

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**ANÁLISE TRANSCRICIONAL DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DE
*Enterococcus faecalis***

TIANE MARTIN DE MOURA
Doutora em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.
Janeiro de 2014.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**ANÁLISE TRANSCRICIONAL DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DE
*Enterococcus faecalis***

Tiane Martin de Moura
Doutora em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – ICBS/UFRGS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente como um dos requisitos para a obtenção do Grau de Doutor em Microbiologia Agrícola e do Ambiente na Área de Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Guedes frazzon

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.
Janeiro de 2014.

CIP - Catalogação na Publicação

Martin de Moura, Tiane
ANÁLISE TRANSCRICIONAL DOS FATORES DE VIRULÊNCIA
DE *Enterococcus faecalis* / Tiane Martin de Moura. --
2014.
101 f.

Orientador: Ana Paula Guedes Frazzon.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. *Enterococcus faecalis*. 2. Fatores de
virulência. 3. Resistência antimicrobiana. 4.
Enterococos Vancomicina Resistente. 5. Biofilme. I.
Guedes Frazzon, Ana Paula, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

TIANE MARTIN DE MOURA
NUTRICIONISTA
UFPEL

TESE

Submetida como parte dos requisitos
Para obtenção do Grau de

DOUTOR EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

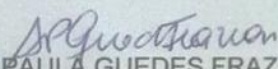
Instituto de Ciências Básicas da Saúde

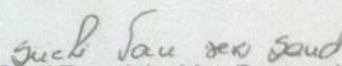
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

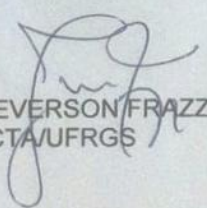
Porto Alegre (RS), Brasil

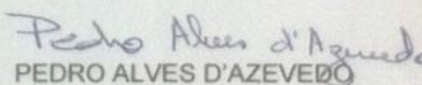
Aprovada em: 10/01/2014
Pela Banca Examinadora

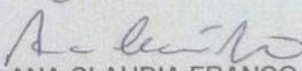
Homologado em: 27/02/2014
Por:

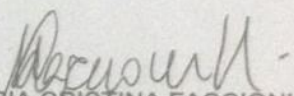

ANA PAULA GUEDES FRAZZON
Orientadora ICBS-UFRGS


Sueli Teresinha Van Der sand
Coordenadora do PPGMAA


JEVERSON FRAZZON
ICTA/UFRGS


PEDRO ALVES D'AZEVEDO
UFCSPA


ANA CLAUDIA FRANCO
ICBS/UFRGS


MARIA CRISTINA FACCIÓNI HEUSER
Diretora do ICBS - UFRGS

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a meus orientadores no plano espiritual pela proteção e pela iluminação na escolha do caminho a seguir. Agradeço pelas oportunidades proporcionadas por esta escolha e pelas pessoas que caminharam comigo. Analisando a colheita, acho que plantei coisas boas.

Agradeço à minha querida orientadora Profa. Dra. Ana Paula Guedes Frazzon, a Aninha, por ter me recebido de braços abertos lá em 2009, como sua aluna de mestrado, e ter me confiado mais esta responsabilidade. Saiba que é uma honra ser tua primeira Doutora formada. Sabemos que um Doutor não se faz da noite para o dia, e acho crescemos juntas nestes 5 anos de agradável, divertida e proveitosa convivência. Nossa parceria só evoluiu! Muito obrigada pelas orientações, pelo empenho dedicado, pelos ensinamentos transmitidos, pelas ideias trocadas e complementadas em fração de segundos, pela paciência e pelo incentivo a ir em frente e principalmente pelos desafios propostos. Fora a vida acadêmica, eu agradeço também pelos abraços sempre bem apertados, pelas conversas paralelas, pelos conselhos, pelas risadas, pela preocupação de mãe, pelo carinho e conforto de tua amizade sempre presente.

Agradeço à Prof. Dra. Ana Cláudia Franco, ao Prof. Dr. Paulo Roehe e à equipe do Laboratório de Virologia (Lab. 208) por terem deixado as portas abertas para a realização de mais um trabalho, pela confiança, pelas dúvidas levantadas, pela troca de informações e pela amizade.

Agradeço ao Prof. Dr. Jeverson Frazzon por também ter apostado em mim para este projeto desafiador. Embora o *grand finale* não seja concluído por mim, deixei tudo prontinho para o próximo escolhido. Obrigada pela oportunidade, pela ajuda e contribuição, pelas dicas de leituras que apareciam no meu e-mail e pela amizade.

Agradeço ao Prof. Dr. Pedro d'Azevedo por ter aberto as portas do Laboratório de Cocos Gram-positivos da UFCSPA para que pudéssemos complementar e realizar nossa pesquisa, pelos fomentos trocados e, principalmente, pelos isolados cedidos e pela vancomicina. Obrigada pela oportunidade.

Agradeço às gurias do Laboratório de Micologia (Lab. 209) por terem me aguentado nestes últimos anos e terem dividido comigo as incertezas e alegrias de mais uma caminhada rumo ao desconhecido. Obrigada pelo apoio, pela ajuda e pelos mates, espero ter contribuído de alguma forma na vida de vocês assim como contribuíram na minha.

Agradeço à Prof. Dra. Sueli Van Der Sand pela colaboração em mais uma etapa concluída e ao pessoal do Lab. 164 sempre tão prestativos comigo.

Agradeço aos colegas do grupo por me permitirem participar e contribuir com seus projetos. Saibam que eu lucrei mais que vocês com esta parceria.

As amizades feitas no trabalho também nos acompanham na vida pessoal e torcem por nossa felicidade. Mica, Nai, Dani, Dejo, Lica, Marthinha, Thatá e Ju: obrigada a vocês que fazem minha caminhada ser mais leve e alegre. Obrigada por tantas discussões científicas sobre a vida acompanhadas de um bom chimarrão ou de um pastel com cerveja no Xirú. Nossos caminhos estão tomando seus rumos, cada uma está seguindo para o seu lado, mas todas nós levaremos um pouco de cada uma no coração e sempre teremos a oportunidade do reencontro. Sucesso e felicidades a todas nós!

Agradeço aos amigos do peito, daqui ou de lá, que se fizeram presentes nos momentos mais difíceis desta caminhada, mesmo que somente em pensamento, pelos dias/meses/anos de espera, pelos encontros e desencontros vividos nesta jornada, pela saudade e pela amizade.

Agradeço à minha família, que mesmo sem entender o que eu faço, se enche de orgulho a cada retorno meu. A meus pais, Eloino e Ivany, primeiro eu peço desculpas pelas inúmeras vezes que tiveram que abrir mão de momentos de convívio nos quais a ausência se fez presente e sentida, embora compreendida. Agradeço por toda a dedicação e esforços dispendidos para que hoje eu estivesse aqui, pelo respeito, admiração, apoio e amor incondicional.

Ao maridão Fabrício, um agradecimento especial por todo carinho, dedicação, compreensão, pelos puxões de orelha e pela paciência e companhia nos momentos mais difíceis. Desculpe as caras feias (que nem sempre eram de fome), a falta de tato, meus momentos “filha única”, meus chororôs e minha chatice, tudo isso foi culpa dos meus hormônios! Agradeço também pelas alegrias e conquistas pessoais e profissionais nestes anos de vida compartilhada. Ao Dr. Campos eu agradeço pela parceria e consultoria científica domiciliar.

Agradeço às instituições UFRGS e UFCSPA e aos funcionários, professores, colegas destas instituições que contribuíram para a realização deste trabalho. Um agradecimento especial para a Grasi: Obrigada por tudo, querida!

Agradeço aos órgãos de fomento CAPES e CNPq pelos recursos investidos para a realização deste projeto.

Às pessoas citadas aqui: vocês foram companheiros e amigos, esteios na minha exaustão, ânimo em minhas incertezas. A cada uma de vocês cabe uma parcela deste grau que hoje conquisto.

ANÁLISE TRANSCRICIONAL DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Enterococcus faecalis*

Autor: Tiane Martin de Moura

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Guedes Frazzon

RESUMO

Enterococcus faecalis estão entre as principais causas de infecções hospitalares em todo o mundo e é uma das mais importantes na área clínica devido à presença de inúmeros fatores de virulência que reforçam sua patogenicidade. Estudos mostram que concentrações subinibitórias de antimicrobianos podem alterar a resposta transcricional e fenotípica de bactérias, porém pouco se sabe sobre como a vancomicina pode afetar a expressão gênica nos microrganismos portadores de seus genes de resistência (genes *van*). Portanto, este trabalho objetivou avaliar presença e expressão de genes *vanC* em *E. faecalis* vancomicina-susceptíveis e avaliar o comportamento de isolados Enterococos Vancomicina-Resistentes (EVR) na ausência e presença de concentrações subinibitórias de vancomicina por PCR quantitativa. Identificamos a presença e a expressão de genes *vanC* em *E. faecalis* vancomicina-susceptíveis, sendo estes genes específicos para as espécies *Enterococcus gallinarum* e *Enterococcus casseliflavus*, sugere-se que o *E. faecalis* possa tê-los adquirido por transferência horizontal. Verificamos que a presença de vancomicina *in vitro* é capaz de interferir na modulação de genes de virulência em isolados EVR, porém não interfere na formação de biofilme destes isolados. Embora os dados aqui apresentados refiram-se a testes *in vitro*, podemos inferir que os genes *vanC* estão sendo transferidos para outras espécies e que a vancomicina pode estar contribuindo para o aumento na expressão de fatores de virulência *in vivo*, levando ao agravamento de quadros clínicos.

¹Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Biologia Celular e Molecular, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (101 p.) Janeiro, 2014.

TRANSCRIPTIONAL ANALYSIS OF THE VIRULENCE FACTORS OF *Enterococcus faecalis*¹

Author: Tiane Martin de Moura

Advisor: Profa. Dra. Ana Paula Guedes Frazzon

ABSTRACT

Enterococcus faecalis are among the leading causes of nosocomial infections worldwide and is one of the most important in the clinical area due to the presence of numerous virulence factors that enhance the pathogenicity. Studies show that sub-inhibitory concentrations of antibiotics can alter the transcriptional and phenotypic response of bacteria, but little is known about the effect of vancomycin in gene expression in microorganism bearers of their resistance genes (genes *van*). Therefore, this study aimed to evaluate the presence and expression of *vanC* genes in *E. faecalis* vancomycin susceptible and evaluate the behavior of vancomycin resistant enterococci (VRE) strains in the absence and presence of sub-inhibitory concentrations of vancomycin for Quantitative-PCR. We have identified the presence and expression of *vanC* genes in *E. faecalis* which are specific to *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus* species, it is suggested that the *E. faecalis* may have acquired these genes by horizontal gene transfer. We found that the presence of vancomycin *in vitro* is able of interfering with modulation of expression of virulence genes in VRE strains but does not interfere in the biofilm formation of these isolates. Although the data presented here were obtained from *in vitro* tests, we can infer that the *vanC* genes are being transferred to other species and that vancomycin may be contributing to the increase in the expression of virulence factors *in vivo*, leading to worseres clinical outcomes.

¹Doctoral Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology, Cell and Molecular Biology, Health Basic Sciences Institute Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. (101 p.) January, 2014.

SUMÁRIO

RELAÇÃO DE TABELAS	x
RELAÇÃO DE FIGURAS	xi
RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xii
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO.....	1
1.2 Justificativa e Objetivos Gerais.....	2
1.2.1 Objetivos específicos	3
CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1. O gênero <i>Enterococcus</i>	5
2.2 Importância Clínica	6
2.2.1 Infecção do Trato Urinário	7
2.3 Resistência a antimicrobianos	8
2.3.1 Resistência a Glicopeptídeos - Vancomicina.....	10
2.3.2 Rotas de Disseminação de EVR.....	15
2.4 Fatores de Virulência.....	17
2.4.1 Adesina de colágeno de <i>Enterococcus faecalis</i> (Ace)	18
2.4.2 Substância de Agregação Asc10.....	20
2.4.3 Operon <i>bopABCD</i>	23
2.5 Biofilme	26
2.5.1 Etapas de Formação de Biofilme	27
2.6. Cofatores Ferro-Enxofre [Fe-S] – Estrutura e Função	30
2.6.1 Maquinaria de biogêneses do cofator [Fe-S].....	34
2.6.2 Sistema SUF (<i>sulfur assimilation</i>) e sua regulação	35

CAPÍTULO 3. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
CAPÍTULO 4. RESULTADOS.....	40
4.1 Detection of <i>vanC</i> ₁ gene transcription in vancomycin susceptible <i>Enterococcus faecalis</i>	41
4.2 Influence of vancomycin subinhibitory concentration on the <i>in vitro</i> expression of biofilm formation and virulence-related genes in <i>Enterococcus faecalis</i> VRE	46
CAPÍTULO 5. DISCUSSÃO GERAL.....	67
CAPÍTULO 6. CONCLUSÕES.....	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

RELAÇÃO DE TABELAS

TABELA	Nome	Pág.
TABELA 1.	Lista dos aditivos proibidos na alimentação animal e legislação correspondente.....	16

RELAÇÃO DE FIGURAS

FIGURA N°	Nome	Pág.
FIGURA 1.	Principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos em enterococos.....	9
FIGURA 2.	Resistência a glicopeptídeos tipo VanC.....	13
FIGURA 3.	Cluster <i>VanA</i> que confere alta resistência à vancomicina.....	14
FIGURA 4.	Principais vias de transmissão hospitalar de enterococos vancomicina-resistentes.....	16
FIGURA 5.	Representação esquemática de Ace.....	19
FIGURA 6.	Mapa esquemático da proteína Asc10.....	21
FIGURA 7.	Esquema do sistema regulatório de expressão da proteína Asc10.....	22
FIGURA 8.	Representação esquemática do operon <i>bopABCD</i> em <i>Enterococcus faecalis</i>	24
FIGURA 9.	Esquema do operon <i>frs</i> em <i>Enterococcus faecalis</i>	24
FIGURA 10.	Operon <i>fsrABCD</i> mediando o controle do operon <i>bopABCD</i>	25
FIGURA 11.	Diagrama ilustrando o desenvolvimento de um biofilme.....	29
FIGURA 12.	Resumo das proteínas e estruturas associadas ao biofilme em enterococos.....	30
FIGURA 13.	Compostos de enxofre que utilizam a forma enxofre persulfidico como fonte de enxofre.....	32
FIGURA 14.	Cofatores [Fe-S].....	32
FIGURA 15.	Maquinaria <i>sufCDSUB</i> de <i>Enterococcus faecalis</i>	36

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%: Porcentagem
°C: Graus Celsius
µg: micrograma
µL: microlitro
µm: micrometro
2xYT-U: Caldo 2xYT acrescido de urina
Ace: Adesina de Colágeno de *Enterococcus faecalis*
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AS: Aggregation Substance
Asa1: Substância de Agregação Asa1
Asc10: Substância de Agregação Asc10
Asp1: Substância de Agregação Asp1
ATCC: American Type Culture Collection
BHI: Infusão de Cérebro-Coração
Blast: Basic Local Alignment Search Tool
BOP: Biofilm on Plastic Surfaces
CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAUTI: catheter-associated infection urinary tract infections -
cCF10: peptídeo feromônio do plasmídeo CF10
CDC: Centers for Disease Control and Prevention
cDNA: DNA Complementar
CIM: Concentração Inibitória Mínima
CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute
CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Da: Dalton
D-Ala: D-Alanina
D-Lac: D-Lactato
D-Ser: D-Serina
DFC: Drug-Free condition
DFPA: Departamento de Fiscalização e Fomento da Produção Animal-
DNA: Ácido Desoxirribonucleico
EVR: Enterococos Vancomicina-Resistente
FAPERGS: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul.
Fe-S: Ferro-Enxofre
GenBank: Banco de Dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information)
HAI: Healthcare-Associated Infections
ICBS: Instituto de Ciências Básicas da Saúde
iCF10: Inibidor do feromônio cCF10
IRAS: Infecção Relacionada à Assistência à Saúde
ISC: Iron Sulfur Cluster
ITU: Infecções no Trato Urinário
KDa: Kilo Dalton
MAPA: MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO
mg: miligrama
MIC: Minimal Inhibitory Concentration
Min.: minutos
mL: mililitro
mM: milimolar
MSCRAMM: Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules
ng: Nanogramas
NIF: Nitrogen Fixation
nm: nanometro
OD: Optical Density

bp: Base Pairs
pCF10: plasmídeo CF10
PCR: reação em cadeia da polimerase
PF: Oligonucleotídeo —Forward
pH: Potencial de Hidrogênio Iônico
PR: Oligonucleotídeo —Reverse
qPCR: PCR quantitativo
RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA
RNA: Ácido Ribonucleico
ROS: Espécies Reativas de Oxigênio
rRNA: Ácido Ribonucléico ribossomal
RS: Rio Grande do Sul
RT-PCR: PCR via Transcriptase Reversa
SDS: Dodecil Sulfato de Sódio
SIC: Subinhibitory Concentrations
SS: Sequência Sinal
SUF: Sulfur Assimilation
TGI: Trato Gastrointestinal
TGU: Trato Geniturinário
UFCSPA: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul
VAN: Vancomicina
VC: Vancomycin Condition

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

Os enterococos constituem um grupo de microrganismos amplamente distribuído no ambiente e considerado comensais da microbiota dos tratos gastrointestinal e geniturinário, cavidade oral de humanos e animais, porém também são encontrados no solo, em alimentos e na água, sendo que algumas espécies podem causar infecções em humanos e animais.

Enterococos são considerados patógenos oportunistas, estando entre as principais causas de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde (IRAS) em todo o mundo. Eles fazem parte dos patógenos oportunistas mais frequentemente isolados de infecções da corrente sanguínea e do trato urinário, além de representarem a causa mais frequente de infecções em sítios cirúrgicos em pacientes internados em unidades de terapia intensiva.

Dentro do gênero *Enterococcus* sp. as espécies *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* são as espécies mais importantes na área clínica, no entanto *E. faecalis* é predominante. Este predomínio está relacionado à presença de vários fatores de virulência, em comparação com as demais espécies de enterococos, que possibilita a esta espécie vantagens no processo de adaptação. Fatores de virulência são estruturas, produtos ou estratégias que permitem a um microrganismo colonizar, invadir, evitar o

sistema imune e causar dano tecidual ao hospedeiro e também genes de resistência. Os genes de virulência podem facilmente ser transmitidos entre linhagens de enterococos, já que muitos residem em plasmídeos conjugativos, que são facilmente disseminados em um ambiente natural como o trato gastrointestinal.

Tem sido observado um aumento na incidência de enterococos resistentes a antimicrobianos devido ao uso abusivo de antimicrobianos na agricultura e na clínica médica. Entre os relevantes fenótipos de resistência, estão os associados a níveis elevados de resistência aos glicopeptídeos, como a vancomicina. O número de casos de infecções envolvendo Enterococos Vancomicina-Resistente (EVR) vem aumentando em âmbito mundial e sabe-se que a maioria das infecções por este patógeno ocorre em hospitais.

Vários estudos têm mostrado que antimicrobianos em concentrações subinibitórias podem alterar a resposta fenotípica e transcricional de bactérias patogênicas, como o *E. faecalis*. O mecanismo de ação da vancomicina já está elucidado, no entanto pouco se sabe sobre como este antibiótico pode afetar a expressão gênica nos microrganismos portadores de seus genes de resistência (genes *van*) em condição de estresse gerada por sua presença.

1.2 Justificativa e Objetivos Gerais

Diante do exposto, verificou-se a necessidade de um experimento que simulasse *in vitro* a condição fisiológica de uma infecção urinária para avaliar o comportamento de isolados EVR em condições normais de crescimento e na presença de concentrações subinibitórias de vancomicina. Para este estudo foram utilizados isolados de *E. faecalis* isoladas de infecções

urinárias, previamente identificadas como portadoras do gene de resistência *vanA*, e foram escolhidos genes de virulência envolvidos nas etapas de adesão e agregação celular, na formação de biofilme e na maquinaria de biossíntese de cofatores [Fe-S].

Paralelamente ao experimento principal, foi identificada a presença de genes *vanC* em isolados de *E. faecalis* vancomicina-susceptíveis. Neste estudo foram avaliadas a expressão dos genes *vanC₁* e *vanC_{2/3}* em *E. faecalis* isoladas de cloacas de frangos vancomicina-susceptíveis.

1.2.1 Objetivos específicos

- Verificar a presença de genes de resistência *van* em isolados *E. faecalis* oriundos de animais de criação e de sítios clínicos de humanos por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)
- Verificar a concentração inibitória mínima (CIM) de vancomicina em isolados portadores de genes *van*
- Verificar o perfil de susceptibilidade a teicoplanina em isolados de portadores de genes *van*
- Avaliar a presença de transcritos dos genes *vanC₁* e *vanC_{2/3}* por reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) em *E. faecalis* vancomicina-susceptíveis
- Avaliar a formação de biofilme em cepas clínicas EVR em diferentes concentrações de urina
- Avaliar a formação de biofilme em cepas clínicas EVR na ausência e na presença de concentração subinibitória de vancomicina

- Analisar a expressão *in vitro* dos genes do operon *bopABCD*, *ace*, *acs10*, *fur* e *oxyR* em isolados EVR em meio contendo urina na ausência e na presença de concentração subinibitória de vancomicina por PCR Quantitativo (qPCR).

CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O gênero *Enterococcus*

Este gênero já foi classificado como estreptococos do grupo D segundo a classificação de Lancefield, contudo, em 1984 através de estudos de hibridização de DNA-DNA e DNA-rRNA realizados por Schleifer e Kilpper-Bälz, foi demonstrado que este gênero possuía um perfil genotípico distante de *Streptococcus*, sendo então criado o gênero *Enterococcus* (Schleifer & Kilpper-Bälz, 1984; Murray, 1990; Ogier & Serror, 2008).

Os enterococos constituem um complexo e vasto grupo composto até o momento por 51 espécies (Euzéby, 2013), amplamente distribuídas no ambiente e consideradas comensais da microbiota do trato gastrointestinal (TGI), trato geniturinário (TGU) e cavidade oral de humanos e animais, sendo também encontrados no solo, em alimentos e na água (Stobberingh et al., 1999; Koneman et al., 2001; Teixeira & Facklam, 2003; Foulquié Moreno et al., 2006).

Os microrganismos representantes deste gênero apresentam-se na forma esférica ou ovoide com dimensões variando entre 0,6 - 2,5 μm , arranjados aos pares ou em cadeias curtas e não são formadores de esporos (Murray, 1990; Fisher & Phillips, 2009). São organismos Gram-positivos,

anaeróbios facultativos, catalase-negativos e apresentam uma fisiologia ruda que lhe permite resistir a estresse oxidativo e condições adversas. Os enterococos têm a capacidade de crescer em ampla faixa de temperatura (10 a 45 °C) e sobreviver a 60 °C por 30 minutos, tolerar ampla variação de pH (4,0 – 9,6), sobreviver e multiplicarem em meios contendo elevadas concentrações de cloreto de sódio (acima de 6,5%) e sais biliares (40%) (Sherman et al., 1937; Flahaut et al., 1998; Koneman et al., 2001; Hew et al., 2007).

