 2009.

WATNICK, P.; KOLTER, R. Biofilm, city of microbes. J. Bacteriol., v.182, n. 10, p. 2675-2679, 2000.

WATTERS, C. et al. Host responses to biofilm. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, v. 142, p. 193-239, 2016

WEIGEL, L.M. Genetic analysis of a high level vancomycin resistant isolate for *Staphylococcus aureus*. Science 302, 1569–1571. 2003

WEIGEL, L.M. et al. High-Level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with a polymicrobial biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 51, p. 231–238. 2017.

WELIN, J.et al. Protein expression by *Streptococcus mutans* during initial stage of biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 70, p. 3736–3741, 2004.

WERNER, G. et al. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Eurosurveillance*, v.20, p. 13, 2008.

WERNER, G. et al. IS element IS16 as a molecular screening tool to identify hospitalassociated strains of *Enterococcus faecium*. *BMC Infect*. *Dis.*, v.11, p. 1–8, 2011.

WERNER, G.et al. High-level ciprofloxacin resistance among hospital-adapted *Enterococcus faecium* (CC17). *Int. J. Antimicrob. Agents*, v. 35, p. 119–125, 2010.

WESTALL, F.et al.Early Archean fossil bacteria and biofilms in hydrothermally-influenced sediments from the Barberton greenstone belt, South Africa.*Precambrian Res.*, v. 106, p. 93–116,2001.

WHO. World Health Organization. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. disponível em http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25FebET_NM_WHO.pdf?ua=1, acesso em Março 2017.

WILLEMS, R.J.L. et al. Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. *Emerg. Infect. Dis.*,v. 11, p. 821-828, 2005.

WILLEMS, R.J.L. et al. Molecular diversity and evolutionary relationships of Tn1546-like elements in enterococci from humans and animals. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 43, p. 483-491, 1999.

WILLEMS, R.J.L. Population biology of Gram-positive pathogens: high-risk clones for dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 35, p. 872–900, 2011.

WILLEMS, R.J.L.; VAN SCHAIK, W. Transition of *Enterococcus faecium* from commensal organism to nosocomial pathogen. *FutureMicrobiol.*, v.4, p. 1125–1135, 2009.

WIRTH R. Sex pheromones and gene transfer in *Enterococcus faecalis*. *Res Microbiol.*, v. 151, p. 493-496, 2000.

WITKO-SARSAT V. et al. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab.Invest.*, v.80, p. 617–653, 2000.

WOHLKONIG, A. et al. Structural basis of quinolone inhibition of type IIA topoisomerases and target-mediated resistance. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, v. 17, p. 1152–1153, 2010.

WOODFORD, N. Epidemiolgy of the genetic elements responsible for acquired glycopeptide resistance in enterococci. *Microb. Drug Resist.*, v. 7, p. 229-235, 2001.

WRIGHT, G.D.et al. Purification and characterization of VanR and the cytosolic domain of VanS: a two-componentregulatory system required for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147. *Biochemistry*, v. 32, p. 5057–5063, 1993.

WU, X.et al Potential for hydrogen-oxidizing chemolithoautotrophic and diazotrophic populations to initiate biofilm formation in oligotrophic, deep terrestrial subsurface waters. *Microbiome*, v. 5, n. 1, p. 37, 2017.

WU, X.et al. Prevalence of virulence and resistance to antibiotics in pathogenic enterococci isolated from mastitic cows. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 78, n. 11, p. 1663-1668, 2016. XU X. et al. *vanM* a new glicopeptide resistance gene cluster in *Enterococcus faecium*.*Antimicrob. Agents Chemother.*, v.54, p. 4643–4647, 2010.

YAMAMOTO M.et al.changes in surgical site infections after living donor liver transplantation. *PLoS One.*, v. 10, n. 8, p. e0136559, 2015.

YANG J.X.et al. Molecular characterization of resistance, virulence and clonality in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*: a hospital-based study in Beijing, China. *Infect. Gen. Evol.*, v. 33, p. 253-260, 2015.

YASMIN, A. et al.Comparative genomics and transduction potential of *Enterococcus faecalis*temperate bacteriophages. J. Bacteriol., v. 192, n. 4, p. 1122-1130, 2010.

YAZGI, H. et al. A comparison of high-level aminoglycoside resistance in vancomycin-sensitive and vancomycin-resistant *Enterococcus* species. J. Int. Med. Res., v. 30, p. 529–534, 2002.

YI, L. et al. Biofilm formation of *Streptococcus equissp. zooepidemicus* and comparative proteomic analysis of biofilm and planktonic cells. *Curr. Microbiol.*, v. 69, n. 3, p. 227-233, 2014.

YIM, J.; SMITH, J.R.; RYBAK, M.J. Role of combination antimicrobial therapy for vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*infections: review of the current evidence. *Pharmacotherapy*,doi:10.1002/phar.1922, March 2017.

YOSHIDA, H. et al. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase gyrB gene of *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother., v.35, p. 1647–1650, 1991.

YOUSIF, A.; JAMAL, M.A.; RAAD, I. Biofilm-based central line-associated bloodstream infections. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 830, p. 157-179, 2015.

ZANELLA, R.C. et al. First confirmed case of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* with VanA phenotype from Brazil: isolation from a meningitis case in São Paulo. *Microb. Drug Resist.*, v. 5, p. 159-162, 1999.

ZAPUN, A.; CONTRERAS-MARTEL, C.; VERNET, T. Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. *FEMS Microbiol. Rev.*,v. 32, p. 361-385, 2008.

ZARRILLI, R.et al. Molecular epidemiology of high-level aminoglycoside-resistant enterococci isolated from patients in a university hospital in southern Italy. *J. Antimicrob.Chemother.*, v. 56, n. 5, p. 827-835, 2005.

ZHANG, L. et al. Molecular investigation of bacterial communities on intravascular catheters: no longer just *Staphylococcus. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 33, n. 7, p. 1189-1198, 2014.

ZHANG, L.et al. Microbial biofilms associated with intravascular catheter-related bloodstream infections in adult intensive care patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect.Dis.*, v. 35, n. 2, p. 201-205, 2016.

ZHU, X. et al. Molecular characterization of outbreak-related strains of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from an intensive care unit in Beijing, China. *J. Hosp. Infect.*, v.72, p.147-154, 2009.

ZOU, J.; SHANKAR, N. Surface protein Esp enhances pro-inflammatory cytokine expression through NF-κB activation during enterococcal infection. *Innate Immun.*, v. 22, n. 1, p. 31-39, 2016.

ZOU, J.; SHANKAR, N. The opportunistic pathogen *Enterococcus faecalis* resistsphagosome acidification and autophagy to promote intracellular survival in macrophages.*Cell. Microbiol.*, v.18, n. 6, p. 831-843, 2016.

ZOU, L.K. et al. Erythromycin resistance and virulence genes in *Enterococcus faecalis* from swine in China. *New Microbiol.*, v. 34, n. 1, p. 73-80, 2011.