2.2 Importância Clínica

Por ser um gênero comensal humano, as infecções enterocócicas já foram consideradas de origem endógena: partindo-se da translocação bacteriana através das células epiteliais do intestino através de nódulos linfáticos e espalhando-se para outros locais no corpo (Franz et al., 1999). Porém, estudos mostraram que a maioria das infecções parece ser adquirida pela forma exógena, como na transferência de microrganismos de paciente para paciente ou na aquisição de patógenos através do consumo de água ou alimentos contaminados (Kayser, 2003; Arias & Murray, 2012).

Os enterococos podem atuar como patógenos oportunistas, causando infecções em pacientes hospitalizados por um longo período de tempo e/ou que receberam múltiplas terapias antimicrobianas (Cetinkaya et al., 2000; Dahlén et al., 2000; Reis et al., 2001; Teixeira & Facklan, 2003). Entre os anos 70 e 80, o gênero foi considerado um importante patógeno hospitalar (Jett et al., 1994), atualmente, os enterococos ainda estão entre as principais causas de infecções entre pacientes hospitalizados, principalmente naqueles sob

terapia antimicrobiana por algum tempo (NNIS, 1999; Richards et al., 2000; Wisplinghoff et al., 2004; Bender et al., 2010; Sievert et al., 2013).

Outro fator importante para o reconhecimento da importância clínica dos enterococos é a sua resistência intrínseca e adquirida a diferentes antimicrobianos, contribuindo para sua adaptação em ambientes adversos e favorecendo a colonização do trato gastrointestinal, além de posterior transmissão entre pacientes (Gilmore et al., 2013).

Enterococcus faecalis e *Enterococcus faecium* são as espécies mais importantes na área clínica em humanos, sendo *E. faecalis* predominante em 85 a 90% dos casos (Tavares, 2000; Kayaoglu et al., 2004). A espécie *E. faecalis* é conhecida por ser mais virulenta, e como ocorrem em maior número de infecções do que *E. faecium*, sugere-se que ela seja amplamente mais adaptada ao hospedeiro devido a relação comensal que possuem (Gilmore et al., 2002) ou também poderia estar relacionado à presença dos inúmeros fatores de virulência associados a esta espécie (Klein, 2003; Fisher & Phillips, 2009). Linhagens de enterococos estão envolvidas em infecções no trato urinário (ITU), abscessos intra-abdominais, bacteremia, endocardite, infecções osteo-articulares e meningites (Patterson et al., 1995; Tendolkar et al., 2003).

2.2.1 Infecção do Trato Urinário

A infecção urinária pode comprometer somente o trato urinário baixo, diagnosticado como cistite, ou afetar simultaneamente o trato urinário inferior e o superior; diagnosticado como infecção urinária alta, denominada pielonefrite (Hooton & Stamm, 1997). Tanto a infecção urinária baixa como a

alta, podem ser agudas ou crônicas e sua origem pode ser comunitária ou hospitalar (Stamm & Norrby, 2001).

Para fins de vigilância epidemiológica, as ITUs podem ser classificadas em: (i) ITU relacionada a procedimento urológico, mais frequentemente cateterismo vesical; (ii) ITU não relacionada a procedimento urológico; (iii) ITU sintomática; e (iv) ITU assintomática, também chamada de bacteriúria assintomática (ANVISA, 2009).

Infecções urinárias são as mais frequentes fontes de *Enterococcus spp.*, a maioria das infecções está associada com cateterização ou instrumentação (Kayser, 2003). Estudos demonstram que cerca de 70% das infecções causadas por enterococos tratam-se de infecções do trato urinário. Dentre as espécies mais prevalentes está *E. faecalis*, responsável por mais de 90% das infecções (d'Azevedo et al., 2004; Hörner et al., 2005; d'Azevedo et al., 2006; Bender et al., 2010). Nos EUA, entre Janeiro de 2009 a Dezembro de 2010, foram notificados 69.475 eventos de infecção adquirida em ambiente hospitalar (*healthcare-associated infections* HAI). Ao todo 27,4% dos casos foram relacionados à infecção no trato urinário associado ao uso de cateter (*catheter-associated infection urinary tract infections* - CAUTI). O *E. faecalis* foi o quinto patógeno associado com infecções hospitalares, ficando atrás de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Candida albicans* (Sievert et al., 2013).

2.3 Resistência a antimicrobianos

A resistência a agentes antimicrobianos é dividida em dois grupos: (i) intrínseca e (ii) adquirida. A resistência intrínseca é usada para indicar uma

característica natural presente em todos os isolados da espécie, determinada pelo DNA cromossomal (Murray, 1990; Tokars et al., 1999). A resistência adquirida se origina pela aquisição de genes, seja por mutação ou recebendo material genético através de plasmídeos e transposons (Koneman et al., 2001).

Enterococos são intrinsicamente resistentes a penicilinas semi-sintéticas, cefalosporinas, baixos níveis de aminoglicosídeos e clindamicina, e também podem desenvolver resistência adquirida à antimicrobianos como cloranfenicol, eritromicina, altos níveis de clindamicina, aminoglicosídeos, tetraciclina, fluorquinolonas e vancomicina (Murray, 1990; Giraffa 2002; Franz et al., 2003; Kayser, 2003). Abaixo, uma ilustração com um resumo das resistências apresentadas pelo gênero (Figura 1).

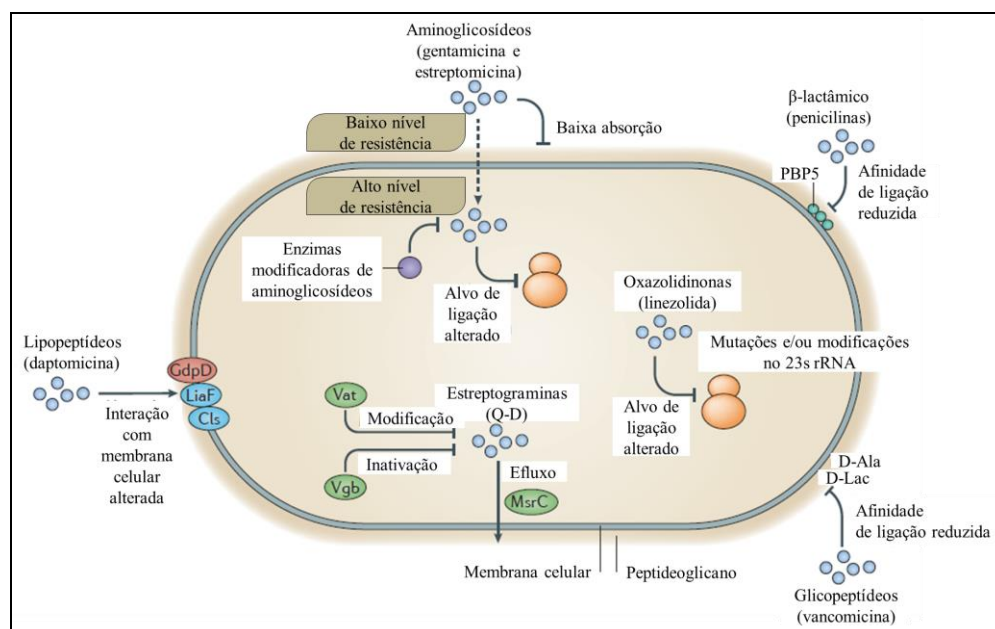


FIGURA 1. Principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos em enterococos (Adaptada de Arias & Murray, 2012).

Na região sul do Brasil, enterococos resistentes a antimicrobianos já foram isolados de amostras clínicas, alimentos, águas, solo e animais (d'Azevedo et al., 2004; Titze-de-Almeida et al., 2004; Hörner et al., 2005; Riboldi et al., 2009a; Bender et al., 2010; Frazzon et al., 2010; Cassenego et al., 2011). Estudos têm mostrado que os alimentos podem servir de reservatórios de enterococos resistentes a antimicrobianos. Assim podem contribuir para a propagação da resistência antimicrobiana à população humana via cadeia alimentar, devido à possibilidade da transferência de genes de resistência para a microbiota intestinal humana (Bertrand et al., 2000; Riboldi et al., 2009; Frazzon et al., 2010).

2.3.1 Resistência a Glicopeptídeos - Vancomicina

Os glicopeptídeos vancomicina e teicoplanina são utilizados no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-positivas, em caso de alergia ou resistência a outros antimicrobianos e seu mecanismo de ação visa inibir a síntese da parede celular bacteriana (Courvalin, 2006).

Enterococos Vancomicina-Resistentes (EVR) surgiram como importantes agentes patogênicos hospitalares em todo o mundo nas duas últimas décadas. O primeiro caso de EVR foi descrito na Europa no ano de 1986 (Uttley et al., 1988), posterior foram descritos casos nos EUA e em outros países e continentes (Hayden, 2000; Bonten et al., 2001; Cattoir & Leclercq, 2013).

No Brasil, os primeiros casos de infecção por EVR foram descritos em Curitiba (Dalla Costa et al., 1998) e em São Paulo (Zanella et al., 1999) envolvendo isolados clínicos de *E. faecium*. A partir de então foram descritos

vários relatos em diferentes estados (Zanella et al., 2003; Vilela et al., 2006; d'Azevedo et al., 2008; Gales et al., 2009; Pereira et al., 2010; Palazzo et al., 2011, Resende et al., 2014). Na cidade de Porto Alegre, no Rio Grande do Sul, o primeiro relato envolveu um isolado clínico de *E. faecalis* (d'Azevedo et al., 2000) e, posteriormente, outros casos foram descritos (Cereda et al., 2001, Furtado et al., 2005, Ribas et al., 2007).

Nove genótipos de EVR já foram descritos em enterococos (*vanA*, -*B*, -*C*, -*D*, -*E*, -*G*, -*L*, -*M* e -*N*). Estes genes codificam resistência intrínseca ou adquirida, resultando em mudanças no sítio de ligação ao peptidoglicano e reduzindo significativamente a resistência da ligação à vancomicina (Courvalin, 2006; Boyd et al., 2008, Xu et al., 2010, Lebreton et al., 2011). O fenótipo de VanA abriga o elemento genético móvel Tn1546 que transporta o cluster *vanA* responsável pelo alto nível de resistência à vancomicina (64-1000 µg/mL) e à teicoplanina (16-512 µg/mL) (Leclercq et al., 1988; Arthur et al., 1996a; Courvalin, 2006). O fenótipo VanB é caracterizado pela aquisição de uma ampla resistência à vancomicina (4-1000 µg/mL) e susceptibilidade à teicoplanina (Arthur et al., 1996b, Courvalin, 2006). O fenótipo VanC é codificado cromossomicamente pelos genes *vanC*₁ e *vanC*_{2/3}, que são intrínsecos das espécies *Enterococcus gallinarum* e *Enterococcus casseliflavus*, respectivamente, e têm sido amplamente usados para a identificação destas espécies (Park et al., 1997, French, 1998; Ramotar et al., 2000; Courvalin, 2006). Estes genes conferem resistência a baixos níveis de vancomicina (2 a 32 µg/mL) e susceptibilidade à teicoplanina (Dutka-Malen et al., 1992, 1995; Navarro & Courvalin 1994; Courvalin, 2006).

Os glicopeptídeos apresentam um mecanismo múltiplo de ação, inibindo a síntese do peptidoglicano, além de alterar a permeabilidade da membrana citoplasmática e interferir na síntese de RNA citoplasmático, inibindo, desta forma, síntese da parede celular bacteriana ligando-se na porção terminal D-Ala-D-Ala de um pentapeptídeo, inibindo a síntese da parede celular. (Arthur et al., 1996b, Courvalin, 2006).

Como mencionado anteriormente, os enterococos desenvolveram resistência intrínseca a baixos níveis de vancomicina por (i) características cromossomais que diminuem o tropismo da droga pelo microrganismo e adquirida a níveis variados devido a (ii) alterações genéticas na bactéria (Park et al., 1997; French, 1998; Ramotar et al.; 2000; Courvalin, 2006).

O fenótipo de resistência VanC foi descrito pela primeira vez em *E. gallinarum* e posteriormente em *E. casseliflavus* e estas espécies possuem resistência intrínseca a baixos níveis de vancomicina e são susceptíveis à teicoplanina. Três genes são necessários para este fenótipo: o gene *vanT* (codifica uma membrana de ligação à serina); o gene *vanC* (sintetiza o dipeptídeo D-D-Ala-Ser) e o gene *vanXYc* (codifica uma proteína que possui atividade de dipeptidase/carboxipeptidase que permite a hidrólise dos precursores D-Ala). A substituição do D-Ala final por um D-Ser resulta em impedimento no sítio de ligação reduzindo a sua afinidade para a vancomicina. O mecanismo de ação para este tipo de resistência está demonstrado na Figura 2.

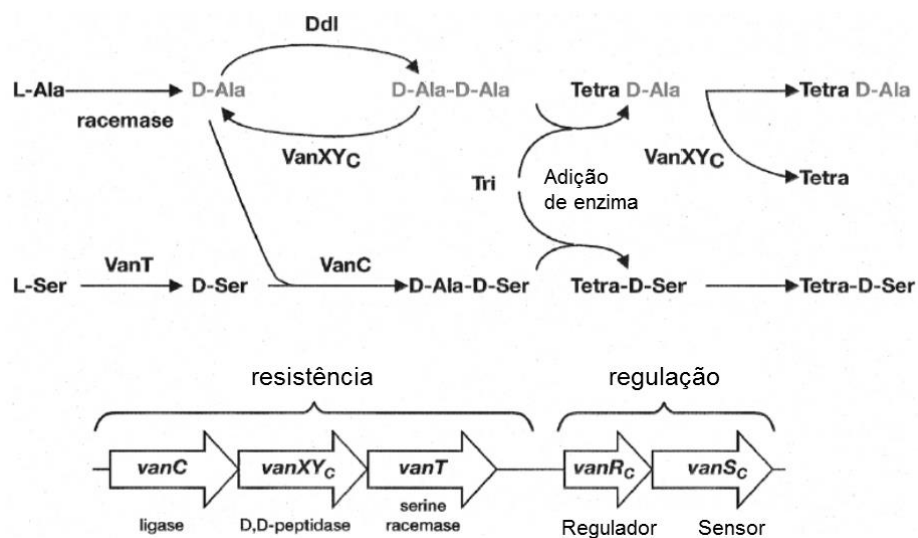


FIGURA 2. Resistência a glicopeptídeos tipo VanC (Adaptado de Courvalin 2006).

Dentre os genótipos descritos, o mais preocupante na clínica é o *vanA*, uma vez que este genótipo é responsável por codificar o fenótipo de alto nível de resistência à vancomicina, é plasmidial e sua expressão é induzida pela vancomicina (Leclercq et al., 1988; Arthur et al., 1996a; Courvalin, 2006). A resistência envolve duas vias (i) substituição dos precursores do terminal D-Ala do peptideoglicano por D-Lac e (ii) prevenção ou destruição de precursores que terminam em D-D-Ala-Ala por específicas dipeptidases e carboxipeptidases. O mecanismo de resistência e sua regulação estão elucidados na Figura 3.

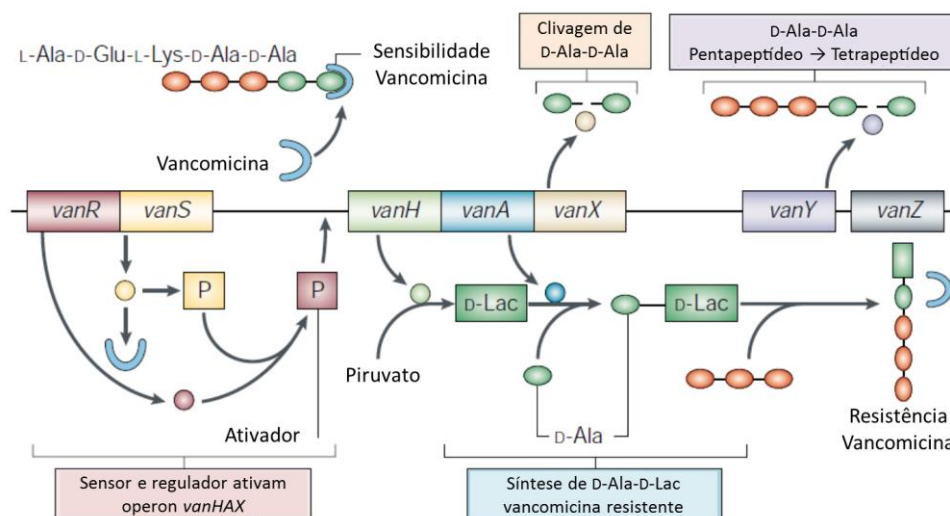


FIGURA 3. Cluster *VanA* que confere alta resistência à vancomicina (Adaptado de Hughes, 2003).

O sistema regulatório de dois componentes VanR-VanS regula a resistência em ERV e estafilococos vancomicina-resistentes. Este tipo de sistema funciona como um sistema de transdução de sinal, que consiste em uma proteína sensor que detecta e responde a um sinal externo, e atua sobre uma proteína reguladora de resposta que transmite o sinal para os outros componentes da célula (Hughes, 2003).

O VanS é um sensor de vancomicina associado à membrana que controla o nível de fosforilação de VanR. O VanR é um ativador da transcrição do operon *vanHAX*. A VanH é uma desidrogenase que reduz o piruvato a D-Lac, enquanto que VanA é uma ligase que catalisa a formação de uma ligação éster entre D-Ala e D-Lac. A VanX é uma dipeptidase que hidrolisa o dipeptídeo (D-Ala-D-Ala), impedindo assim a sensibilidade à vancomicina. A VanY é uma D,D-carboxipeptidase que hidrolisa o resíduo terminal D-Ala dos precursores tardios do peptideoglicano, que são produzidos se a eliminação de

D-Ala-D-Ala por VanX não estiver completa. Desta forma o dipeptídeo, D-Ala-D-Lac substitui o dipeptídeo D-Ala-D-Ala na síntese do peptidoglicano, resultando na resistência à vancomicina (Arthur et al., 1996b, Courvalin, 2006).

Organismos resistentes modificam estes precursores, substituindo o D-Ala terminal por D-Lac (alto nível de resistência) ou D-Ser (baixo nível de resistência).

2.3.2 Rotas de Disseminação de EVR

Uma das possíveis rotas de disseminação de EVR ocorre através do uso de antimicrobianos na clínica veterinária. Algumas substâncias antimicrobianas são utilizadas na pecuária como promotores de crescimento nas dietas dos animais com o intuito de diminuir a incidência de doenças e promover a melhora no desempenho animal (Partanen, 2002). Estudos sobre a cadeia epidemiológica têm mostrado que animais produtores de alimentos, quando tratados com antimicrobianos podem ser reservatórios de EVR, provavelmente contribuindo para a disseminação de resistência antimicrobiana entre a população (Stobberingh et al., 1999; Leme et al., 2000; Novais et al., 2005; Poeta et al., 2005; Cassenego et al., 2011).

Hoje no Brasil existe uma lista de aditivos proibidos como promotores de crescimento (Tabela 1) e vigoram duas Portarias Ministeriais que regulamentam a questão dos antimicrobianos destinados à alimentação animal. A utilização da avoparcina na agricultura brasileira foi proibida em 1998 (MAPA, 2008), mas o uso de glicopeptídeos, como vancomicina é contínuo em hospitais (Leme et al., 2000).

TABELA 1. Lista dos aditivos proibidos na alimentação animal e legislação correspondente.

Aditivo	Legislação
Avoparcina	Ofício Circular DFPA Nº 047/98
Cloranfenicol e Nitrofuranos	Instrução Normativa 09, 27/06/2003
Arsenicais e antimoniais	Portaria 31, 29/01/2002
Penicilina, tetraciclina, sulfonamidas sistêmicas	Portaria 193, 12/05/1998
Olaquinox	Instrução Normativa 11, 24/11/2004
Violeta Genciana	Instrução Normativa 34, 13/09/2007
Carbadox	Instrução Normativa 35, 14/11/2005
Anabolizantes para bovinos	Instrução Normativa 10, 27/04/2001
Hormônios como aditivos alimentar em aves	Instrução Normativa 17, 18/06/2004

Fonte: MAPA, 2008.

A maioria das infecções por EVR ocorre em hospitais (Arias & Murray, 2012; CDC, 2013). Os enterococos podem sobreviver por longos períodos de tempo em superfícies, incluindo equipamentos médicos, trilhos de cama e maçanetas e estão amplamente disseminados no ambiente hospitalar (Figura 4).

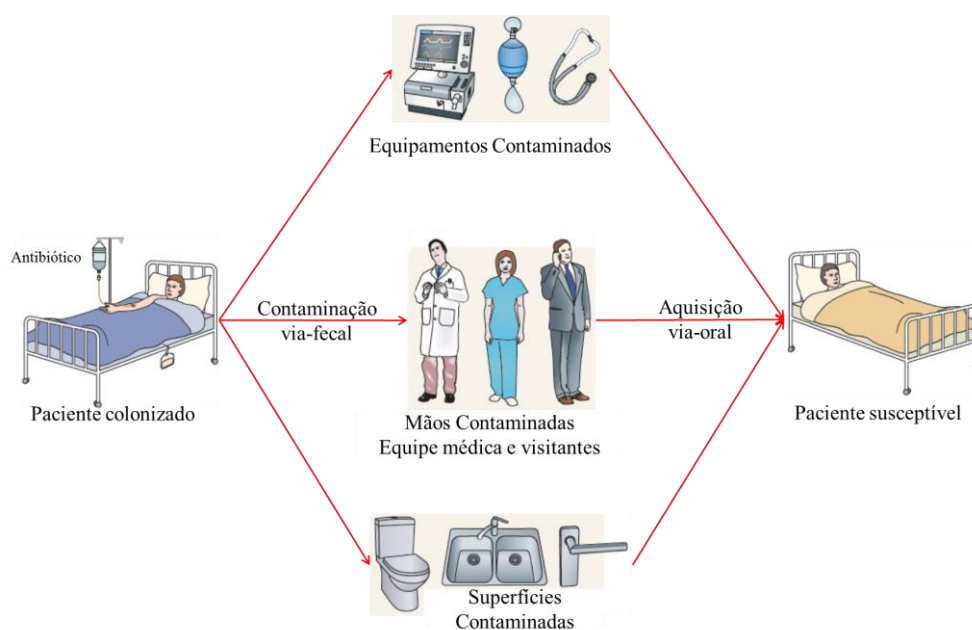


FIGURA 4. Principais vias de transmissão hospitalar de enterococos vancomicina-resistentes (Adaptado de Arias & Murray, 2012).

Isto pode ser explicado pelo fato de que são tolerantes ao calor, ao cloro e a algumas preparações de álcool (Bradley & Fraise, 1996). Existem vários fatores de risco para o desenvolvimento de IRAS por EVR, dentre eles a proximidade física a pacientes infectados ou colonizados com EVR, longos períodos de internação, administração de vários antimicrobianos, internação de longa permanência em unidades cirúrgicas ou unidades de tratamento intensivo e o uso de cateteres (Sydnor & Perl, 2011).

2.4 Fatores de Virulência

Fatores de virulência são estruturas, produtos ou estratégias que permitem a um microrganismo colonizar, invadir, evitar o sistema imune e causar dano tecidual ao hospedeiro (Mannu et al., 2003; Foulquié Moreno et al., 2006).

Estudos demonstram que enterococos isolados de amostras clínicas apresentam um número maior de fatores de virulência que os isolados de alimentos e culturas *starter* (Ben Omar et al., 2004; Busani et al., 2004). O *E. faecalis* apresenta um número maior de fatores de virulência comparado às demais espécies conferindo maior prevalência frente às demais espécies (Eaton & Gasson, 2001; Abriouel et al., 2008). A capacidade de *E. faecalis* para causar infecção tem sido associada às características inerentes do gênero. Esta capacidade envolve uma interação entre a regulação de fatores de virulência e vários determinantes genéticos que levam à adaptação fisiológica da célula bacteriana durante o processo de infecção, permitindo que as bactérias tolerem ambientes agressivos e diversificados (Vebø et al., 2010).

Genes de virulência podem facilmente ser transmitidos entre linhagens de enterococos, já que muitos residem em plasmídeos conjugativos, que são facilmente disseminados em um ambiente natural como o TGI (Jett et al., 1994).

2.4.1 Adesina de colágeno de *Enterococcus faecalis* (Ace)

Para promover a colonização, o *E. faecalis* possui proteínas de superfície com características semelhante à imunoglobulina, as quais são chamadas do inglês *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules* (MSCRAMM) (Sillanpää et al., 2004). Estas adesinas desempenham um papel importante na adesão e colonização em modelos animais e, presumivelmente, em humanos (Foster & Höök, 1998).

A proteína de superfície de *E. faecalis* ou adesina de colágeno (Ace) é uma adesina de ligação ao colágeno, semelhante estruturalmente à adesina de colágeno de *Staphylococcus aureus* (Cna). É uma proteína de superfície celular específica que tem demonstrado mediar a ligação da bactéria aos colágenos tipos I e IV e também à laminina de matriz extracelular, podendo desempenhar um papel na patogênese em infecções humanas (Nallapareddy et al., 2000a,b; Ponnuraj et al., 2002; Koch et al., 2004). Porém a contribuição para a patogênese da infecção e as condições fisiológicas que regulam a sua expressão são desconhecidas (Shepard & Gilmore, 2002).

A sequência de aminoácidos de Ace revelou uma região sinalizadora N-terminal seguida pelo domínio A que apresenta uma sequência altamente conservada de 335 aminoácidos e parece ser responsável pela ligação ao colágeno; o domínio B é composto de unidades repetidas de 47 aminoácidos

que variam em número e a região C-terminal, que é composta por um domínio associado à parede celular, que contém uma sequência consenso LPKTG, responsável pela ancoragem na parede celular e por uma região transmembrana hidrofóbica de 18 aminoácidos (Figura 5).

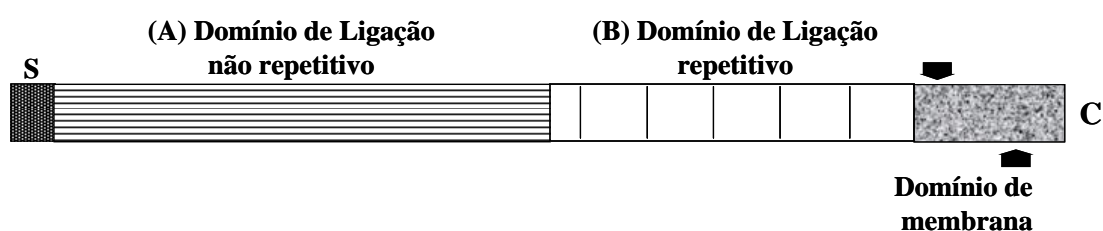


FIGURA 5. Representação esquemática de Ace. S: peptídeo sinal (31 aminoácidos); Domínio A: (335 aminoácidos); Domínio B: repetição parcial de 20 aminoácidos seguido de cinco repetições de 47 aminoácidos, separados por seqüências *recer*; (W): domínio da parede celular, (M): domínio que atravessa a membrana e (C): C-terminal (Adaptado de Nallapareddy et al., 2000a).

Lebreton et al. (2009) caracterizaram a região promotora de *ace* e identificaram que o gene é diretamente regulado pelo Regulador Transcricional de Sobrevivência em *Enterococcus* (Ers). A transcrição de *ace* parece ser induzida pela presença de sais biliares, provavelmente através da repressão de *Ers*, e testes *in vivo* revelaram que o *ace* estava envolvido na ITU por *E. faecalis*, confirmando que é considerado um fator de virulência.

Nallapareddy & Murray (2006) demonstraram que a ligação específica ao colágeno e à laminina foi detectável apenas após crescimento a 46 °C e constataram que a adesão só foi observada em 46 °C e não a 37 °C. Para elucidar a influência de diferentes parâmetros de crescimento na expressão de *ace*, estes autores também investigaram o crescimento em meios de rotina laboratoriais, como o BHI, e descobriram que os níveis de mRNA

foram baixos em todas as fases de crescimento. No entanto, uma análise por RT-PCR mostrou valores de mRNA 18 vezes maior na presença de colágeno tipos I e IV ou de soro, comparados ao controle BHI.

A observação de aderência induzida em *E. faecalis* pode ter implicações importantes sobre a nossa compreensão deste patógeno oportunista. Singh *et al.* (2010) utilizaram um modelo de endocardite animal e encontraram significativa atenuação da capacidade de *E. faecalis* ^{Δace} em colonizar válvulas aórticas e causar endocardite, desempenhando importante função nos estágios iniciais da colonização

2.4.2 Substância de Agregação Asc10

Substâncias de agregação (*aggregation substance* – AS) é a designação utilizada para um grupo de proteínas de superfície codificadas em plasmídeos conjugativos induzíveis por feromônios (plasmídeos sexuais) que promovem conjugação por agregação bacteriana, resultando em estreito contato entre doador e receptor (Olmsted *et al.*, 1991). A expressão de proteínas AS é induzida por um peptídeo secretado por células receptoras de plasmídeo (*plasmid-free*) (Dunny *et al.*, 1995; Leonard *et al.*, 1996), mas também pode ser induzida por um fator do hospedeiro durante crescimento *in vivo* (Hirt *et al.*, 2002; Chandler *et al.*, 2005). As proteínas Asa1, Asp1, e Acs10 são as mais bem estudadas e apresentam acima de 90% de identidade na sequência de aminoácidos (Galli *et al.*, 1992).

A substância de agregação Asc10 é uma proteína de 137 kDa, codificada pelo gene *prgB* do plasmídeo pCF10 e sua expressão é desencadeada pela presença do peptídeo cCF10, que é produzido por células

plasmid-free e induz a transferência do pCF10 por conjugação (Chuang et al., 2009). Esta proteína está envolvida nos processos de mediação da agregação celular, adesão às células hospedeiras, adesão à fibrina, o aumento da hidrofobicidade na superfície das células, resistência à morte pelos macrófagos e leucócitos polimorfonucleares, bem como no aumento do tamanho da população em modelo de endocardite experimental (Hedberg et al., 1996; Waters & Dunny, 2001).

Vários domínios funcionais de Asc10 já foram identificados (Waters & Dunny 2001; Chuang et al., 2009) e em todos eles a sequência sinal (SS) está localizada na região N-terminal, que liga-se ao ácido lipoteicoico (*lipoteichoic acid* - LTA). A região C-terminal contém o motivo LPXTG, que está presente em muitas sequências de proteínas de superfície de bactérias Gram-positivas e designa o local onde a proteína é ligada ao peptidoglicano na parede celular (Waters et al., 2004). Além destas regiões, dois domínios RGD desempenham um papel importante na patogênese da endocardite, possivelmente envolvendo evasão imune (Chuang-Smith et al., 2010). Um esquema do plasmídeo pCF10 está demonstrado na figura abaixo (Figura 6).

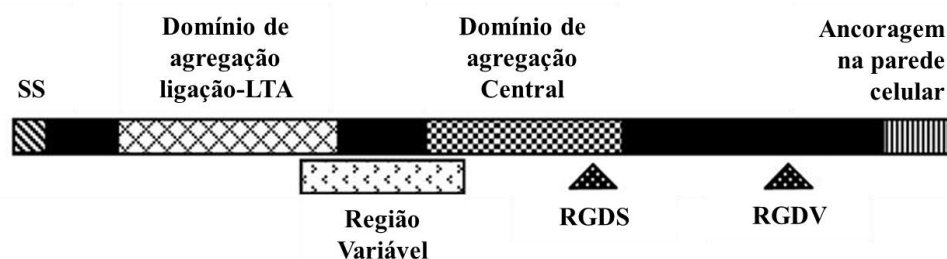


FIGURA 6. Mapa esquemático da proteína Asc10 expressa por isolado tipo-selvagem, com destaque para os domínios funcionais (pCF10) (Adaptado de Chuang et al., 2009)

O sistema de feromônios do pCF10 envolve duas populações distintas: doadores e receptores *plasmid-free*. Os doadores detectam os peptídeos cCF10 produzidos por células receptoras vizinhas e induzem a transferência de plasmídeo para esses receptores. Além disso, o mecanismo de detecção é codificado por um elemento genético autónomo (plasmídeo), enquanto que a capacidade para produzir o cCF10 é codificada pelo cromossomo da bactéria hospedeira (Antiporta & Dunny, 2002). Quando uma célula doadora é exposta ao cCF10 produzido pela célula receptora, a expressão da proteína Asc10 e outros produtos de genes de conjugação é ativada. O plasmídeo pCF10 carrega dois genes que funcionam para evitar a autoindução por cCF10 endógeno em células doadoras. Para entender melhor esta regulação, abaixo temos uma ilustração do *operon prgQ*, que codifica a produção de muitos fatores de conjugação pCF10, incluindo a proteína Asc10. (Figura 7).

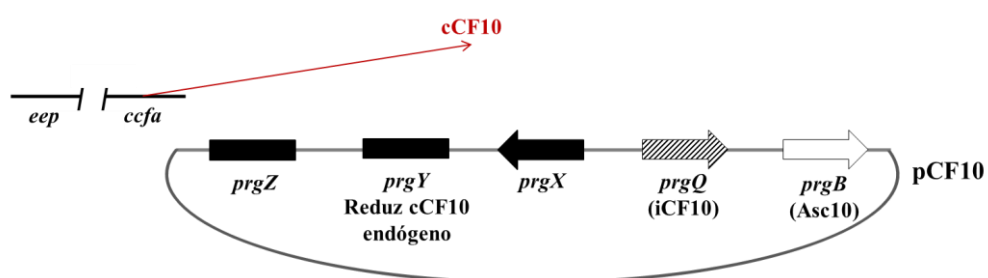


FIGURA 7. Esquema do sistema regulatório de expressão da proteína Asc10, com seus genes e respectiva função e produtos (Adaptado de Hirt et al., 2002 e Chandler et al., 2005).

O cCF10 maduro é processado a partir da proteína Ccfa pela protease de membrana Eep, que são expressas a partir do cromossomo. A proteína de membrana PrgY reduz a atividade do feromônio cCF10 endógeno

na célula do doador e o peptídeo inibidor (iCF10) neutraliza o cCF10 endógeno residual. A resposta a feromônios em células doadoras implica na ligação do cCF10 com a proteína PrgZ, seguido de importação para o citoplasma por um transportador tipo ABC (Leonard et al., 1996). O feromônio internalizado liga-se à proteína PrgX (reguladora do *operon prgQ*) aumentando a expressão da capacidade de conjugação (Bae et al., 2004; Kozlowicz et al., 2004).

Utilizando modelo animal, Chuang et al. (2009) verificaram que a produção de Asc10 estava induzida durante o crescimento no sangue de mamíferos, dando ao *E. faecalis* pCF10⁺ uma vantagem seletiva significativa neste ambiente. Em outro estudo do mesmo grupo, os autores verificaram que a expressão de Asc10 acelerou a formação de biofilme via agregação entre células de *E. faecalis*, os resultados também sugerem que a aderência *in vivo* pode prosseguir por vias Asc10-dependentes ou não e, mutações em qualquer um dos domínios implicados na virulência, reduziram os níveis de aderência (Chuang-Smith et al., 2010).

2.4.3 Operon *bopABCD*

Identificado por Hufnagel et al. (2004), o *operon* nomeado como biofilme em superfície plásticas ou BOP (*biofilm on plastic surfaces*) exerce papel significativo na formação de biofilme e metabolismo da maltose. Segundo os autores, este *operon* é constituído dos genes *bopA* (glicosiltransferase), *bopB* (β -fosfoglicomutase), *bopC* (aldose-1-epimerase) e *bopD* (regulador transcricional) que são previstos para serem transcritos na mesma direção e em um único mRNA (Figura 8).

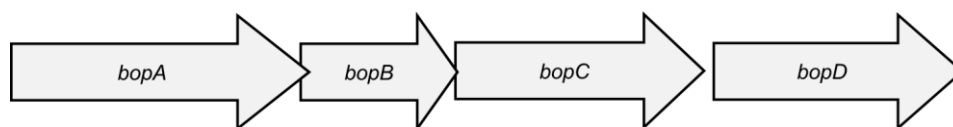


FIGURA 8. Representação esquemática do *operon bopABCD* em *Enterococcus faecalis*. Os quatro genes são expressos em um único transcrito de mRNA (Adaptado de Hufnagel et al., 2004).

O *operon bopABCD* também conhecido como *malPBMR*, é essencial para a produção de biofilme e regulado pelo sistema de comunicação celular ou do inglês *quorum sensing system (FSR)* em *E. faecalis* (Qin et al., 2001; Bourgoigne et al., 2006). O *operon fsrABDC* é o único sistema conhecido que afeta a formação de biofilme (Qin et al., 2001). A presença de todos os genes *bopABDC* em uma isolado de *E. faecalis*, lhe conferiu a característica de um potente produtor de biofilme (Hufnagel et al., 2004).

O *operon fsr* tem sido descrito como essencial para o desenvolvimento do biofilme em *E. faecalis* (Hancock & Perego, 2004; Mohamed & Murray, 2006). É um *operon* composto por quatro genes *fsrA*, *fsrB*, *fsrD* e *fsrC* (Figura 9).

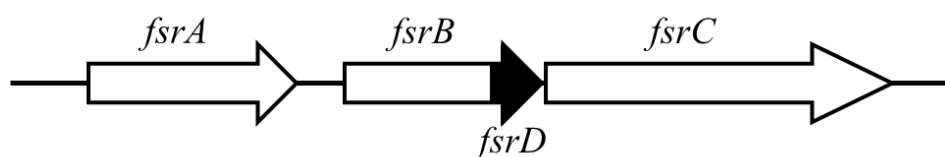


FIGURA 9. *Operon fsr* com em *Enterococcus faecalis* (Adaptado de Nakayama et al., 2006).

A região C-terminal *fsrD* compreende a molécula de sinalização de *quorum* GBAP (*gelatinase biosynthesis activating pheromone*), um peptídeo que é processado e excretado para fora da célula com o auxílio de *fsrB*. Ao chegar a uma concentração limite, o GBAP se liga e ativa *fsrC* que ativa o

regulador de resposta *fsrA* (Figura 10). Uma vez ativado, o *fsrA* regula diferencialmente a expressão de mais de 300 genes envolvidos na cascata regulatória de virulência e metabolismo bacteriano.

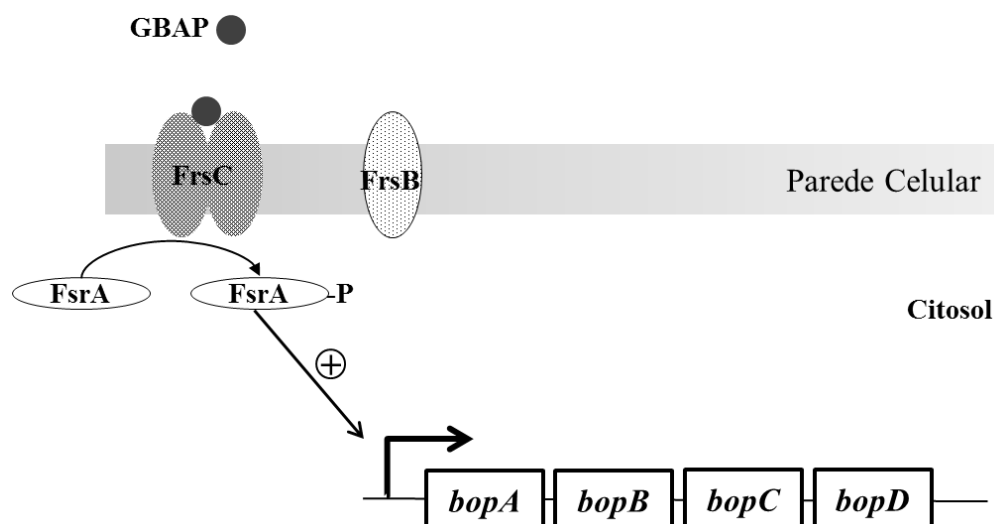


FIGURA 10. Operon *fsrABCD* mediando o controle do operon *bopABCD* (Adaptado de Thomas, 2009).

Bourgone et al. (2006) sugeriram que Frs desempenha um papel positivo na produção de biofilme por pelo menos dois mecanismos independentes: por meio da ativação da produção de gelatinase e por meio da ativação de expressão *bopABCD*. Creti et al. (2006) compararam dois experimentos (i) com um isolado mutante de *E. faecalis* com inserção de transposon no *bopB* e (ii) com um isolado mutante de *E. faecalis* tri-deletada (deleção de *bopB*, flanqueando os genes *bopA* e *bopC*). O mutante de inserção reduziu a produção de biofilme, enquanto o mutante de deleção produziu mais biofilme que o tipo selvagem quando cultivado em meio contendo 1% de glucose. Quando cultivadas em meio contendo 1% de maltose, o mutante de inserção foi capaz de produzir mais biofilme que o de tipo selvagem, enquanto que o mutante de deleção não produziu biofilme, sugerindo que o

oligossacarídeo também pode modular a expressão. Uma inativação por inserção no gene *bopD* reduziu a formação de biofilme, sugerindo que o gene *bopD* é essencial para a produção de biofilme em determinada condição de crescimento (Hufnagel et al., 2004).

2.5 Biofilme

O conceito de biofilme tem sido descrito por alguns autores. Costerton (2001) definiu como uma população estruturada de células ligadas irreversivelmente a superfícies bióticas e abióticas, embebidas em uma matriz de substâncias exopoliméricas, proteínas, polissacáridos e ácidos nucleicos. Já O'Toole et al. (2000) conceituaram como um processo de desenvolvimento complexo que envolve fixação e imobilização sobre uma superfície; interação célula-célula; formação de microcolônias; formação de um biofilme confluyente, finalizando com o desenvolvimento de uma estrutura tridimensional.

As bactérias em uma condição de biofilme comportam-se de forma diferente da condição de vida livre (planctônica). A regulação da expressão gênica, em resposta à densidade da população de células, envolve a produção e detecção de moléculas sinalizadoras extracelulares chamadas autoindutoras, esta comunicação célula-célula é chamada *quorum sensing* (Miller & Bassler, 2001; Sifri, 2008).

A vida bacteriana, neste tipo de associação é vantajosa devido à alta concentração de nutrientes, facilidade de trocas genéticas, aumento da proteção contra células do sistema imune e contra variações ambientais (Singh et al., 2006; Palmer et al., 2007). Um biofilme maduro pode tolerar antimicrobianos em concentrações de 10-1000 vezes maiores que as

necessárias para matar bactérias planctônicas. Bactérias em biofilmes são resistentes à fagocitose, tornando extremamente difíceis de erradicar os biofilmes (Lewis, 2001). Enterococos em biofilmes são muito mais resistentes aos antimicrobianos que em sua forma planctônica, assim, o impacto potencial de formação de biofilme pode ser significativo (Mohamed & Huang, 2007).

A produção de biofilme é reconhecida como um fator de virulência em muitos organismos patogênicos e, vários autores têm descrito a capacidade de enterococos para produzir biofilme (Joyanes et al., 2000; O'Toole et al., 2000; Shepard & Gilmore, 2002; Seno et al., 2005; Mohamed & Huang, 2007; Chuang-Smith et al., 2010). A aderência e produção de biofilme por *E. faecalis* em diferentes biomateriais, demonstra a capacidade de ligação em vários dispositivos médicos, tais como *stents* e cateteres uretrais (Joyanes et al., 2000; Mohamed & Huang, 2007). Seno et al. (2005) analisaram 352 *E. faecalis* isolados de amostras de pacientes com ITU e observaram 18,2% de cepas forte formadoras e 44,4% de cepas moderadamente formadoras de biofilme. Porém, não estabeleceram relação significativa entre a formação de biofilme e quadro clínico.

2.5.1 Etapas de Formação de Biofilme

Resumidamente, a formação de biofilme acontece com (i) processo de adesão e estabelecimento das células planctônicas à superfície; (ii) processo de maturação com divisão binária das células fixas à superfície e expansão, formando aglomerados de células e (iii) processo de dispersão de células (Singh et al., 2006).

O processo de formação tem início quando as células recebem estímulos que podem causar a transição da vida livre para uma condição de vida aderida a uma superfície (Carlsson, 1997; Pratt & Kolter, 1998). Geralmente, este momento inicial é mediado por interações não específicas, como interações hidrofóbicas e eletrostáticas (Carpentier & Cerf, 1993).

Na etapa de adesão, dois passos importantes são necessários. O primeiro é a formação do filme condicionante, no qual células bacterianas junto a moléculas orgânicas e inorgânicas depositam-se na superfície, aumentando a concentração de nutrientes favorecendo a formação do biofilme. O segundo passo é a anexação dos microrganismos à superfície: adesão reversível com uma fraca interação entre célula-substrato, e adesão irreversível com fibrilas poliméricas formando uma ponte entre célula-substrato levando a uma associação mais consistente (Kumar & Anand, 1998). Neste momento a adesão é realizada através de mecanismos moleculares específicos, como as adesinas e polissacarídeos extracelulares (PEC) (Stoodlye et al., 2002).

O processo de maturação é caracterizado pela formação de microcolônias organizando um biofilme maduro com a produção de exopolissacarídeos. Uma importante etapa aqui é a formação da arquitetura do biofilme, que se acredita ser controlada em resposta ao *quorum-sensing* (Davey & O'Toole, 2000). A figura 11 resume o ciclo de desenvolvimento de biofilme.

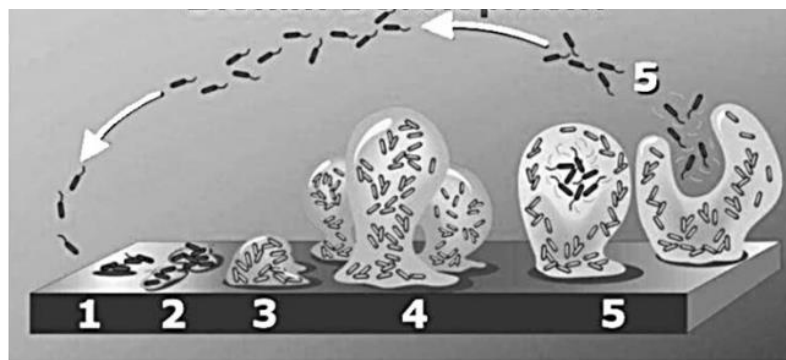


FIGURA 11. Diagrama ilustrando o desenvolvimento de um biofilme em cinco etapas. 1 e 2: Adesão inicial reversível e irreversível; 3 e 4: Desenvolvimento inicial da arquitetura do biofilme, formação de microcolônias com maturação do biofilme; 5: Dispersão de células individuais do biofilme (Stoodley et al., 2002).

O processo de dispersão e volta à vida planctônica pode se dar por um possível sinal de depleção de nutrientes (O'Toole et al., 2000). O descolamento ativo de células de biofilmes pode ser mediado através da expressão de enzimas extracelulares (Boyd & Chakrabarty, 1994). Gilbert et al. (1993) observaram que alterações na fisiologia bacteriana ocorriam após o contato com uma superfície, podendo-se argumentar que esta alteração nas propriedades da bactéria aderida poderia resultar em desprendimento. As células planctônicas de *E. coli* em biofilme foram significativamente mais hidrofílicas que as células aderidas, sugerindo que poderia refletir o envolvimento da célula na dispersão de biofilmes (Allison et al., 1990). A verdade é que pouco se sabe sobre esta etapa. Enquanto pensa-se que a ausência de forças de coesão internas ou condições ambientais desfavoráveis pode resultar na separação das partes do biofilme, o possível envolvimento dos determinantes genéticos no processo de separação de células individuais ainda está sendo desvendado. Um resumo dos genes envolvidos na formação de biofilme em enterococos está elucidado da figura 12.

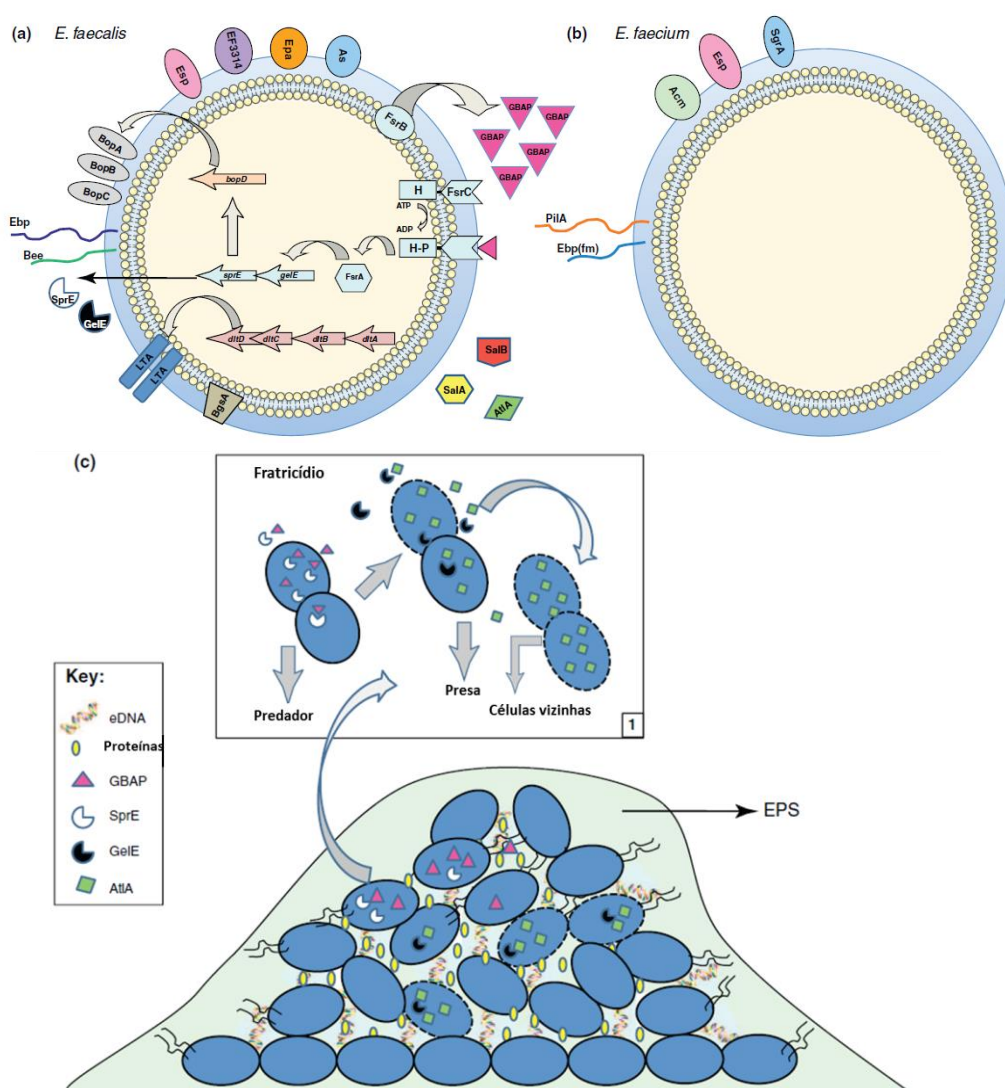


FIGURA 12. Resumo das proteínas e estruturas associadas ao biofilme em enterococos. Representação esquemática de (a) *E. faecalis* e (b) *E. faecium* adesinas de superfície, pili, lipoproteínas, proteínas secretadas, LTA e genes reguladores e sua localização relativa à parede celular do peptidoglicano; (c) Fratricídio e estrutura do biofilme em relação a *E. faecalis* (Adaptado de Paganelli et al., 2012).

2.6. Cofatores Ferro-Enxofre [Fe-S] – Estrutura e Função

O ferro é um nutriente essencial para o crescimento bacteriano e várias enzimas que participam na respiração, metabolismo central, resistências ao estresse redox e síntese de aminoácidos requerem um ou mais átomos de ferro para a estabilidade de estrutura e função (Beinert et al., 1997; Py & Barras

2010). No entanto, o ferro não está prontamente disponível para as bactérias, pois se apresenta na forma insolúvel Fe^{3+} . Desta maneira, as bactérias desenvolveram alguns mecanismos para aquisição de ferro a partir de diversas fontes. A absorção de ferro em bactérias é um processo fortemente regulado devido à necessidade de prevenir o acúmulo em níveis celulares tóxicos. O ferro é responsável pela geração de hidroxilas reativas através da reação de Fenton, que tendem a promover danos no DNA, em proteínas e lipídios (Imlay, 2003).

O enxofre é um importante elemento funcional da matéria viva e adiciona funcionalidade considerável para uma grande variedade de biomoléculas por causa de suas propriedades únicas: as ligações químicas são facilmente feitas e quebradas e o enxofre atua igualmente como um eletrófilo (dissulfetos) e como um nucleófilo (tióis). Os persulfetos de baixo peso molecular (RS-SH) são geralmente bastante instáveis decompondo-se em tióis (R-SH) e enxofre elementar (S), sob a maioria das condições [$\text{R-S-SH} \rightarrow \text{R-SH} + \text{S}$] (Beinert, 2000). Para sua incorporação em biomoléculas, o enxofre deve ser reduzido e/ou ativado: (i) com sulfato ou polissulfuretos como produtos finais da redução, a incorporação da cisteína é possível e servirá como bloco de construção central para diversos compostos de enxofre (como coenzima A e metionina), além da construção de tióis biologicamente importantes e (ii) na forma ativada, persulfetos ou “enxofre persulfídico” (R-S-SH) são utilizados em vários processos metabólicos basais, especialmente em biossíntese de vitaminas e cofatores contendo enxofre (Figura 13).

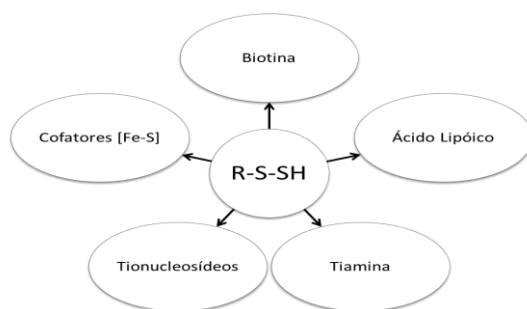


FIGURA 13. Compostos de enxofre que utilizam a forma enxofre persulfídico como fonte de enxofre (Adaptado de Kessler, 2006).

Os cofatores ferro-enxofre [Fe-S] (combinações polinucleares de átomos de ferro e enxofre) são grupamentos prostéticos (*clusters*) muito comuns presentes em todos os organismos vivos e desempenham papel essencial em processos biológicos na evolução (Beinert, 2000). Os *clusters* mais comumente encontrados na natureza são [2Fe-2S], [3Fe-4S] e [4Fe-4S] nos quais os íons ferro são coordenados em suas proteína por cisteinatos (resíduos de cisteínas – Cys) e ligados entre si por pontes de sulfeto (Figura 14).

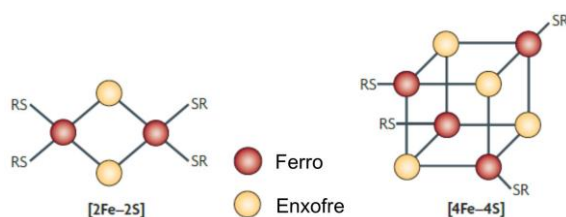


FIGURA 14. Cofatores [Fe-S]. Na maioria dos casos, o ferro (vermelho) de proteínas Fe-S está ligado ao átomo de enxofre dos resíduos de cisteína no esqueleto peptídico (SR) e ao enxofre inorgânico no grupo prostético (amarelo) (Adaptado de Py & Barras, 2010).

Enquanto os *clusters* [2Fe-2S] e [3Fe-4S] são usados, principalmente, em reações de transferência de um elétron, os *clusters* [4Fe-4S] são dotados de múltiplas funções, incluindo transferência de elétrons e

acoplamento de prótons, substrato de ligação e ativação, regulação da atividade enzimática e expressão gênica, detecção de espécies reativas, geração de radical, clivagem de ligações dissulfetos e doação de enxofre (Johnson et al., 2005) reparo e replicação do DNA, respiração, metabolismo central e estoque de ferro (Beinert & Kiley, 1999; Dai et al., 2000; Crack et al., 2012). Além disso, estes cofatores participam do controle da homeostase celular regulando a expressão de genes e sendo responsáveis por uma variedade de estímulos ambientais por meio de diferentes mecanismos (Dempfle et al., 2002; Kiley & Beinert, 2003), pois a sensibilidade às espécies reativas de oxigênio (ROS), íons superóxidos, peróxidos de hidrogênio e espécies reativas de nitrogênio permitem que estes cofatores funcionem como sensores em muitas situações de estresse oxidativo (Py & Barras, 2010).

A abundância de ferro e enxofre em superfícies terrestres e a versatilidade/reactividade química destes cofatores [Fe-S] facilitaram sua seleção como atuantes em processos biológicos vitais, pois a evolução desenvolveu, com estes clusters, um sistema versátil, modular e útil para realizar uma grande variedade de processos bioquímicos (Wächtershäuser 2007).

Foi proposto que os antimicrobianos bactericidas estimulariam a respiração celular conduzindo à formação de superóxido endógeno que degradam cofatores [Fe-S], resultando em ferro ferroso disponível que pode ser oxidado e produzir radicais hidroxilas, que danificam o DNA e as proteínas, levando à morte celular (Kohanski et al., 2008, 2010).

2.6.1 Maquinaria de biogêneses do cofator [Fe-S]

Em procariotos a maquinaria de biogênese de cofator [Fe-S] é representada por 3 sistemas distintos mas estrutural e funcionalmente relacionados: *operons NIF* (*nitrogen fixation*), *ISC* (*iron sulfur cluster*) e *SUF* (*sulfur assimilation*) que codificam proteínas essenciais para a biossíntese do cofator (Fontecave & Ollagnier-de-Choudens, 2008).

Através de estudos em *Azotobacter vinelandii* sobre a maquinaria biossintética da enzima nitrogenase, foi identificado o sistema *NIF* que é formado por cerca de 20 genes estruturais e regulatórios que atuam na fixação de nitrogênio e subsequente maturação da nitrogenase (Jacobson et al., 1989a; 1989b).

O sistema *ISC* provavelmente representa o sistema *housekeeping* para maturação das proteínas ferro-enxofre na maioria das células vivas. Seu *operon* é constituído pelos genes *iscRSUAhscBA-FDX* e também descoberto em *A. vinelandii* (Zheng et al., 1998).

O sistema *SUF*, identificado primeiramente em *E. coli*, desenvolve seu papel na assimilação de enxofre e seu *operon* é composto pelos genes *sufABCDE* (Fontecave et al., 2006; Takahashi & Tokomoto, 2002).

Estes três mecanismos diferentes têm em comum o envolvimento de uma enzima cisteína desulfurase que permite a utilização de L-cisteína como uma fonte de átomos de enxofre. Além disso, todos eles contêm proteínas do tipo *scaffold* que fornecem um local de montagem intermediária para o cofator [Fe-S] ou seus precursores (Agar et al., 2000; Ayala-Castro et al., 2008).

Apenas os sistemas de *ISC* e *SUF* permitem a maturação de todas as proteínas Fe-S (Roche et al., 2013)

2.6.2 Sistema *SUF* (*sulfur assimilation*) e sua regulação

Primeiramente o sistema *SUF* apareceu como um contribuinte menor para a biogênese dos cofatores [Fe-S]. O papel do sistema *SUF* se tornou aparente quando isolados de *E. coli* foram submetidas a estresse oxidativo ou deficiência de ferro (Takahashi & Tokumoto, 2002; Nachin et al., 2003) e, nesta ocasião, o sistema *SUF* se mostrou especificamente adaptado para sintetizar cofatores [Fe-S] nas condições ambientais adversas. Em bactérias Gram-positivas este sistema parece ser particularmente importante, principalmente durante o crescimento aeróbico ou sob condições de stress oxidativo, tendo em conta a elevada virulência associada com bactérias do filo *Firmicutes*, como *Enterococcus* spp, na qual somente o sistema *SUF* está presente (Riboldi et al., 2009b). Este sistema se apresenta como a maquinaria biossintética mais simples de produção do cofator, compreendendo o *operon sufABCDE* em *E. coli* e o *operon sufCDSUB* em *E. faecalis* (Fontecave et al., 2006; Riboldi, 2009).

A comparação de regiões regulatórias entre os genomas de *E. coli* e *E. faecalis* foi realizada por Riboldi e colaboradores (2009) através do mapeamento de regiões de ligação de fatores *cis*-atuantes. O genoma de *E. faecalis* apresenta regiões *cis*-atuantes similares à ORE I de *E. coli* (região de atuação do Fur), ORE III (região de atuação de OxyR) e IHF (região relacionada ao controle de transcrição do *operon*), porém não foi identificado nenhum gene ortólogo a *IscR* e verificou-se uma região similar (ORE II),

sugerindo que a possibilidade de outros elementos estarem envolvidos na regulação do *operon* (Figura 15).

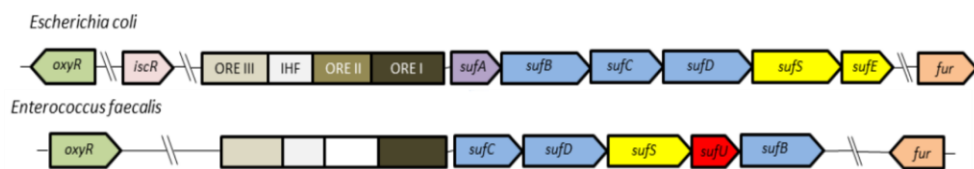


FIGURA 15. Maquinaria *sufCDSUB* de *Enterococcus faecalis* e análise da região promotora. Maquinarias *SUF* para a formação de cofatores [Fe-S] verificados em *Escherichia coli* e *E. faecalis*. Genes e elementos *cis*-atuantes representando sequências homólogas ou funções similares entre os sistemas são apresentados em cores similares (Adaptado de Riboldi et al., 2009b).

A *E. coli* apresenta duas maquinarias de formação de cofatores [Fe-S], a maquinaria *housekeeping* (*ISC*) e a especializada em eventos de estresses oxidativo e por depleção de ferro (*SUF*). Brevemente, o *operon* *sufABCDSE* é controlado por 4 reguladores de estresse oxidativo: *IscR*, *OxyR*, *IHF* (do inglês *Interaction Host Factor*) e regulador da captura de ferro *Fur* (do inglês *ferric uptake regulator*) (Outten et al., 2004). Condições intracelulares de limitação de ferro ou estresse oxidativo e consequente esgotamento de cofatores [Fe-S] levam à ativação de *sufABCDSE*. Neste caso, o repressor *Fur* diminui sua afinidade de ligação e facilita a ligação da apo-*IscR* (Schwartz et al., 2001).

A indução do *operon* *SUF* em resposta à limitação de ferro é dependente da proteína reguladora global *Fur*, cuja ligação do elemento Fe^{+2} reprime genes relacionados à aquisição de ferro em condições celulares normais. Na condição de depleção celular de ferro, ocorre a perda da repressão e aumento da transcrição de genes adaptativos à ausência de ferro. Cofatores [Fe-S] sofrem ataque de elementos oxidativos levando à destruição

do cofator e perda de Fe^{+2} , o qual age como combustível para a reação de Fenton e formação de ROS comprometendo enzimas e fatores proteicos contendo cofatores [Fe-S], além de promover danos ao DNA. Genes do *operon* *SUF* apresentam-se induzido em presença de elementos geradores de radical superóxidos e/ou peróxido de hidrogênio, e estão sob controle dos reguladores responsivos a estresse oxidativo (Outten et al., 2004; Yeo et al., 2006; Lee et al., 2008).

Pelos estudos realizados por Riboldi e colaboradores (2009), foi observado em *E. faecalis* um aumento de expressão nos genes *fur* e *oxyR* sob condições de estresse oxidativo e depleção de ferro, acompanhado do aumento na transcrição do *operon*. Visto que *SUF* corresponde à única maquinaria presente neste organismo, sua transcrição deve ter papel constante e possuir um mecanismo diferenciado ao proposto para *E. coli*. A proteína Fur poderia estar atuando de maneira diferenciada devido à homeostase dos cofatores [Fe-S] na célula, podendo estar envolvido em outros processos celulares. Além disso, o gene *fur* é induzido por OxyR em resposta a H_2O_2 e está envolvido em diminuição do *uptake* de ferro para atenuar problemas relacionados à reação de Fenton, o que poderia explicar a associação de indução de ambos os elementos. A necessidade de uma proteína acessória para OxyR corrobora a ideia de que deve haver um terceiro fator que competiria com Fur, visto que *sufCDSUB* é a maquinaria *housekeeping* para o *E. faecalis*, e sua repressão não seria vantajoso para a célula.

Apesar de estarem envolvidos na biossíntese de cofatores [Fe-S], estes reguladores também são importantes para os processos de virulência em

vários organismos, indicando uma possível ligação entre os controles de transcrição dessas duas vias bioquímicas, pois já foi descrito em *E. coli* que em condições de estresse, a maquinaria *SUF* é escolhida em relação à *ICS* (Ezraty et al., 2013).

CAPÍTULO 3. MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais e os métodos específicos para cada um dos experimentos desenvolvidos nesta pesquisa estão descritos nos respectivos artigos, apresentados no capítulo 4 desta Tese (RESULTADOS).

Este estudo foi realizado na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul nos Laboratórios de Micologia Ambiental (Lab. 209) e de Virologia (Lab.208) do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e no Laboratório de Cocos Gram-Positivos da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho estão apresentados na forma de artigos científicos. Os subtítulos deste capítulo correspondem aos títulos do artigo publicado e do artigo formatado de acordo com as normas do periódico escolhido para submissão.

4.1 Detection of *vanC*₁ gene transcription in vancomycin susceptible *Enterococcus faecalis*.

de Moura TM, Cassenego AP, Campos FS, Ribeiro AM, Franco AC, d'Azevedo PA, Frazzon J, Frazzon AP. Detection of *vanC*₁ gene transcription in vancomycin-susceptible *Enterococcus faecalis*.

Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013 Jun;108(4):453-6. doi: 10.1590/S0074-0276108042013009.

Abstract

Here we report the presence and expression levels of the *vanC*₁ and *vanC*_(2/3) genes in vancomycin-susceptible strains of *Enterococcus faecalis*. The *vanC*₁ and *vanC*_(2/3) genes were located in the plasmid DNA and on the chromosome, respectively. Specific mRNA of the *vanC*₁ gene was detected in one of these strains. Additionally, analysis of the *vanC* gene sequences showed that these genes are related to the *vanC* genes of *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus*. The presence of *vanC* genes is useful for the identification of *E. gallinarum* and *E. casseliflavus*. Moreover, this is the first report of *vanC* mRNA in *E. faecalis*.

Detection of *vanC*₁ gene transcription in vancomycin-susceptible *Enterococcus faecalis*

Tiane Martin de Moura^{1,2/+}, Ana Paula Vaz Cassenego^{1,2},
Fabrício Souza Campos^{3,4}, Andrea Machado Leal Ribeiro⁵, Ana Cláudia Franco^{1,4},
Pedro Alves d'Azevedo⁶, Jeverson Frazzon⁷, Ana Paula Guedes Frazzon^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente ²Laboratório de Bacteriologia, Departamento de Microbiologia

⁴Laboratório de Virologia, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde

³Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias ⁵Departamento de Zootecnia, Faculdade de Agronomia

⁷Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

⁶Laboratório de Cocos Gram-Positivos, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil

Here we report the presence and expression levels of the *vanC*₁ and *vanC*_{2/3} genes in vancomycin-susceptible strains of *Enterococcus faecalis*. The *vanC*₁ and *vanC*_{2/3} genes were located in the plasmid DNA and on the chromosome, respectively. Specific mRNA of the *vanC*₁ gene was detected in one of these strains. Additionally, analysis of the *vanC* gene sequences showed that these genes are related to the *vanC* genes of *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus*. The presence of *vanC* genes is useful for the identification of *E. gallinarum* and *E. casseliflavus*. Moreover, this is the first report of *vanC* mRNA in *E. faecalis*.

Key words: *Enterococcus faecalis* - vancomycin resistance - *vanC* gene - horizontal gene transfer

Enterococcus faecalis is part of the normal microbiota inhabiting the gastrointestinal tract of humans and animals and it is also present in soil, plants and food (Moreno et al. 2006, Riboldi et al. 2008, Cassenego et al. 2011). This pathogen is responsible for serious health problems and causes the majority of human enterococcal infections (Franz et al. 2003). An important feature of this species is its resistance to a wide range of antimicrobial agents. Animals may be an important reservoir of vancomycin resistant enterococci (VRE) because of the possibility of resistance genes being transferred to the human gut bacteria through the food chain and/or animal husbandry (Poeta et al. 2005).

Nine VRE genotypes have been described in enterococci (*vanA*, *-B*, *-C*, *-D*, *-E*, *-G*, *-L*, *-M* and *-N*). These genes encode intrinsic or acquired resistance determinants that result in changes in the peptidoglycan binding site and significantly reduce the strength of vancomycin binding (Courvalin 2006, Boyd et al. 2008, Xu et al. 2010, Lebreton et al. 2011). The VanC phenotype is chromosomally encoded by the *vanC*₁ and *vanC*_{2/3} genes, which are intrinsic to *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus*, respectively, and therefore can be used for species identification (Park et al. 1997, French 1998, Ramotar et al. 2000, Courvalin 2006).

These genes confer low-level resistance to vancomycin (2-32 µg/mL) and susceptibility to teicoplanin (0.5-1 µg/mL) (Dutka-Malen et al. 1992, 1995, Navarro & Courvalin 1994, Courvalin 2006).

The *vanC*₁ gene was recently detected in a vancomycin-susceptible strain of *E. faecalis* (Schwaiger et al. 2012). Here we report the presence of the *vanC*₁ and *vanC*_{2/3} genes and evaluate the expression of *vanC* genes by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) in *E. faecalis* isolates that were obtained from cloacal swabs of broilers; these strains were previously classified as vancomycin-intermediate resistant (Cassenego et al. 2011).

MATERIALS AND METHODS

E. faecalis strains - A total of 29 *E. faecalis* isolates from cloacal swabs of broilers that were classified as vancomycin-intermediate resistant by the disk diffusion method were screened for the presence of *van* genes by PCR (data not shown); three isolates (CB 114, CB 356 and CB 378) that were positive for the *vanC* gene were chosen for this study. The isolates were biochemically classified as *E. faecalis*, which was confirmed by PCR using species-specific primers for the D-alanine-D-alanine ligase (*ddl*)_{*E. faecalis*} gene (Depardieu et al. 2004). The strains were also tested to exclude the species *E. casseliflavus* and *E. gallinarum* by PCR using the species-specific primer pairs *CA1/CA2* and *GAI/GA2*, respectively (Jackson et al. 2004).

Determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) of vancomycin - The MIC of vancomycin was determined by the broth microdilution method (BMM) (0.125-32 µg/mL) according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2010) and by the Epsilon-meter-test (E-test) (0-256 µg/mL) (bioMérieux®), fol-

doi: 10.1590/0074-0276108042013009

Financial support: CNPq (470291/2010-9), CAPES ACF, AMLR, JF and PAD'A are CNPq research fellows.

+ Corresponding author: tianedemoura@gmail.com

Received 25 July 2012

Accepted 2 April 2013

lowing the manufacturer's recommendations. All tests were performed in triplicate and the *E. faecalis* strains ATCC 29212 (vancomycin-susceptible) and *E. faecalis* ATCC 51299 (resistant to vancomycin) were used for quality control.

Extraction of DNA and PCR assays - Genomic DNA was extracted following the standard method of phenol (Invitrogen) extraction and ethanol (Pro Analysis) precipitation (Sambrook & Russell 2001) with minor modifications, as previously described (Moura et al. 2012). Plasmid DNA was extracted using standard miniprep methods (Sambrook & Russell 2001). The species identification of the *E. faecalis* isolates was confirmed by PCR using species-specific primers for the *ddl*_{*E. faecalis*} gene (Depardieu et al. 2004). *E. faecalis* ATCC 51299 and *Enterococcus faecium* ATCC 53519 were used as positive and negative control strains, respectively. All strains were retested for the presence of *vanA*, *vanB* and *vanC*_{1,2,3} by PCR. The oligonucleotides and PCR conditions used in this study for *vanA* and *vanC*₁ (Dutka-Malen et al. 1995), *vanB* (Depardieu et al. 2004) and *vanC*_{2,3} (Satake et al. 1997) followed those reported by their respective authors. Reactions were performed in an Eppendorf Mastercycler thermal cycler under the following cycle conditions: 3 min at 94°C, 30 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 50°C (*vanA*) or 54°C (*vanB* and *vanC*_{1,2,3}) and 1 min at 72°C and 5 min at 72°C.

RNA extraction and analysis of *vanC* gene expression by RT-PCR - Briefly, 500 µL of overnight culture was inoculated into 50 mL 2xYT broth and incubated with agitation at 37°C to an optical density at 600 nm of 0.3. A 3 mL aliquot was harvested by centrifugation for 10 min at 10,000 g, the supernatant was discarded and total RNA was extracted using TRIzol® (Invitrogen®), following the manufacturer's protocol. The total RNA was treated with RNase-free DNase I (Fermentas®) according to the manufacturer's recommendations.

Complementary DNA (cDNA) was synthesised from 1 µg of high-quality total RNA ($A_{260nm/280nm}$ of 1.80-2.0), following the manufacturer's instructions (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems®). Reverse transcriptase was omitted from the negative control. The cDNAs were used in the PCR amplification

of the *vanC*₁ and *vanC*_{2,3} genes in a final volume of 25 µL. The cDNAs were also used for PCR amplification of the 16S rRNA gene (Medeiros et al. 2010).

Sequencing of samples - To confirm the presence of *ddl*_{*E. faecalis*}, *vanC*₁ and *vanC*_{2,3}, the amplified products were submitted to nucleotide sequence analysis. The primers and PCR followed the protocols previously described (Dutka-Malen et al. 1995, Satake et al. 1997, Depardieu et al. 2004). The DNA fragments were purified using an Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare-Buckinghamshire, United Kingdom). Sequencing was carried out with the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems) in an ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (ABI), according to the manufacturer's protocol. The nucleotide sequences obtained were compared with homologous nucleotide sequences deposited in the GenBank database using the Basic Local Alignment Search Tool (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

RESULTS

Three *E. faecalis* isolates (CB114, CB356 and CB378) were identified by a PCR strategy using species-specific primers to amplify the 475 bp *ddl*_{*E. faecalis*} gene (data not shown). Moreover, the isolates were negative for the species *E. casseliflavus* and *E. gallinarum*.

The MIC determined by E-test exhibited an elliptical zone of inhibition within the range of 1.50-4.0 µg/mL and the strains were reclassified as vancomycin-susceptible (≤ 4.0 µg/mL). The BMM showed a MIC ranging from 4.0-1.0 µg/mL and all strains were also reclassified as vancomycin-susceptible by this method (Table).

All isolates were positive for the *vanC*₁ gene and the strains CB356 and CB378 harboured both the *vanC*₁ and *vanC*_{2,3} genes. The *vanC*₁ gene was detected in plasmid DNA and the *vanC*_{2,3} gene was present in the chromosomal DNA (data not shown).

DISCUSSION

The detection of more than one *van*-type gene in an *Enterococcus* strain has been reported in other studies, including the presence of *vanC*₁ + *vanA* or *vanC*₁ + *vanB* (Elsayed et al. 2001, Hassan et al. 2008). None of the strains tested positive by PCR for the *vanA* or *vanB*

TABLE
Phenotypic and genotypic characteristics of *Enterococcus faecalis* *vanC*-type isolates from cloacal swabs of broilers

Isolate	Phenotype ^a		Genotype				
	E-test	BMM	<i>ddl</i>	<i>vanA</i>	<i>vanB</i>	<i>vanC</i> ₁	<i>vanC</i> _{2,3}
CB114	3.50 µg/mL	4.0 µg/mL	+	-	-	+	-
CB356	2.25 µg/mL	1.0 µg/mL	+	-	-	+	+
CB378	2.50 µg/mL	1.0 µg/mL	+	-	-	+	+
Parameters	≤ 4 µg/mL ^b	≤ 4 µg/mL ^c					

a: average values of triplicates; b: sensitive according to manufacturer; c: sensitive according to CLSI-M100-S20; BMM: broth microdilution method; *ddl*: D-alanine-D-alanine ligase; E-test: Epsilometer-test.

gene. The presence of the *vanC*₁ gene in vancomycin-susceptible *E. faecalis* strains isolated from pig manure samples was first described in Germany (Schwaiger et al. 2012). The detection of these *vanC* genes in *E. faecalis* is remarkable because they are thought to be intrinsic to *E. gallinarum* (*vanC*₁) and *E. casseliflavus* (*vanC*_{2/3}) and the *vanC* operon is chromosomally located in a transferable region, such as a transposon and/or integron (Dutka-Malen et al. 1992, Navarro & Courvalin 1994, Patel et al. 1997, 1998, Depardieu et al. 2004, Fisher & Phillips 2009). *E. faecalis* may have acquired *vanC* genes by horizontal transfer from *E. gallinarum* and *E. casseliflavus*, two natural inhabitants of the poultry gut. This flow of the *vanC* gene between species is important because the presence of this gene is often used to identify species and therefore, erroneous identification of species may be occurring. Furthermore, this flow also emphasises that the chromosomal location of a gene in intrinsically resistant strains does not necessarily protect against transfer to other species, thereby contributing to the diversification of species (Schwaiger et al. 2012).

RT-PCR experiments detected *vanC*₁-specific mRNA in only one strain (CB356) and did not detect *vanC*_{2/3} mRNA (data not shown). Recently, a study using real-time RT-PCR assays also failed to detect a corresponding *vanC*₁ transcript in a VanC₁ genotype-positive strain (Schwaiger et al. 2012). A possible explanation for this result could be that a non-functional *vanC* gene cluster has been transferred from the bacterial community to CB114 and CB378 or it could reflect the action of a failed recombination event that inserted a non-functional gene and removed beneficial DNA (Lawrence et al. 2001).

The three partial *ddl*_{*E. faecalis*}, *vanC*₁ and *vanC*_{2/3} gene sequences were deposited in GenBank (accessions JX220983, JX220984 and JX220985, respectively). The alignment of the sequences showed 99% identity to *ddl*_{*E. faecalis*} of *E. faecalis* (GenBank ID U00457), 99% to *vanC*₁ of *E. gallinarum* (GenBank ID EU151770) and 99% to *vanC*_{2/3} of *E. casseliflavus* (GenBank ID EU151764), respectively.

In conclusion, we have reported the first identification and mRNA expression of the *vanC* gene in a vancomycin-susceptible *E. faecalis* strain that was isolated from cloacal swabs of broilers in Brazil. Our results suggest that *E. faecalis* may have acquired the *vanC* genes by horizontal transfer from *E. gallinarum* and *E. casseliflavus*. These results are significant because the detection of the *vanC* gene is a useful tool for the detection of *E. gallinarum* and *E. casseliflavus*. We recommend that the *vanC*₁ and *vanC*_{2/3} genes be used with caution as species-specific markers.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the UFRGS and to the UFCSPA.

REFERENCES

- Boyd DA, Willey BM, Fawcett D, Gillani N, Mulvey MR 2008. Molecular characterization of *Enterococcus faecalis* N06-0364 with low-level vancomycin resistance harboring a novel d-Ala-d-Ser gene cluster, *vanL*. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 2667-2672.
- Cassenege APV, d'Azevedo PA, Ribeiro AML, Frazzon J, Van Der Sand ST, Frazzon APG 2011. Species distribution and antimicrobial susceptibility of *Enterococci* isolated from broilers infected experimentally with *Eimeria* spp and fed with diets containing different supplements. *Braz J Microbiol* 42: 480-488.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute 2010. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*, 20th informational supplement, CLSI, Wayne, 160 pp.
- Courvalin P 2006. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin Infect Dis* 42: 25-34.
- Depardieu F, Perichon B, Courvalin P 2004. Detection of the *van* alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 42: 5857-5860.
- Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol* 33: 24-27. Erratum in *J Clin Microbiol* 1995 33: 1434.
- Dutka-Malen S, Molinas C, Arthur M, Courvalin P 1992. Sequence of the *vanC* gene of *Enterococcus gallinarum* BM4174 encoding a D-alanine: D-alanine ligase-related protein necessary for vancomycin resistance. *Gene* 112: 53-58.
- Elsayed S, Hamilton N, Boyd D, Mulvey M 2001. Improved primer design for multiplex PCR analysis of vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. *J Clin Microbiol* 39: 2367-2368.
- Fisher K, Phillips C 2009. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* 155: 1749-1757.
- Franz C, Stiles ME, Schleifer KH, Holzappel WH 2003. *Enterococci* in foods - a conundrum for food safety. *Int J Food Microbiol* 88: 105-122.
- French GL 1998. *Enterococci* and vancomycin resistance. *Clin Infect Dis* 27: S75-S83.
- Hassan L, Getachew YM, Zunita Z, Kamaruddin MI 2008. Distribution of *van* genes of vancomycin-resistant *Enterococcus* isolated from broilers in Peninsular Malaysia. Available from: lib.vet.chula.ac.th/Data_files/ebook/FAVA2008/paperfile/ORA06.pdf.
- Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Barrett JB 2004. Use of a genus - and species-specific multiplex PCR for identification of *Enterococci*. *J Clin Microbiol* 42: 3558-3565.
- Lawrence JG, Hendrix RW, Casjens S 2001. Where are the pseudogenes in bacterial genomes? *Trends Microbiol* 9: 535-540.
- Lebreton F, Depardieu F, Bourdon N, Fines-Guyon M, Berger P, Camiade S, Leclercq R, Courvalin P, Cattoir V 2011. d-Ala-d-Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 4606-4612.
- Medeiros AW, d'Azevedo P, Pereira RI, Cassenege AP, Van Der Sand S, Frazzon J, Frazzon APG 2010. PCR-RFLP of 16S ribosomal DNA to confirm the identification of *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus* isolated from clinical and food samples. *Rev Soc Bras Med Trop* 43: 100-101.
- Moreno MRF, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L 2006. The role and application of enterococci in food and health. *Int J Food Microbiol* 106: 1-24.
- Moura TM, Campos FS, d'Azevedo PA, Van Der Sand ST, Franco AC, Frazzon J, Frazzon APG 2012. Prevalence of enterotoxin-encoding genes and antimicrobial resistance in coagulase-negative and coagulase-positive *Staphylococcus* isolates from black pudding. *Rev Soc Bras Med Trop* 45: 579-585.
- Navarro F, Courvalin P 1994. Analysis of genes encoding D-alanine-D-alanine ligase-related enzymes in *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus flavescens*. *Antimicrob Agents Chemother* 38: 1788-1793.

456 *vanC*, *E. faecalis* in Brazil • Tiane Martin de Moura et al.

- Park IS, Lin CH, Walsh CT 1997. Bacterial resistance to vancomycin: overproduction, purification and characterization of VanC2 from *Enterococcus casseliflavus* as a D-Ala-D-Ser ligase. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 10040-10044.
- Patel R, Uhl JR, Kohner P, Hopkins MK, Cockerill FR III 1997. Multiplex PCR detection of *vanA*, *vanB*, *vanC-1*, and *vanC-2/3* genes in enterococci. *J Clin Microbiol* 35: 703-707.
- Patel R, Uhl JR, Kohner P, Hopkins MK, Steckelberg JM, Kline B, Cockerill FR III 1998. DNA sequence variation within *vanA*, *vanB*, *vanC-1*, and *vanC-2/3* genes of clinical *Enterococcus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 202-205.
- Poeta P, Antunes T, Rodrigues J 2005. *Enterococcus* spp resistentes à vancomicina isolados de fezes de frangos, pombos, gamos e ratos. *Arq Bras Med Vet Zootec* 57: 412-414.
- Ramotar K, Woods W, Larocque L, Toye B 2000. Comparison of phenotypic methods to identify enterococci intrinsically resistant to vancomycin (VanC VRE). *Diagn Microbiol Infect Dis* 36: 119-124.
- Riboldi GP, Mattos EP, Frazzon APG, d'Azevedo PA, Frazzon J 2008. Phenotypic and genotypic heterogeneity of *Enterococcus* species isolated from food in southern Brazil. *J Basic Microbiol* 48: 31-37.
- Sambrook J, Russell DW 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2344 pp.
- Satake S, Clark N, Rimland D, Nolte FS, Tenover FC 1997. Detection of vancomycin-resistant *Enterococci* in fecal samples by PCR. *J Clin Microbiol* 35: 2325-2330.
- Schwaiger K, Bauer J, Hörmansdorfer S, Mölle G, Preikschat P, Kämpf P, Bauer-Unkauf I, Bischoff M, Hölzel C 2012. Presence of the resistance genes *vanC1* and *pbp5* in phenotypically vancomycin and ampicillin susceptible *Enterococcus faecalis*. *Microb Drug Resist* 18: 434-439.
- Xu X, Lin D, Yan G, Ye X, Wu S, Guo Y, Zhu D, Hu F, Zhang Y, Wang F, Jacoby GA, Wang M 2010. *vanM*, a new glycopeptide resistance gene cluster found in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemoter* 54: 4643-4647.

4.2 Influence of vancomycin subinhibitory concentration on the *in vitro* expression of biofilm formation and virulence-related genes in *Enterococcus faecalis* VRE

Tiane Martin de Moura*, Fabrício Souza Campos, Ana Claudia Franco, Paulo Michel Roehe, Juliana Caierão, Pedro Alves d'Azevedo, Jeverson Frazzon, Ana Paula Guedes Frazzon

*Departamento Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Rua Sarmiento Leite, 245, sala 204, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil.

*Correspondence and reprints tianedemoura@gmail.com

Para submissão em periódico nacional: Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

1 SUMMARY

2 The exposure to subinhibitory concentrations (SIC) of antimicrobials may alter the
3 bacterial transcriptome, however the effect of vancomycin on the expression in
4 vancomycin resistant enterococci (VRE) isolates has not been reported. The aim of this
5 study was to analyze the expression of 9 virulence-related genes and the biofilm
6 formation of VRE isolates from urinary tract infection in the presence of SIC
7 vancomycin. We observed, for the first time, that the presence of SIC vancomycin has
8 not influenced on the biofilm formation but it was able to modulate the virulence genes
9 *in vitro* tested.

10

11 **Keywords:** VRE; vancomycin; SIC; biofilm; expression

12

13 **Sponsorships:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
14 (CNPq 470291/2010-9), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do
15 Sul (FAPERGS 11/2058-5) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
16 Superior (CAPES).

17

18 INTRODUCTION

19 *Enterococcus faecalis* is part of the normal human microbiota and has been considered
20 as the fifth pathogen associated with Healthcare-Associated Infections (Sievert et al.
21 2013). This species present a complex virulence arsenal, which include biofilm
22 formation and expression of surface adhesion components. The ability of *E. faecalis* to
23 adhere and develop biofilm in different medical devices, such as ureteral stents and
24 catheters, is probably associated to its potential to cause urinary tract infections (UTI)

25 and other infections, moreover evidence suggests that in human urine biological signals
26 may play an important role in modulating virulence (Mohamed & Huang 2007).

27 The biofilm on plastic surfaces operon (*bopABCD*) has been showed to be essential for
28 biofilm production system (Qin et al. 2001, Hufnagel et al. 2004). The adhesin collagen
29 protein (ACE) and aggregation substance protein (ASC10) are well-known proteins
30 that also play an important role in biofilm production (Waters and Dunny et al., 2001;
31 Chuang-Smith et al., 2010).

32 In enterococci, the sulfur assimilation system (SUF) is responsible for the iron-sulfur
33 ([Fe-S]) cluster biogenesis and it is essential for survival, especially during aerobic
34 growth or under conditions of oxidative stress, SUF is associated with virulence,
35 moreover is the only system for the synthesis of iron-sulfur proteins in enterococci
36 (Riboldi et al. 2009). The SUF operon is controlled by the regulatory protein sensor for
37 oxidative stress (OxyR) essential for the oxidative stress response, and by the ferric
38 uptake regulator (Fur) involved in a variety of cellular processes such as acid tolerance,
39 virulence, production of toxins, flagella chemotaxis and metabolic pathways (Giel et al.
40 2006).

41 Vancomycin resistant enterococci (VRE) have emerged as important nosocomial
42 pathogens worldwide (Cetinkaya et al. 2000) and the *vanA* genotype has been shown to
43 be the most widely distributed and confers high levels of resistance (Arthur et al. 1996,
44 Arthur & Quintiliani 2001, Courvalin 2006). Vancomycin acts as a signal molecule that
45 is detected by a membrane-associated domain which is a sensor the presence of
46 glycopeptides in the culture medium resulting in transcriptional activation of regulatory
47 and resistance genes, and it has been shown that the presence of vancomycin in the

48 medium is essential for the expression of *van* genes (Arthur & Quintiliani 2001,
49 Courvalin 2006, Hughes 2003).
50 Clinical use of vancomycin is a subject of major concern, as it requires continuous
51 monitoring of seric concentration of the drug - approximately 15 mg/d. Sometimes, due
52 to the complex pharmacokinetics of vancomycin, this value is not achieved and the
53 patients became submitted to subinhibitory concentrations. An increased report of
54 vancomycin failure and poor outcomes has been observed. It is well-established that
55 under this condition there is higher probability of selecting resistant or heteroresistant
56 isolates (van Hal & Fowler, 2013). Studies have shown that exposure to subinhibitory
57 concentrations (SIC) of antimicrobials could alter the transcriptomic and phenotypic
58 response of pathogenic bacteria (Cargill & Upton 2009, Kaplan et al. 2011, Romero et
59 al. 2011). However, weather this condition affect virulence remains unclear. There are
60 no reports about the effects of vancomycin on the gene expression of enterococci. The
61 aim of this study was to investigate the biofilm formation and the expression of
62 virulence-related genes of one *E. faecalis* VRE strain from urinary tract infection (UTI)
63 in the presence of subinhibitory concentration vancomycin.

64

65 **MATERIALS AND METHODS**

66 **Bacterial strains and determination of the minimal inhibitory concentration (MIC)** 67 **to vancomycin**

68 Bacterial strains used in this study are listed in Table 1. Genomic DNA was extracted
69 (Moura et al. 2012) and the species were confirmed (Depardieu et al. 2004) as well as
70 the presence of the *vanA* gene (Dutka-Malen et al. 1995). The minimal inhibitory
71 concentration (MIC) to vancomycin was verified by Epsilometer-test method (256 µg –

72 bioMérieux[®]) and by the broth microdilution method (48 - 1024 µg/ml – Sigma-
73 Aldrich[®]) according to CLSI (CLSI 2013).

74

75 **Growth conditions**

76 The growth capacity of four *Enterococcus faecalis* strains was examined but one of
77 these strains was selected for transcriptional profiling based on their growth curve. For
78 others experiments all *E. faecalis* strains were streaked on a TSB agar and incubated at
79 37°C over night (ON). Four individual colonies were then inoculated into the same tube
80 of 5 ml 2xYT broth [1% (w/v) yeast extract, 1.6% (w/v) tryptone and 1% (w/v) NaCl]
81 and grown ON without shaking at 37°C. For growth in urine, human urine was collected
82 from six healthy men and women volunteers who had no history of UTI or antibiotic
83 use in the last 6 months. The urine was pooled, centrifuged at 6000×g and sterilized
84 twice by filtration (0.45 – 0.22 µm-pore size TPP[®]) and added randomly in different
85 concentration into the 2xYT broth: 50% of urine (2xYT-U50), 25% (2xYT-U25), 12%
86 (2xYT-U12), 10% (2xYT-U10), 8% (2xYT-U8), 6% (2xYT-U6), 4% (2xYT-U4), 2%
87 (2xYT-U2). The control broth did not contain urine (2xYT) and was also tested urine
88 pure. The concentration of vancomycin chosen for these assays (64 µg/ml) was based
89 on the range of 64-1000 µg/ml, which reference high level resistance (Leclercq et al.,
90 1988; Arthur et al, 1996a; Courvalin, 2006).

91

92 **Growth measurement**

93 The *E. faecalis* strains were pre-cultured as described above. Growth curve assays were
94 measured in spectrophotometer and performed in triplicates with a total volume of 500
95 µl bacterial inoculum inoculated in 50 ml in both 2xYT and 2xYT-U10 broth.. Cultures

96 were incubated with shaking at 37°C and optical density 600 nm (OD₆₀₀) was
97 measured at 30-min intervals for 9 hours.

98

99 **Biofilm formation assay**

100 The isolates were previously inoculated on plates containing 2xYT agar and incubated
101 35 °C overnight. The cultures were diluted in 0.9 % saline up to 0.5 McFarland
102 Standard. Eight wells of a 96-well flat-bottomed plate assay (Nest Biotechnology
103 Co.,LTD) were filled with 20 µl of bacterial suspension each. (i) Drug-Free Condition
104 (DFC) and (ii) Vancomycin Condition 64 µg/ml (VC) were tested in ten different
105 conditions: broth control, pure urine and 50% - 2% of urine (2xYT-U2). The isolates
106 were grown at 35 °C for 16 h and were analyzed for their ability to form biofilm
107 followings the protocol previously described (Stepanovic et al. 2000). *Staphylococcus*
108 *epidermidis* ATCC 35984 was used as a positive control (strong adhesive). The OD₄₅₀
109 of each well was measured using an Anthos 2010 Microplate Reader (Biochrom®) and
110 all tests were carried out in triplicates. Paired *t-test* was used to compare the absorbance
111 values of biofilm formers (p-value ≤ 0.05).

112

113 **Transcriptional analysis of gene expression**

114 The strain UTI-2389 was randomly selected to perform qPCR assays. Eleven genes were
115 analyzed by qPCR, including two housekeeping genes (*tuf* and *23S*), and the sequences
116 of the oligonucleotides used in this study are described in Table 1. Three independent
117 500 µl overnight growth cultures grown at 35°C in 2xYT-U10 were inoculated in 50 ml
118 of 2xYT-U10 (DFC) and 50 ml of 2xYT-U10 contains 64 µg/ml of vancomycin (VC).
119 Total RNA was collected at early-exponential phase (OD_{650nm} 0.3) and extracted with

120 TRIzol[®] (Invitrogen) following the manufacturer's protocol with minor modifications
121 previously described (Moura et al. 2013). Next, RNA was treated with DNase I (RNase-
122 free) (Fermentas[®]) and quantified in BioSpec-nano (Shimadzu[®]), the complementary
123 DNA (cDNA) was synthesized using random primers (High Capacity cDNA Reverse
124 Transcription Kit, Applied Biosystems[®]). Quantitative PCR was performed in a final
125 volume of 20 μ l containing 0.2 μ Mol of each primer (Invitrogen[®]), 1 \times Fast EvaGreen[®]
126 qPCR Master Mix (Biotium[®]), deionized water (Milli Q plus, Millipore[®]) and 100 pg
127 cDNA. Reactions were performed in Eco[™] Real Time PCR System (Illumina[®]) under
128 universal cycling protocol. The NormFinder analysis (Andersen et al. 2004) was used to
129 estimate the stability of the *23S* and *tuf* genes, which were used to normalize the
130 difference in gene expression. Differential expression was calculated by the Pfaffl
131 method (Pfaffl 2001) and the Paired *t*-test was performed in Excel (p -value ≤ 0.05).

132

133 **RESULTS AND DISCUSSION**

134 As far as we know, this is the first study evaluating the influence of vancomycin
135 subinhibitory concentration in the biofilm formation and expression of virulence-related
136 genes.

137 The results of the phenotypic and genotypic testing of the strains used herein are shown
138 in Table 1 and Figure 1. Analyzing the effect of urine on biofilm formation we detected
139 that all VRE strains were able to grow in concentrations from 50-2% urine but not in
140 pure urine. However, the isolate UTI-2389 showed the highest OD value. No significant
141 association between biofilm formation and different urine concentrations was observed
142 (p -value ≤ 0.05). In our case, this results would be explained due to the restriction in the
143 *in vitro* environment, which we don't have other components from urinary system *in*

144 *vivo*, like urothelial cells, glucose, mineral salts and albumin. This behavior goes in
145 contradiction with what is proposed by Shepard & Gilmore (2002) which suggesting
146 that in human urine there are biological signals that may play an important role in
147 modulating virulence in enterococci infection sites. Furthermore, it is known that
148 growth in urine is able to modulate the expression of genes which are important in the
149 uropathogenesis of *E. faecalis* strains.

150 The results on the biofilm assay showed that all strains were classified as “non-
151 adherent” in both DFC and VC conditions. Kaplan et al. (2011) shown maximal biofilm
152 induction at a concentration of 3/4 MIC, nevertheless, Cargill and Upton (2009) utilized
153 vancomycin at concentrations that were $\leq 1/2$ MIC and they found little or no effect on
154 *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. Although we have no knowledge about
155 the action of vancomycin on biofilm formation in VRE strains, we can infer that the
156 low-concentration of vancomycin used in our study (1/6 MIC) produced no effect on
157 biofilm formation.

158 Based on the results presented in the biofilm assays we chose the strain UTI-2389 and
159 the concentration of 10% urine (2xYT-U10) in the growth medium to perform qPCR
160 assays. The data was obtained on the relative quantification of mRNA amount is shown
161 in Table 3. A significant increment of *vanA* expression in VC condition ($p \leq 0.05$) was
162 detected. Since this gene was previously described as vancomycin-inducible (Courvalin
163 2006), we confirmed the up and downregulation of all the selected genes.

164 In our study, the genes of the *bop* operon were partially regulated in the presence of
165 subinhibitory concentrations of vancomycin. The presence of antibiotics in the growth
166 medium was able to significantly increase the expression of *bopA* and *bopC* genes,
167 however about the expression of *bopB* and *bopD* genes the vancomycin caused a slight

168 downregulation. The partial regulation of the *bop* operon in VRE strain has also been
169 reported (Vebø et al. 2010) under normal growth conditions without antimicrobial
170 agents. This suggests that this operon can actually behave irregularly even in normal
171 growth conditions. A previous study evaluated the effect of plant-derived antimicrobials
172 on *Listeria monocytogenes* and detected a partial regulation of operon *agrABC* (*quorum*
173 *sensing*-related) (Upadhyay et al. 2013).

174 Two other proteins involved in biofilm production and pathogenesis in enterococci are
175 ACE and ASC10. In our experiment, the regulation of *ace* and *asc10* genes was not
176 significantly altered, the *ace* expression was downregulated and the *asc10* was
177 upregulated. These results suggest that subinhibitory concentrations of vancomycin do
178 not have an appreciable effect on gene expression of *ace* gene. Nallapareddy and
179 Murray (2006) found a higher expression of *ace* gene in *E. faecalis* during mid-
180 exponential and entry into stationary growth phase at 46 °C in normal growth
181 conditions. However, at 37 °C, the expression was barely detected at the mid-
182 exponential and late exponential phases and was not detectable in cells at stationary
183 phase, suggesting that the *ace* transcription is very low during standard *in vitro* growth
184 conditions. Lebreton et al. (2009) characterized the promoter region of *ace* and
185 identified that this gene is directly regulated by the enterococcal *Enterococcus*
186 *Regulator of Survival* (Ers), and the transcription of ACE appears to be induced by the
187 presence of bile salts, probably through the suppression of Ers. On the other hand, the
188 *acs10* gene was induced by vancomycin. The *prgB* gene from *E. faecalis* is located in
189 pCF10 conjugative plasmid; which encodes the surface protein ASC10. The peptide
190 pheromone cCF10 is an intercellular signal for induction of conjugative transfer of
191 plasmid pCF10 (Hedberg et al. 1996). It is known that antibiotics act as signaling

192 molecules; it is possible that the glycopeptide may have acted as a signal, inducing the
193 expression of *asc* gene.

194 We detected a minor downregulation of the *oxyR* gene expression. In *E. faecalis*, during
195 intracellular oxidative stress, the SUF system is induced by OxyR, but it also requires
196 the expression of the integration host factor (Riboldi et al. 2013). In this *in vitro* study
197 no formation of H₂O₂ was observed and there were no integration host factors; this may
198 be one of the reasons for the lack of the stimulation of the *oxyR* gene. Regarding the
199 expression of *fur* gene, it was upregulated significantly. Considering that the
200 concentration of iron did not suffer alterations during the experiments was not tested in
201 this study, we can infer that there is other form of regulation of this gene further the
202 condition of cellular iron, because the stress caused by vancomycin promoted an
203 overexpression of this gene. Another suggestion is that the *fur* may be operated in a
204 different way due to homeostasis of cofactors (Fe-S) in the cell, and may be involved in
205 other cellular processes, since the SUF system is the housekeeping machinery for *E.*
206 *faecalis* and its suppression would not be advantageous to the cell.

207 The mechanisms of transcriptional modulation is not yet known, but may involve
208 bacterial stress responses and/or the disturbance and subsequent compensation of
209 metabolic networks as a result of subtle interference with ribosome function (Tsui et al.
210 2004). In addition, vancomycin, due to its toxicity, is able to interfere in the modulation
211 of genes in eukaryotic organisms (Dieterich et al. 2005).

212 We present here for the first time, data related to the behavior of VRE strain in the
213 presence of subinhibitory concentration of vancomycin. The nine genes evaluated in
214 this work are related to virulence factors often present in *E. faecalis*. Although there
215 was an increase in the expression of some genes of VRE in the presence of the

216 vancomycin, no difference in the phenotype of the strain was observed in *in vitro* tests.
217 However, this study showed that vancomycin is capable of interfering with modulation
218 of virulence-related genes of VRE.

219 In conclusion, we observed for the first time that the presence of vancomycin is capable
220 of interfering with gene modulation but not in phenotype of VRE from UTI in *in vitro*
221 test. Vancomycin was able to induce significantly the expression of *vanA*, *bopA*, *bopC*
222 and *acs10* genes involved in adhesion cellular but not on the biofilm formation. In the
223 SUF regulation system vancomycin induced the expression of the *fur* gene, suggesting
224 that *fur* gene may be involved in other cellular processes, since the SUF system is the
225 housekeeping machinery of *E. faecalis*. Although the data presented here relate to *in*
226 *vitro*, assays, it is possible the vancomycin may be contributing to the increase in the
227 expression of virulence factors *in vivo* leading to worse of clinical outcomes, and can
228 contribute to the selection of vancomycin-resistant strains. Despite these changes,
229 vancomycin did not alter the phenotype of the strains that were considered "non-
230 adherent".

231 **Limitations of this study:** The strains had previous isolation and identification in the
232 local hospital, so we have no records about the patients nor the use treatment as well as
233 clinical outcome. Our main interest was to observe the behavioral response of a clinical
234 VRE strain against vancomycin, for this reason we did not test with other antimicrobials
235 or a comparison with a reference strain. *In vitro* experiments may not effectively
236 represent the complex *in vivo* conditions during an enterococcal urinary tract infection.
237 Many other signaling molecules may modulate *in vivo* enterococcal virulence.
238 However, other studies *in vitro* and *in vivo* with higher bacterial population should be
239 undertaken to strengthen our findings.

240 **ACKNOWLEDGEMENTS**

241 The authors would like to thank the Universidade Federal do Rio Grande do Sul
242 (UFRGS) and Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).
243 This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
244 Tecnológico (CNPq 470291/2010-9), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do
245 Rio Grande do Sul (FAPERGS 11/2058-5) and Coordenação de Aperfeiçoamento de
246 Pessoal de Nível Superior (CAPES). TM de Moura and J Caierão are Postdoc student at
247 UFCSPA grantees of CAPES, FS Campos is a Postdoc student at UFRGS grantees of
248 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and
249 CAPES. AC Franco, PM Roehe, J Frazzon and P d'Azevedo are CNPq research
250 fellows.

251

252 **REFERENCES**

253 Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF 2004. Normalization of real-time quantitative
254 reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify
255 genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer*
256 *Res* 64(15): 5245-50.

257 Arthur M, Quintiliani RJr 2001. Regulation of VanA- and VanB-type glycopeptide
258 resistance in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 2001 45(2): 375-81.

259 Arthur M, Reynolds P, Courvalin P 1996. Glycopeptide resistance in enterococci.
260 *Trends Microbiol* 4(10): 401-7.

- 261 Cargill JS, Upton M 2009. Low concentrations of vancomycin stimulate biofilm
262 formation in some clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Pathol* 62(12):
263 1112-6. doi: 10.1136/jcp.2009.069021. Epub 2009 Jul 28.
- 264 Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG 2000. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin*
265 *Microbiol Rev* 13(4): 686-707.
- 266 Chuang-Smith ON, Wells CL, Henry-Stanley MJ, Dunny GM 2010. Acceleration of
267 *Enterococcus faecalis* biofilm formation by aggregation substance expression in an ex
268 vivo model of cardiac valve colonization. *PLoS One* 5(12): e15798. doi:
269 10.1371/journal.pone.0015798.
- 270 CLSI 2013. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-
271 Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Clinical and Laboratory
272 Standards Institute, Wayne.
- 273 Courvalin P 2006. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin Infect Dis*
274 42(S1): S25-34.
- 275 Depardieu F, Perichon B, Courvalin P 2004. Detection of the van alphabet and
276 identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. *J*
277 *Clin Microbiol* 42(12): 5857-60.
- 278 Dieterich C, Puey A, Lin S, Swezey R, Furimsky A, Fairchild D, Mirsalis JC, Ng HH
279 2009. Gene expression analysis reveals new possible mechanisms of vancomycin-
280 induced nephrotoxicity and identifies gene markers candidates. *Toxicol Sci* 107(1): 258-
281 69. doi: 10.1093/toxsci/kfn203. Epub 2008 Oct 16.

- 282 Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P 1995. Detection of glycopeptide resistance
283 genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by
284 PCR. *J Clin Microbiol* 33(1): 24-7.
- 285 Giel JL, Rodionov D, Liu M, Blattner FR, Kiley PJ 2006. IscR-dependent gene
286 expression links iron-sulphur cluster assembly to the control of O2-regulated genes in
287 *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 60(4): 1058-75.
- 288 Hedberg PJ, Leonard BA, Ruhfel RE, Dunny GM 1996. Identification and
289 characterization of the genes of *Enterococcus faecalis* plasmid pCF10 involved in
290 replication and in negative control of pheromone-inducible conjugation. *Plasmid* 35(1):
291 46-57.
- 292 Hufnagel M, Koch S, Creti R, Baldassarri L, Huebner J 2004. A putative sugar-binding
293 transcriptional regulator in a novel gene locus in *Enterococcus faecalis* contributes to
294 production of biofilm and prolonged bacteremia in mice. *J Infect Dis* 189(3): 420-30.
- 295 Hughes D 2003. Exploiting genomics, genetics and chemistry to combat antibiotic
296 resistance. *Nat Rev Genet* 4(6): 432-41.
- 297 Kaplan JB, Jabbouri S, Sadovskaya I 2011. Extracellular DNA-dependent biofilm
298 formation by *Staphylococcus epidermidis* RP62A in response to subminimal inhibitory
299 concentrations of antibiotics. *Res Microbiol* 162(5): 535-41. doi:
300 10.1016/j.resmic.2011.03.008. Epub 2011 Mar 12.
- 301 Laureti L, Matic I, Gutierrez A 2013. Bacterial Responses and Genome Instability
302 Induced by Subinhibitory Concentrations of Antibiotics. *Antibiotics* 2(1): 100-114.
303 doi:10.3390/antibiotics2010100

- 304 Lebreton F, Riboulet-Bisson E, Serror P, Sanguinetti M, Posteraro B, Torelli R, Hartke
305 A, Auffray Y, Giard JC 2009. ace, Which encodes an adhesin in *Enterococcus faecalis*,
306 is regulated by Ers and is involved in virulence. *Infect Immun* 77(7): 2832-9. doi:
307 10.1128/IAI.01218-08. Epub 2009 May 11.
- 308 Mohamed JA, Huang DB 2007. Biofilm formation by enterococci. *J Med Microbiol*
309 56(Pt 12): 1581-8.
- 310 Moura TM, Campos FS, d'Azevedo PA, Van Der Sand ST, Franco AC, Frazzon J,
311 Frazzon AP 2012. Prevalence of enterotoxin-encoding genes and antimicrobial
312 resistance in coagulase-negative and coagulase-positive *Staphylococcus* isolates from
313 black pudding. *Rev Soc Bras Med Trop* 45(5): 579-85.
- 314 Moura TM, Cassenego AP, Campos FS, Ribeiro AM, Franco AC, d'Azevedo PA,
315 Frazzon J, Frazzon AP 2013. Detection of vanC1 gene transcription in vancomycin-
316 susceptible *Enterococcus faecalis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108(4): 453-6. doi:
317 10.1590/S0074-0276108042013009.
- 318 Nallapareddy SR, Murray BE 2006. Ligand-signaled upregulation of *Enterococcus*
319 *faecalis* ace transcription, a mechanism for modulating host-E. *faecalis* interaction.
320 *Infect Immun* 74(9):4982-9.
- 321 Pfaffl MW 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-
322 PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9): e45.
- 323 Qin X, Singh KV, Weinstock GM, Murray BE 2001. Characterization of *fsr*, a regulator
324 controlling expression of gelatinase and serine protease in *Enterococcus faecalis*
325 OG1RF. *J Bacteriol* 183(11): 3372-82.

- 326 Riboldi GP, de Mattos EP, Frazzon J 2013. Biogenesis of [Fe-S] cluster in Firmicutes:
327 an unexploited field of investigation. *Antonie Van Leeuwenhoek* 104(3): 283-300. doi:
328 10.1007/s10482-013-9966-5. Epub 2013 Jul 13.
- 329 Riboldi GP, Verli H, Frazzon J 2009. Structural studies of the Enterococcus faecalis
330 SufU [Fe-S] cluster protein. *BMC Biochem* 10(3): doi: 10.1186/1471-2091-10-3.
- 331 Romero D, Traxler MF, López D, Kolter R 2011. Antibiotics as signal molecules. *Chem*
332 *Rev* 111(9): 5492-505. doi: 10.1021/cr2000509. Epub 2011 Jul 25.
- 333 Shepard BD, Gilmore MS 2002. Differential expression of virulence-related genes in
334 *Enterococcus faecalis* in response to biological cues in serum and urine. *Infect Immun*
335 70(8):4344-52.
- 336 Sievert DM, Ricks P, Edwards JR, Schneider A, Patel J, Srinivasan A, Kallen A,
337 Limbago B, Fridkin S; National Healthcare Safety Network (NHSN) Team and
338 Participating NHSN Facilities 2013. Antimicrobial-resistant pathogens associated with
339 healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare
340 Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. *Infect*
341 *Control Hosp Epidemiol* 34(1): 1-14.
- 342 Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M 2000. A modified
343 microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol*
344 *Methods* 40(2): 175-9.
- 345 Tsui WH, Yim G, Wang HH, McClure JE, Surette MG, Davies J. Dual effects of MLS
346 antibiotics: transcriptional modulation and interactions on the ribosome. *Chem Biol*
347 11(9):1307-16.

- 348 Upadhyay A, Upadhyaya I, Kollanoor-Johny A, Venkitanarayanan K 2013. Antibiofilm
349 effect of plant derived antimicrobials on *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol*
350 *36(1)*: 79-89. doi: 10.1016/j.fm.2013.04.010. Epub 2013 May 1.
- 351 van Hal SJ & Fowler VG Jr 2013. Is it time to replace vancomycin in the treatment of
352 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections? *Clin Infect Dis* *56(12)*: 1779-88.
353 doi: 10.1093/cid/cit178. Epub 2013 Mar 19.
- 354 Vebø HC, Solheim M, Snipen L, Nes IF, Brede DA 2010. Comparative genomic
355 analysis of pathogenic and probiotic *Enterococcus faecalis* isolates, and their
356 transcriptional responses to growth in human urine. *PLoS One* *5(8)*: e12489. doi:
357 10.1371/journal.pone.0012489.
- 358 Waters CM, Dunny GM 2001. Analysis of functional domains of the *Enterococcus*
359 *faecalis* pheromone-induced surface protein aggregation substance. *J Bacteriol* *183(19)*:
360 5659-67.

Table 1. Bacterial strains used in this study.

Strain	Country	Source	Isolation Site	Year	Molecular Identification		Resistance characteristics		
					Species	<i>vanA</i> gene	E-test ^a (µg/ml)	MIC ^b (µg/ml)	
1950	Porto Alegre	Hospitalized patient	PSC	Urine	2001	<i>E. faecalis</i>	Positive	≥ 256	384
1953	Porto Alegre	Hospitalized patient	PSC	Urine	2001	<i>E. faecalis</i>	Positive	≥ 256	384
2319	Porto Alegre	Hospitalized patient	HSR	Urine	2002	<i>E. faecalis</i>	Positive	≥ 256	384
2389	Porto Alegre	Hospitalized patient	PSC	Urine	2002	<i>E. faecalis</i>	Positive	≥ 256	384

PSC = Pronto Socorro Central, HSR = Hospital Santa Rita; Van = Vancomycin; a = according to manufacturer bioMérieux®; b = according to CLSI 013.

Table 2. List of genes and primers used for real-time quantitative PCR.

Gene (LocusTag)	Primer		Primer sequences (5' – 3')	Reference
23S ribosomal RNA (Ef23SA)	23S	23S_F ^a	TGGAAGGTTAAGAGGATGGG	This work
		23S_R ^b	GGAACTTACCCGACAAGGAA	
Elongation factor Tuf (EF0201)	<i>tuf</i>	tuf_F	TTATCGCAGGTTCTGCTTTG	This work
		tuf_R	GAATACGTCTTCGACTGGCA	
Collagen adhesin protein (EF1099)	<i>ace</i>	ace_F	AAAGCAGCCAACCAGAAGTT	This work
		ace_R	TCTGTTGTGCCGTTCTCTTC	
Aggregation substance proteins (pCF10_16)	<i>asc10</i>	asc_F	CGGTACAGTTGGCAGTGTCT	This work
		asc_R	CGTGTCCAACACATCATTCA	
Maltose phosphorylase (EF0957)	<i>bopA</i>	bopA_F	CTGCTGAATTAGGCATGGAA	This work
		bopA_R	CAATCGCTAGCCAACACTACCA	
Beta-phosphoglucomutase (EF0956)	<i>bopB</i>	bopB_F	CTGGGATTCAAGCGATTCTT	This work
		bopB_R	CCTTCATGATCAAGCCACAC	
Aldose epimerase (EF0955)	<i>bopC</i>	bopC_F	TTAACCGACACCATTTCTGG	This work
		bopC_R	GTAGGCGTGGTTCGTAGGAT	
LacI family sugar-binding transcriptional regulator (EF0954)	<i>bopD</i>	bopD_F	CAACTTGCGCAAATCTATGG	This work
		bopD_R	ATCGCCATTCGACCTAATTC	
FUR family transcriptional regulator (EF1525)	<i>fur</i>	fur_F	CCAAACACTTTCACCACCAT	This work
		fur_R	TTTGCTCTACTTCACCAAGCA	
OxyR family transcriptional regulator (EF2958)	<i>oxyR</i>	oxyR_F	TCTCGACAAGCACAAGTTCC	This work
		oxyR_R	ACCTAGCCCAGCTTCTACCA	
Vancomycin resistance (M97297.1)	<i>vanA</i>	vanA_F	TAATTGAGCAGGCTGTTTCG	This work
		vanA_R	TACTGCAGCCTGATTTGGTC	

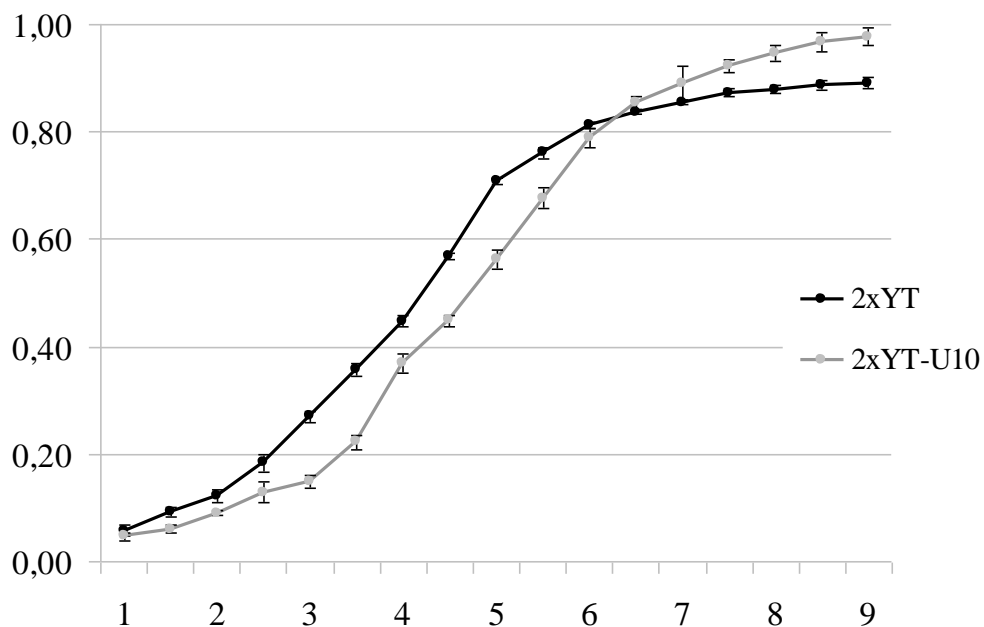
a: primer sense, b: primer antisense. The primers were designed by bioinformatics tool (<https://www.genscript.com/ssl-bin/app/primer>)

Table 3. Δ Ct and ratio values of expression to some genes from VRE grown in 2xYT/Urina in drug-free condition (DFC) and vancomycin condition (VC) in quantitative PCR assay, by Pfaffl mathematical model.

Genes	ΔCt	<i>E</i>	ratio (<i>R</i>)
Virulence related-genes			
<i>vanA</i>	5.93	2.02	49.71 (\pm 7.25)*
<i>bopA</i>	6.28	1.94	49.06 (\pm 7.16)*
<i>bopB</i>	-0.07	2.04	-0.81 (\pm 0.12)
<i>bopC</i>	3.38	1.90	6.79 (\pm 0.99)*
<i>bopD</i>	-1.39	2.06	-2.11 (\pm 0.31)
<i>ace</i>	-6.03	1.90	-37.48 (\pm 5.47)
<i>asc10</i>	1.91	1.94	2.76 (\pm 0.40)
Regulatory systems			
<i>fur</i>	7.55	1.90	98.65 (\pm 14.39)*
<i>oxyR</i>	-0.56	1.89	-1.10 (\pm 0.16)
Reference genes			
<i>tuf</i>	-0.17	1.98	na
<i>23S</i>	0.61	1.96	na

Ct = Cycle Threshold; *E* = efficiency of the reaction (primers); *R* = the relative expression ratio is the average value of the normalized based on the reference genes; *Statistical difference in the amount of transcripts ($p < 0.05$); na = not apply.

Figure 1. Growth *Enterococcus faecalis* in 2xYT and 2xYT supplemented with urine.



Characterization of growth of *E. faecalis* VRE clinic isolate in 2xYT broth (black line) and 2xYT broth with 10 % urine (grey line). The growth curves are represented by the absorbance value (OD_{600nm}) on the Y-axis, and hours as indicated on the X-axis. The growth curves correspond to the mean of triplicates \pm STD of two parallels.

CAPÍTULO 5. DISCUSSÃO GERAL

Neste capítulo optamos por apresentar considerações que julgamos relevantes em complementação ao conteúdo já publicado no Artigo 1. Em relação ao Artigo 2, em construção, levantaremos pontos mais amplos não discutidos na versão aqui apresentada.

- Referente ao artigo 1: **Detection of *vanC*₁ gene transcription in vancomycin susceptible *Enterococcus faecalis*.**

A presença do gene *vanC*₁ em *E. faecalis* vancomicina-sensíveis, isoladas a partir de amostras de estrume de porco foi descrita pela primeira vez na Alemanha (Schwaiger et al., 2012). A detecção desses genes em *vanC* em *E. faecalis* é importante, porque estes genes, em princípio, seriam intrínsecos às espécies *E. gallinarum* (*vanC*₁) e *E. casseliflavus* (*vanC*_{2/3}). Todavia, como o operon *vanC* está localizado em uma região transferível, como um transposon e/ou integron, o *E. faecalis* pode ter adquirido os genes *vanC* por transferência horizontal daquelas espécies habitantes naturais do intestino de aves. Este fluxo de transferência enfatiza que a localização cromossômica de um gene em isolados intrinsecamente resistentes não necessariamente protege contra

transferência para outras espécies, contribuindo assim para a diversificação de espécies.

As sequências parciais dos genes *ddl*_{*E.faecalis*} (JX220983), *vanC*₁ (JX220984) e *vanC*_{2/3} (JX220985) foram analisadas e depositadas no GenBank com os respectivos números de acesso. Cada sequência de gene mostrou uma proximidade filogenética a uma espécie diferente dentro do gênero *Enterococcus*. Assim, a presença destes genes em *E. faecalis* provavelmente representa a aquisição de *vanC*₁ de *E. gallinarum* e de *vanC*_{2/3} de *E. casseliflavus*.

Referente ao Artigo 2: **Influence of subinhibitory concentration of vancomycin on the expression of virulence-related genes in *Enterococcus faecalis* isolated from urinary tract infections**

Um estudo avaliou o efeito do tratamento com vancomicina na expressão de genes de virulência em *Staphylococcus aureus* vancomicina-resistente (VISA) (Chen et al., 2011) e foi demonstrado que a presença do antibiótico foi também capaz de modular a indução e repressão de genes associados à virulência.

No que diz respeito aos cofatores [Fe-S], a formação de radicais hidroxilas danificam o DNA e as proteínas levando à morte da célula (Kohanski et al., 2008, 2010). O efeito do tratamento com eritromicina em *E. faecalis* causou um pequeno aumento no nível de transcrição para cofatores [Fe-S] (-0,78 a 0 vezes) (Aakra et al., 2005). Em um estudo com *E. coli* (Ezraty et al.,

2013) mostraram os cofatores [Fe-S] desempenhando um papel-chave na resistência aos aminoglicosídeos, afetando a sua força motriz de prótons, que é necessária para o *uptake* de aminoglicosídeos, além disso há uma mudança do sistema *ISC* para o sistema *SUF* para permitir quantidades suficientes de cofatores [Fe-S] para a sobrevivência. Da mesma forma, durante a limitação de ferro, as células tornaram-se intrinsecamente resistentes a aminoglicosídeos por esta troca de sistemas (ISC-SUF) e pela repressão de complexos respiratórios, concluindo que as proteínas Fe-S promovem a morte celular por permitir a absorção de aminoglicosídeos.

Uma característica importante da vancomicina e que não deve ser esquecida é sua toxicidade em humanos. Os mecanismos de toxicidade vancomicina permanecem mal compreendidos, mas por causa de sua toxicidade o uso é restrito a pacientes que estão gravemente doentes ou que têm uma hipersensibilidade demonstrada para os β -lactâmicos e é uma das últimas linhas disponíveis de defesa contra bactérias Gram-positivas resistentes à metilina (Dieterich et al., 2009).

Chen et al. (2011) detectaram o aumento da citotoxicidade e demonstraram que a vancomicina estimula o fator σ B (modulador de resposta geral de stress) que está envolvido na expressão de genes associados a virulência e ao aumento da citotoxicidade. Em outro estudo, o objetivo foi o de obter *insights* sobre os mecanismos moleculares da nefrotoxicidade em nível genômico: avaliar genes marcadores de lesão renal induzida por vancomicina e comparar as respostas de expressão gênica após a administração em grupos de camundongos BALB/c tratados com diferentes doses diárias de vancomicina

(Dieterich et al., 2009). Este estudo indicou o envolvimento do estresse oxidativo e dano mitocondrial em lesão renal induzida por vancomicina e detectou uma potencial contribuição da via do complemento e inflamação na toxicidade renal. A expressão de vários marcadores baseados em genes previamente identificados de toxicidade foi dramaticamente afetada pela administração de dose elevada de vancomicina.

CAPÍTULO 6. CONCLUSÕES

Respondendo aos objetivos específicos desta tese, verificamos apenas a presença de genes de resistência *vanA* em isolados clínicos *E. faecalis* e nos isolados de animais verificamos a presença dos genes *vanC*₁ e *vanC*_{2/3}.

Verificamos que a concentração inibitória mínima (CIM) de vancomicina nos isolados que portavam genes *vanC* foi de 1 e 4 µg/ml, sendo considerados sensíveis à vancomicina; a CIM de vancomicina em todos isolados que portavam o gene *vanA* foi de 384 µg/ml, sendo considerados resistentes à vancomicina.

Verificamos que os isolados portadores de genes *vanC* demonstraram sensibilidade à teicoplanina e os portadores de genes *vanA* demonstraram resistência à teicoplanina.

Verificamos a presença de transcritos dos genes *vanC*₁ e *vanC*_{2/3} por RT-PCR em *E. faecalis* vancomicina-susceptíveis.

Verificamos que presença de concentração subinibitória de vancomicina foi capaz de induzir a expressão dos genes *vanA*, *bopA*, *bopC*, *asc10* e *fur* e reprimir a expressão dos genes *bopB*, *bopD*, *ace* e *oxyR* por PCR Quantitativo (qPCR).

Verificamos que a formação de biofilme em cepas clínicas EVR não é alterada em diferentes concentrações de urina, porém as cepas testadas não conseguiram se desenvolver em urina pura.

Verificamos que a formação de biofilme em cepas clínicas EVR se mantém significativamente similar na ausência e na presença de concentração subinibitória de 64µg/mL de vancomicina.

De maneira geral, nós relatamos aqui pela primeira vez a expressão e identificação de mRNA do gene *vanC* em *Enterococcus faecalis* suscetível à vancomicina. Nossos resultados sugerem que *E. faecalis* pode ter adquirido os genes *vanC* por transferência horizontal de *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* indicando que a detecção deste gene não deve ser utilizado como instrumento para a detecção de espécies

Também relatamos pela primeira vez que a presença de concentração subinibitórias de vancomicina *in vitro* é capaz de interferir com a modulação de genes em isolados EVR, embora não influencie sobre o fenótipo dessas cepas. Apesar dos dados aqui apresentados serem referentes a testes *in vitro*, é possível que a vancomicina possa estar contribuindo para o aumento na expressão de fatores de virulência *in vivo* levando a piores resultados clínicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAKRA Å. *et al.* Transcriptional Response of *Enterococcus faecalis* V583 to Erythromycin, **Antimicrob Agents Chemother**, United States, v.49, n.6, p.2246–2259, Jun.2005.
- AARESTRUP, F.M. *et al.* Glycopeptide susceptibility among Danish *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates of animal and human origin and PCR identification of genes within the VanA cluster. **Antimicrob Agents Chemother**, United States, v.40, n.8, p.1938–1940, Aug.1996.
- 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**, Netherlands, v.123, n.1-2, p.38-49, Mar.2008.
- AGAR, J.N. *et al.* IscU as a scaffold for iron-sulfur cluster biosynthesis: sequential assembly of [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters in IscU. **Biochemistry**, United States, v.39, n.27, p.7856-7862, Jul.2000.
- ALLISON, D.G. *et al.* P. Possible involvement of the division cycle in dispersal of *Escherichia coli* from biofilms. **J Bacteriol**, United States, v.172, n.3, p.667-669, Mar.1990.
- ANTIORTA, M.H.; DUNNY, G.M. *ccfA*, the genetic determinant for the cCF10 peptide pheromone in *Enterococcus faecalis* OG1RF. **J Bacteriol**, United States, v.184, n.4, p.1155-1162, Feb.2002.
- ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. 2009. **Trato Urinário** - Critérios Nacionais de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/67e70900492e138ab260b314d16287af/ITU%2Bfinal%2B02-02-10_setembro+2009.pdf?MOD=AJPERES Acesso em: 13 mai. 2013.
- ARIAS, C.A.; MURRAY, B.E. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. **Nat Rev Microbiol**, England, v.10, n.4, p.265-278, Mar.2012.
- ARTHUR, M.; REYNOLDS, P.; COURVALIN, P. Glycopeptide resistance in enterococci. **Trends Microbiol**, England, v.4, n.10, p.401-407, Oct.1996a.

- ARTHUR, M. *et al.* Mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. **J Infect**, England, v.32, n.1, p.11–16, Jan.1996b
- AYALA-CASTRO, C.; SAINI, A.; OUTTEN, F.W. Fe-S cluster assembly pathways in bacteria. **Microbiol Mol Biol Rev**, United States, v.72, n.1, p.110-125, Mar.2008.
- BAE, T.; KOZLOWICZ, B.K.; DUNNY, G.M. Characterization of cis-acting prgQ mutants: evidence for two distinct repression mechanisms by Qa RNA and PrgX protein in pheromone-inducible enterococcal plasmid pCF10. **Mol Microbiol**, England, v.51, n.1, p.271-281, Jan.2004.
- BEINERT, H. Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises. **J Biol Inorg Chem**, Germany, v.5, n.1, p.2-15, Feb.2000.
- BEINERT, H.; HOLM, R.H.; MUNCK, E. Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. **Science**, United States, n.277, n.5326, p.653–659, Aug.1997.
- BEINERT, H.; KILEY, P.J. Fe-S proteins in sensing and regulatory functions. **Curr Opin Chem Biol**, England, v.3, n.2, p.152-157, Apr.1999.
- BEN OMAR, N. *et al.* Functional and safety aspects of Enterococci isolated from different Spanish foods. **Syst Appl Microbiol**, Germany, v.27, n.1, p.118-130, Feb.2004.
- BENDER, E.A.; FREITAS, A.L.P.; BARTH, L.A. Avaliação do perfil de suscetibilidade antimicrobiana de Enterococcus spp. isolados em dois hospitais de Porto Alegre-RS, Brasil. **Rev Bras Anal Clin**, Brasil, v.42, n.1, p.15-19, Set.2010.
- BERTRAND, X. *et al.* Common PFGE patterns in antibiotic-resistant Enterococcus faecalis from humans and cheeses, **Food Microbiol**, Netherlands, v.17, p.543-551, Feb.2000.
- BONTEN, M.J.; WILLEMS, R.; WEINSTEIN, R.A. Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from? **Lancet Infect Dis**, United States, v.1, p.314-25, Dec.2001.
- BOURGOGNE, A. *et al.* Comparison of OG1RF and an isogenic fsrB deletion mutant by transcriptional analysis: the Fsr system of Enterococcus faecalis is more than the activator of gelatinase and serine protease. **J Bacteriol**, United States, v.188, n.8, p.2875–28784, Apr.2006.
- BOYD, A.; CHAKRABARTY, A.M. Role of alginate lyase in cell detachment of Pseudomonas aeruginosa. **Appl Environ Microbiol**, United States, v.60, n.7, p.2355-2359, Jul.1994

- BOYD, D.A. *et al.* Molecular Characterization of *Enterococcus faecalis* N06-0364 with Low-Level Vancomycin Resistance Harboring a Novel d-Ala-d-Ser Gene Cluster, vanL **Antimicrob Agents Chemother**, United States v.52, n.7, p.2667–2672, Jul.2008.
- BRADLEY, C.R.; FRAISE, A.P. Heat and chemical resistance of enterococci. **J Hosp Infect**, England, v.34, n.3, p.191-196, Nov.1996.
- BUSANI, L. *et al.* Antimicrobial susceptibility of vancomycin-susceptible and resistant enterococci isolated in Italy from raw meat products, farm animals, and human infections. **Int J Food Microbiol**, Netherlands, v.97, n.1,p.17-22, Dec.2004.
- CARLSSON, J. Bacterial metabolism in dental biofilms. **Adv Dent Res**, United States, v.11,n.1, p.75-80, Apr.1997.
- CARPENTIER, B.; CERF, O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. **J Appl Bacteriol**, England, v.75, n.6, p.499-511, Dec.1993.
- CASSENEGO, A.P.V. *et al.* Species Distribution and antimicrobial susceptibility of Enterococci isolated from broilers infected experimentally with *Eimeria* spp and fed with diets containing different supplements. **Braz J Microbiol**, Brazil, v.42, n.2, p.480-488, Apr.2011.
- CATTOIR, V.; LECLERCQ, R. Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: is it time to divorce? **J Antimicrob Chemother**, England, v.68, n.4, p.731-42, Apr.2013.
- CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Vancomycin-resistant Enterococci (VRE) in Healthcare Settings**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/HAI/organisms/vre/vre.html>>. Acesso em: 27 mai. 2013.
- CEREDA, R. *et al.* *Enterococcus faecalis* resistant to vancomycin and teicoplanin (Van A phenotype) isolated from a bone marrow transplanted patient in Brasil. **Braz J Infect Dis**, Brasil, v.5, n.1, p.40-46, Feb.2001.
- CETINKAYA, Y.; FALK, P.; MAYHALL, C.G. Vancomycin-resistant enterococci. **Clin Microbiol Rev**, United States, v.13, n.4, p.686-707, Oct.2000.
- CHANDLER, J.R.; HIRT, H.; DUNNY, G.M. A paracrine peptide sex pheromone also acts as an autocrine signal to induce plasmid transfer and virulence factor expression in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A**, United States, v.102, n.43, p.15617-15622, Oct.2005.
- CHEN, H.Y. *et al.* Vancomycin activates $\sigma(B)$ in vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* resulting in the enhancement of cytotoxicity. **PLoS One**, United States, v.6, n.9, e24472, Sep.2011.

- CHUANG, O.N. *et al.* Multiple functional domains of Enterococcus faecalis aggregation substance Asc10 contribute to endocarditis virulence. **Infect Immun**, United States, v.77, n.1, p.539–548, Jan.2009.
- CHUANG-SMITH, O.N. *et al.* Acceleration of Enterococcus faecalis Biofilm Formation by Aggregation Substance Expression in an Ex Vivo Model of Cardiac Valve Colonization. **PLoS One**, United States, v.5, n.12, e15798, Dec.2010.
- COSTERTON, J.W. Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection. **Trends Microbiol**, England, v.9, n.2, p.50–52, Feb.2001.
- COURVALIN, P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. **Clin Infect Dis**, United States, v.42, n.S25-34, p.25-34, Jan.2006.
- CRACK JC *et al.* Iron-sulfur cluster sensor-regulators. **Curr Opin Chem Biol**, England, v.16, n.1-2, p.35-44, Apr.2012
- CRETI, R. *et al.* Enterococcal colonization of the gastro-intestinal tract: role of biofilm and environmental oligosaccharides. **BMC Microbiol**, England, v.6, n.6, p.60, Jul.2006.
- d'AZEVEDO, P.A. *et al.* Primeiro caso de Enterococcus resistente à vancomicina isolado em Porto Alegre, RS. **J Bras Pat Med Lab**, Brasil, v.36,n.4, p.258, 2000.
- d'AZEVEDO, P.A. *et al.* Antimicrobial susceptibility among Enterococcus isolates from the city of Porto Alegre, RS, Brazil. **Braz J Microbiol**, Brasil, v.35, n.3, p.199-204, Jul.2004.
- d'AZEVEDO, P.A.; DIAS, C.A.G.; TEIXEIRA, L.M. Genetic diversity and antimicrobial resistance of enterococcal isolates from southern region of Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, Brasil, v.48, n.1, p.11-16, Mar.2006.
- d'AZEVEDO, P.A. *et al.* Molecular characterization of vancomycin-resistant Enterococci strains eight years apart from its first isolation in São Paulo, Brazil., Brazil. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, Brasil, v.50, n.4, p.195-198, Jul.2008.
- DAHLÉN, G. *et al.* Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. **Oral Microbiol Immunol**, v.15, n.5, p.309-312, Oct.2000.
- DAI S, SCHWENDTMAYER C, SCHÜRMAN P, RAMASWAMY S, EKLUND H. Redox signaling in chloroplasts: cleavage of disulfides by an iron-sulfur cluster. **Science**, United States, v.287, n.5453, p.655-658, Jan. 2000.
- DALLA COSTA, L.M. *et al.* Vancomycin-Resistant Enterococcus faecium: First case in Brazil. **Braz J Infect Dis**, Brazil, v.2, n.3, p.160-163, Jun.1998.

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

DEMPLE, B.; DING, H.; JORGENSEN, M. Escherichia coli SoxR protein: sensor/transducer of oxidative stress and nitric oxide. **Methods Enzymol**, United States, v.348, p.355-364, 2002.

DIETERICH C, *et al.* Gene expression analysis reveals new possible mechanisms of vancomycin-induced nephrotoxicity and identifies gene markers candidates. **Toxicol Sci**, United States, v.107, n.1, p.258-269, Jan.2009.

DUNNY, G.M.; LEONARD, B.A.; HEDBERG, P.J. Pheromone-inducible conjugation in Enterococcus faecalis: interbacterial and host-parasite chemical communication. **J Bacteriol**, United States, v.177, n.4, p.871-876, Feb.1995.

DUTKA-MALEN, S. *et al.* Sequence of the vanC gene of Enterococcus gallinarum BM4174 encoding a D-alanine:D-alanine ligase-related protein necessary for vancomycin resistance. **Gene**, Netherlands, v.112, n.1, p.53-58, Mar.1992.

DUTKA-MALEN, S., EVERS, S., COURVALIN, P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. **J Clin Microbiol**, United States, v.33, n.1, p.24-27 (Erratum, 33:1434), Jan.1995.

EATON, T.J.; GASSON, M.J. Molecular screening of Enterococcus virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. **Appl Environ Microbiol**, United States, v.67, n.4, p.1628-1635, Apr.2001.

EUZÉBY, J.P. **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature-Genus Enterococcus**. Disponível em:
<<http://www.bacterio.cict.fr/e/enterococcus.html>> Acesso em: 12 dez. 2013.

EZRATY B. *et al.* Fe-S cluster biosynthesis controls uptake of aminoglycosides in a ROS-less death pathway. **Science**, United States, v.340, n.6140, p.1583-1587, Jun.2013.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. **Microbiology**, England, v.155, n.6, p.1749-1757, Jun.2009.

FLAHAUT, S. *et al.* The oxidative stress response in Enterococcus faecalis: relationship between H₂O₂ tolerance and H₂O₂ stress proteins. **Lett Appl Microbiol**, England, v.26, n.4, p.259-64, Apr.1998.

FONTECAVE, M. *et al.* Mechanisms of iron-sulfur cluster assembly: the SUF machinery. **J Biol Inorg Chem**, Germany, v.10, n.7, p.713-721, Nov.2005 (Erratum v.11, n.1, p.128, Jan.2006).

- FONTCAVE, M.; OLLAGNIER-DE-CHOUDENS, S. Iron-sulfur cluster biosynthesis in bacteria: Mechanisms of cluster assembly and transfer. **Arch Biochem Biophys**, England, v.474, n.2, p.226-237, Jun.2008.
- FOSTER, T.J.; HÖÖK, M. Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. **Trends Microbiol**, England, v. 6, n.12, p.484–488, Dec.1998.
- FOULQUIÉ MORENO, M.R. *et al.* The role and application of enterococci in food and health. **Int J Food Microbiol**, Netherlands, v.106, n.1, p.1–24, Jan.2006.
- FRANZ, C.M; HOLZPFEL, W.H.; STILES, M.E. Enterococci at the crossroads of food safety? **Int J Food Microbiol**, Netherlands, v.47, n.1-2, p.1-24, Mar.1999.
- FRANZ, C. *et al.* Enterococci in foods - a conundrum for food safety. **Int J Food Microbiol**, Netherlands, v.88, n.2-3, p.105-122, Dec.2003.
- FRAZZON, A.P.G. *et al.* Prevalence of antimicrobial resistance and molecular characterization of tetracycline resistance mediated by tet(M) and tet(L) genes in *Enterococcus* spp. isolated from food in Southern Brazil. **World J Microbiol Biotechnol**, Brazil, v.26, n.2, p.365-370, Feb.2010.
- FRENCH, G.L. Enterococci and Vancomycin Resistance. **Clin Infect Dis**, United States, v.27, n.S1, p.75–83, Aug.1998.
- FURTADO, G.H. *et al.* Incidence of vancomycin-resistant *Enterococcus* at a university hospital in Brazil. **Rev Saude Publica**, Brazil, v.39, n.1, p.41-46, Feb.2005.
- GALES AC, SADER HS, RIBEIRO J, ZOCCOLI C, BARTH A, PIGNATARI AC. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated in Brazilian hospitals participating in the SENTRY Program (2005-2008). **Braz J Infect Dis**, Brasil, v.13, n.2, p.90-8, 2009.
- GALLI, D.; FRIESENEGGER, A.; WIRTH, R. Transcriptional control of sex-pheromone-inducible genes on plasmid pAD1 of *Enterococcus faecalis* and sequence analysis of a third structural gene for (pPD1-encoded) aggregation substance. **Mol Microbiol**, England, v.6, n.10, p.1297-2308, May.1992..
- GILBERT, P.; EVANS, D.J.; BROWN, M.R.W. Formation and dispersal of bacterial biofilms in vivo and in situ. **J Appl Bacteriol**, England, v.74, n.67S-78S, p.67-78, 1993.
- GILMORE, M.S. *et al.* Enterococcal virulence. *In*: Gilmore MS. (ed). **The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance**, 1.ed. Washington, DC: American Society For Microbiology, 2002; p.301-354.
- GILMORE M.S., LEBRETON F., VAN SCHAIK W. Genomic transition of Enterococci from gut commensals to leading causes of multidrug-resistant

hospital infection in the antibiotic era. **Curr Opin Microbiol**. v.16, n.1, p.10-16. Feb.2013

GIRAFFA, G. Enterococci from foods. **FEMS Microbiol Rev**, England, v.26, n.2, p.163-171, Jun.2002.

HANCOCK, L.E.; PEREGO, M. The Enterococcus faecalis fsr two-component system controls biofilm development through production of gelatinase. **J Bacteriol**, United States, v.186, n.17, p.5629-5639, Sep.2004.

HAYDEN, M.K. Insights into the epidemiology and control of infection with vancomycin-resistant enterococci. **Clin Infect Dis**, United States, v.31, p.1058–1065, Oct.2000.

HEDBERG, P.J. *et al.* Identification and characterization of the genes of Enterococcus faecalis plasmid pCF10 involved in replication and in negative control of pheromone-inducible conjugation. **Plasmid**, United States, v.35, n.1, p.46-57, Jan.1996.

HEW, C.M.; KORAKLI, M.; VOGEL, R.F. Expression of virulence-related genes by Enterococcus faecalis in response to different environments. **Syst Appl Microbiol**, Germany, v.30, n.4, p. 257-267, Jun.2007.

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**, United States, v.70, n.2, p.716-723, Feb.2002.

HOOTON, T.M.; STAMM, W.E. Diagnosis and treatment of uncomplicated urinary tract infection. **Infect Dis Clin North Am**, United States, v.11, n.3, p.551-581, Sep.1997.

HÖRNER, R. *et al.* Suscetibilidade antimicrobiana entre amostras de Enterococcus isoladas no Hospital Universitário de Santa Maria. **J Bras Patol Med Lab**, Brasil, v.41, n.6, p.391-395, Dez.2005.

HUFNAGEL, M. *et al.* A putative sugar-binding transcriptional regulator in a novel gene locus in Enterococcus faecalis contributes to production of biofilm and prolonged bacteremia in mice. **J Infect Dis**, United States, v.189, n.3, p.420-430, Feb.2004.

HUGHES, D. Exploiting genomics, genetics and chemistry to combat antibiotic resistance. **Nat Rev Genet**, England, v.4, n.6, p.432-441, Jun.2003.

IMLAY, J.A. Pathways of oxidative damage. **Annu Rev Microbiol**, United States, v.57, p.395-418, Oct.2003.

JACOBSON, M.R. *et al.* Biochemical and genetic analysis of the nifUSVWZM cluster from Azotobacter vinelandii. **Mol Gen Genet**, Germany, v.219, n.1-2, p.49-57, Oct.1989a.

JACOBSON, M.R. et al. Physical and genetic map of the major *nif* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. **J Bacteriol**, United States, v.171, n.2, p.1017-1027, Feb.1989b.

JETT, B.D.; HUYCKE, M.M.; GILMORE, M.S. Virulence of enterococci. **Clin Microbiol Rev**, United States, v.7, n.4, p.462-478, Oct.1994.

JOHNSON, D.C. *et al.* Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. **Annu Rev Biochem**, United States, v.74, p.247-281, Jul.2005.

JOYANES, P. *et al.* In vitro adherence of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* to urinary catheters. **Clin Microbiol Infect**, France, v.19, n.2, p.124-127, Feb.2000.

KAYAOGLU, G.; ORSTAVIK, D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. **Crit Rev Oral Biol Med**, United States, v.15, n.5, p.308-320, Sep.2004.

KAYSER, F.H. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. **Int J Food Microbiol**, Netherlands v.88, n.2-3, p.255-262, Dec.2003.

KESSLER, D. Enzymatic activation of sulfur for incorporation into biomolecules in prokaryotes. **FEMS Microbiol Rev**, England, v.30, n.6, p.825-840, Nov.2006.

KILEY, P.J.; BEINERT, H. The role of Fe-S proteins in sensing and regulation in bacteria. **Curr Opin Microbiol**, England, v.6, n.2, p.181-185, Apr.2003.

KLEIN, G. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. **Int J Food Microbiol**, Netherlands, v.88, n.2-3, p.123-131, Dec.2003.

KOCH, S. *et al.* Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. **Vaccine**, Netherlands, v.22, n.7, p.822-830, Feb.2004.

KOHANSKI, M.A. *et al.* Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic mediated cell death. **Cell**, United States, v.135, n.4, p.679-690, Nov.2008.

KOHANSKI, M.A.; DWYERN, D.J.; COLLINS, J.J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. **Nat Rev Microbiol**, England, v.8, n.6, p.423-435, Jun.2010.

KONEMAN, E.W. *et al.* **Diagnóstico microbiológico**. Texto e Atlas Colorido. 5.ed. Rio de Janeiro: Rio de Janeiro MEDSI, 2001. p.589-659.

KOZLOWICZ, B.K.; BAE, T.; DUNNY, G.M. *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive protein PrgX: genetic separation of positive autoregulatory functions from those involved in negative regulation of conjugative plasmid transfer. **Mol Microbiol**, England, v.54, n.2, p.520-532, Oct.2004.

- KUMAR, C.G.; ANAND, S.K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **Int J Food Microbiol**, Netherlands, v.42, n.1-2, p. 9-27, Jun.1998.
- LEBRETON, F. *et al.* ace, Which Encodes an Adhesin in Enterococcus faecalis, Is Regulated by Ers and Is Involved in Virulence. **Infect Immun**, United States, v. 77, n.7, p 2832-9, Jul.2009.
- LEBRETON, F. *et al.* d-Ala-d-Ser VanN-Type Transferable Vancomycin Resistance in Enterococcus faecium. **Antimicrob Agents Chemother**, United States, v.55, n.10, p.4606–4612, Oct.2011.
- LECLERCQ, R. *et al.* Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in Enterococcus faecium. **N Engl J Med**, England, v.319, n.3, p.157-161, Jul.1988.
- LEE, K.C.; YEO, W.S.; ROE, J.H. Oxidant-responsive induction of the suf operon, encoding a Fe-S assembly system, through Fur and IscR in Escherichia coli. **J Bacteriol**, United States, v.190, n.24, p.8244-8247, Dec.2008.
- LEME, I.L. *et al.* Glycopeptides susceptibility among enterococci isolated from a poultry farm in São Paulo, Brazil (1996/1997). **Braz J Microbiol**, Brazil, v.31, n.1, p. 53-55, Jan.2000.
- LEONARD, B.A. *et al.* Enterococcus faecalis pheromone binding protein, PrgZ, recruits a chromosomal oligopeptide permease system to import sex pheromone cCF10 for induction of conjugation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, United States, v.93, n.1, p.260-264, Jan.1996.
- LEWIS, K. Riddle of biofilm resistance. **Antimicrob Agents Chemother**, United States, v.45, n.4, p.999–1007, Apr.2001.
- MANNU, L. *et al.* Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between Enterococcus faecium strains of dairy, animal and clinical origin. **Int J Food Microbiol**, Netherlands, v.88, n.2-3, p.291-304, Dec.2003.
- MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Lista dos aditivos proibidos na alimentação animal**. 2008. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/aditivos-proibidos>
Acesso em: 23 mai. 2013.
- MILLER, M.B.; BASSLER, B.L. Quorum sensing in bacteria. **Annu Rev Microbiol**, United States, v.55, p.165–199, Oct.2001
- MOHAMED J.A.; HUANG, D.B. Biofilm formation by enterococci. **J Med Microbiol**, England, v.56, n.Pt12, p.1581-1588, Dec.2007.
- MOHAMED, J.A.; MURRAY, B.E. Influence of the fsr locus on biofilm formation by Enterococcus faecalis lacking gelE. **J Med Microbiol**, England, v.55, n.Pt 2, p.1747-1750 Dec.2006.

MURRAY, B.E. The life and times of the Enterococcus. **Clinical Microbiol Rev**, United States, v.3, n.1, p.46-65, Jan.1990.

NACHIN, L. *et al.* SufC: an unorthodox cytoplasmic ABC/ATPase required for [Fe-S] biogenesis under oxidative stress. **EMBO**, England, v.22, n.3, p.427-437, Feb.2003.

NAKAYAMA, J. *et al.* Revised model for Enterococcus faecalis fsr quorum-sensing system: the small open reading frame fsrD encodes the gelatinase biosynthesis-activating pheromone propeptide corresponding to staphylococcal agr. **J Bacteriol**, United States, v.188, n.23, p.8321-8326, Dec.2006.

NALLAPAREDDY, S.R. *et al.* Diversity of ace, a gene encoding a microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules, from different strains of Enterococcus faecalis and evidence for production of ace during human infections. **Infect Immun**, United States, v.68, n.9, p.5210-5217, Sep.2000a.

NALLAPAREDDY, S.R. *et al.* Enterococcus faecalis adhesin, ace, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. **Infect Immun**, United States, v.68, n.9, p.5218-5224, Sep.2000b

NALLAPAREDDY, S.R.; MURRAY, B.E. Ligand-signaled of Enterococcus faecalis ace transcription, a mechanism for modulating host-E. faecalis interaction. **Infect Immun**, United States, v.74, n.9, p.4982-4989, Sep.2006.

NAVARRO, F.; COURVALIN, P. Analysis of genes encoding D-alanine-D-alanine ligase-related enzymes in Enterococcus casseliflavus and Enterococcus flavescens. **Antimicrob Agents Chemother**, United States, v.38, n.8, p.1788-1793, Aug.1994.

NNIS SYSTEM. National Nosocomial Infections Surveillance. System report, data summary from January 1990-May 1999, issued June 1999. **Am J Infect Control**, United States, v.27, n.6, p.520-532, Dec.1999.

NOVAIS, C. *et al.* High occurrence and persistence of antibiotic-resistant enterococci in poultry food samples in Portugal. **J Antimicrob Chemother**, England, v.56, n.6, p.1139-1143, Dec.2005.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H.B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annu Rev Microbiol**, United States, v.54, p.49-79, Oct. 2000.

OGIER, J.C.; SERROR, P. Safety assessment of dairy microorganisms: the Enterococcus genus. **Int J Food Microbiol**, Netherlands, v.126, n.3, p.291-301, Sep.2008.

OLMSTED, S.B. *et al.* Role of the pheromone-inducible surface protein Asc10 in mating aggregate formation and conjugal transfer of the Enterococcus

faecalis plasmid pcf10. **J Bacteriol**, United States, v.173, n.23, p.7665–7672, Dec.1991.

OUTTEN, F.W.; DJAMAN, O.; STORZ, G. A suf operon requirement for Fe-S cluster assembly during iron starvation in Escherichia coli. **Mol Microbiol**, England, v.52, n.3, p.861-872, May.2004.

PAGANELLI, F.L.; WILLEMS, R.J.; LEAVIS, H.L. Infections: attacking the biofilm? **Trends Microbiol**, England, v.20, n.1, p.40-49, Jan.2012.

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

PALMER, J.; FLINT, S.; BROOKS, J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. **J Ind Microbiol Biotechnol**, England, v.34, n.9, p.577-588, Sep.2007.

PARK, I.S.; LIN, C.H.; WALSH, C.T. Bacterial resistance to vancomycin: Overproduction, purification, and characterization of VanC2 from Enterococcus casseliflavus as a D-Ala-D-Ser ligase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, United States v.94, n.19, p.10040-10044, Sep.1997.

PARTANEN K. Uso de aditivos na produção de suínos. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS E TECNOLOGIA NA PRODUÇÃO DE RAÇÕES. Campinas. **Anais Colégio Brasileiro de Nutrição Animal**, 2002. p.45-62.

PATTERSON, J.E. *et al.* An analysis of 110 serious enterococcal infections: epidemiology, antibiotic susceptibility and outcome. **Medicine**, United States, v.74, n.4, p.191-200, Jul.1995.

PEREIRA, G.H. *et al.* Outbreak of vancomycin-resistant enterococci in a tertiary hospital: the lack of effect of measures directed mainly by surveillance cultures and differences in response between Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis. **Am J Infect Control**, United States, v.38, n.5, p.406-409, Jun.2010.

POETA, P.; ANTUNES, T.; RODRIGUES, J. Enterococcus spp. resistentes à vancomicina isolados de fezes de frangos, pombos, gamos e ratos. **Arq Bras Med Vet Zootec**, Brasil, v.57, n.3, p.412-414, Jun.2005.

PONNURAJ, K. *et al.* Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of Ace: a Collagen-binding MSCRAMM from Enterococcus faecalis. **Biochim Biophys Acta**, Netherlands, v.1596, n.2, p.173-176, Apr.2002.

PRATT, L.A.; KOLTER, R. Genetic analysis of Escherichia coli biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. **Mol Microbiol**, England, v.30, n.2, p.285-293, Oct.1998.

PY, B.; BARRAS, F. Building Fe-S proteins: bacterial strategies. **Nat Rev Microbiol**, England, v.8, n.6, p.436-446, Jun.2010.

QIN, X. *et al.* Characterization of *fsr*, a regulator controlling expression of gelatinase and serine protease in *Enterococcus faecalis* OG1RF. **J Bacteriol**, United States, v.183, n.11, p.3372–3382, Jun.2001.

RAMOTAR, K.*et al.* Comparison of phenotypic methods to identify enterococci intrinsically resistant to vancomycin (VanC VRE). **Diagn Microbiol Infect Dis**, United States, v.36, n.2, p.119–124, Feb.2000.

REIS, A.O. *et al.* In vitro antimicrobial activity of linezolid tested against vancomycin-resistant enterococci isolated in Brazilian hospitals, **Braz. J Infect Dis**, Brazil, v.5, n.5, p.243-251, Feb.2001.

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

RIBAS, R.M. *et al.* Vancomycin-resistant *van A* phenotype *Enterococcus faecalis*: first case in Minas Gerais state and epidemiological considerations. **Braz J Infect Dis**, Brazil, v.11, n.4, p.439-440, Aug.2007.

RIBOLDI, G.P. **Caracterização da Maquinaria SUF responsável pela formação e associação dos cofatores [Fe-S] em *Enterococcus faecalis***. 2009. 181p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

RIBOLDI, G.P. *et al.* Antimicrobial resistance profile of *Enterococcus* spp. isolated from food in Southern Brazil. **Braz J Microbiol**, Brazil, v.40, n.1, p.125-128, Jan.2009a.

RIBOLDI, G.P.; VERLI, H.; FRAZZON, J. Structural studies of the *Enterococcus faecalis* SufU [Fe-S] cluster protein. **BMC Biochem**, England, v.10, n.3, p.1-10, Feb.2009b.

RICHARDS, M.J.*et al.* Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. **Infect Control Hosp Epidemiol**, United States, v.21, n.8, p.510–515, Aug.2000.

ROCHE, B. *et al.* Iron/sulfur proteins biogenesis in prokaryotes: formation, regulation and diversity. **Biochim Biophys Acta**, Netherlands, v.1827, n.3, p.455-469, Mar.2013.

SCHLEIFER, K.H.; KILPPER-BÄLZ, R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* nom. ver. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. Nov. **Int J Syst Evol Microbiol**, England, v.34, n.1, p.31-34, Jan.1984.

SCHWARTZ CJ, *et al.* IscR, an Fe-S cluster-containing transcription factor, represses expression of Escherichia coli genes encoding Fe-S cluster assembly proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A**, United States, v.98, n.26, p.14895-14900, Dec.2001.

SENO, Y. *et al.* Clinical implications of biofilm formation by Enterococcus faecalis in the urinary tract. **Acta Med Okayama**, Japan, v.59, n.3, p.79-87, Jun.2005.

SHEPARD, B.D.; GILMORE, M.S. Differential Expression of Virulence-Related Genes in Enterococcus faecalis in Response to Biological Cues in Serum and Urine. **Infect Immun**, United States, v.70, n.8, p.4344–4352, Aug.2002.

SHERMAN, J.M.; MAUER, J.C.; STARK, P. Streptococcus fecalis. **J Bacteriol**, United States, v.33, n.3, p. 275–282. Mar.1937

SIEVERT, D.M. *et al.* 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**, United States, v.34, n.1, p.1-14, Jan.2013.

SIFRI, C.D. Healthcare epidemiology: quorum sensing: bacteria talk sense. **Clin Infect Dis**, United States, v.47, n.8, p.1070–1076, Oct.2008.

SILLANPÄÄ, J. *et al.* A family of putative MSCRAMMs from Enterococcus faecalis. **Microbiology**, England, v.150, n.Pt7, p.2069–2078, Jul.2004.

SINGH, K.V. *et al.* Importance of the collagen adhesin Ace in pathogenesis and protection against Enterococcus faecalis experimental endocarditis. **PLoS Pathogens**, United States, v.6, n1, p1-13, Jan.2010.

SINGH, R.; PAUL, D.; JAIN, R. Biofilms: implications in bioremediation. **Trends Microbiol**, England, v.14, n.9, p.389-397, Sep.2006.

STAMM, W.E.; NORRBY, S.R. Urinary tract infections: disease panorama and challenges. **J Infect Dis**, United States; v.183,n.S1-4, p.S1-4, Mar.2001.

STOBBERINGH, E. *et al.* Enterococci with glycopeptide resistance in turkeys, turkey farmers, turkey slaughterers, and (sub)urban residents in the south of The Netherlands: evidence for transmission of vancomycin resistance from animals to humans? **Antimicrob Agents Chemother**, United States, v.43, n.9, p.2215-2221, Sep.1999.

STOODLEY, P. *et al.* Biofilms as complex differentiated communities. **Annu Rev Microbiol**, United States, v.56, p.187-209, Jan.2002.

SYDNOR, E.R.; PERL, T.M. Hospital epidemiology and infection control in acute-care settings. **Clin Microbiol Rev**, United States, v.24,n.1, p.141-173, Jan.2011.

- TAKAHASHI, Y.; TOKUMOTO, U. A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids. **J. Biol. Inorg. Chem**, United States, v.277, n.32, p.28380-28383, Aug.2002.
- TAVARES, W. Problems with Gram-positive bacteria: resistance in staphylococci, enterococci, and pneumococci to antimicrobial drugs. *Rev Soc Bras Med Trop*, Brasil, v.33, n.3, p.281-301, May.2000.
- TEIXEIRA, L. M.; FACKLAM, R. R. Enterococcus. *In*: MURRAY, P.R. *et al.* (eds.) **Manual of Clinical Microbiology**. 8.ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 2003, p.422-433.
- TENDOLKAR, P.M. *et al.* Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. **Cell Mol Life Sci**, Switzerland, v.60, n.1, p.2622-2636, Dec.2003.
- TITZE-DE-ALMEIDA, R. *et al.* Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of Enterococci recovered from Brazilian intensive care units. **Braz J Infect Dis**, Brasil, v.8, n.3, p.197-205, Jun.2004.
- THOMAS, V.C. **The molecular control and biological implications of autolysis in enterococcus faecalis biofilm development**. 2009. 165p. Dissertation (Doctor of Philosophy) – Division of Biology, College of Arts and Sciences, Kansas State University, Kansas, 2009.
- TOKARS, J.I. *et al.* The prevalence of colonization with vancomycin-resistant Enterococcus at a Veterans' Affairs institution. **Infect Control Hosp Epidemiol**, United States, v.20, n.3, p.171-175, Mar.1999.
- UTTLEY, A.H. *et al.* Vancomycin-resistant enterococci. **Lancet**, England, v.1, n.8575-6, p.57-58, Jan.1988.
- VEBØ, H.C. *et al.* Comparative Genomic Analysis of Pathogenic and Probiotic Enterococcus faecalis Isolates, and Their Transcriptional Responses to Growth in Human Urine. **Plos One**, United States, v.5, n.5, p.1-14, Aug.2010.
- 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**, Brasil, v.101, n.7, p.715-719, Nov.2006.
- WÄCHTERSHÄUSER, G. On the chemistry and evolution of the pioneer organism. **Chem Biodivers**, Switzerland, v.4, n.4, p.584-602, Apr 2007.
- WATERS C.M.; DUNNY, G.M. Analysis of Functional Domains of the Enterococcus faecalis Pheromone-Induced Surface Protein Aggregation Substance. **J Bacteriol**, United States, v.183, n.19, p.5659-5667, Oct.2001.
- WATERS, C.M. *et al.* An amino-terminal domain of Enterococcus faecalis aggregation substance is required for aggregation, bacterial internalization by epithelial cells and binding to lipoteichoic acid. **Mol Microbiol**, England, v.52, n.4, p.1159-1171, May.2004.

WISPLINGHOFF, H. *et al.* Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clin Infect Dis**, United States, v.39, n.3, p.309–317, Jul.2004.

XU, X. *et al.* vanM, a New Glycopeptide Resistance Gene Cluster Found in *Enterococcus faecium*. **Antimicrob Agents Chemoter**, United States v.54, n.11, p.4643-4647, Nov.2010.

YEO *et al.* IscR acts as an activator in response to oxidative stress for the suf operon encoding Fe-S assembly proteins. **Mol Microbiol**, England, v.61, n.1, p.206-218, Jul.2006.

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**, United States, v.5, n.2, p.159-162, 1999.

ZANELLA, R.C. *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of vanA *Enterococcus* isolated during the first nosocomial outbreak in Brazil. **Microb Drug Resist**, United States, v.9, n.3, p.283-29, 2003.

ZHENG, L. *et al.* Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an iscSUA-hscBA-fdx gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. **J Biol Chem**, United States, v.273, n.21, p.13264-13272, May.1998.