

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

**DETECÇÃO DE CRISPRs EM *ENTEROCOCCUS FAECALIS* E  
*ENTEROCOCCUS FAECIUM* E BACTERIÓFAGOS  $\Phi$ FL2AB,  $\Phi$ FL3AB E  $\Phi$ FL4A  
DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* ISOLADOS A PARTIR DE AMOSTRAS  
ALIMENTARES, ANIMAIS E CLÍNICAS.**

CRISTOPHER GERARDO YERENA HUESCAS

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Guedes Frazzon

Porto Alegre

Março/2017

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

**DETECÇÃO DE CRISPRs EM *ENTEROCOCCUS FAECALIS* E  
*ENTEROCOCCUS FAECIUM* E BACTERÍÓFAGOS  $\Phi$ PHI2AB,  $\Phi$ PHI3AB E  
 $\Phi$ PHI4A DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* ISOLADOS A PARTIR DE  
AMOSTRAS ALIMENTARES, ANIMAIS E CLÍNICAS.**

Cristopher Gerardo Yerena Huescas

Biólogo

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa  
de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do  
Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande  
do Sul, como parte dos requisitos necessários à  
obtenção do título de Mestre em Microbiologia  
Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Microbiologia Ambiental

Orientador: Profa. Dra. Ana Paula Guedes Frazzon

Porto Alegre. Rio Grande do Sul, Brasil.

Março/2017

### CIP - Catalogação na Publicação

Yerena, Cristopher Gerardo  
DETECÇÃO DE CRISPRs EM ENTEROCOCCUS FAECALIS E  
ENTEROCOCCUS FAECIUM E BACTERIÓFAGOS PHIFL2AB,  
PHIFL3AB E PHIFL4A DE ENTEROCOCCUS FAECALIS ISOLADOS  
A PARTIR DE AMOSTRAS ALIMENTARES, ANIMAIS E  
CLÍNICAS. / Cristopher Gerardo Yerena Yerena. --  
2017.  
88 f.

Orientador: Ana Paula Guedes.

Dissertação (Mestrado) -- 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, 2017.

1. CRISPRs. 2. Enterococcus faecalis. 3.  
Enterococcus faecium. 4. bacteriófagos. I. Guedes,  
Ana Paula , orient. II. Título.

*Dedico este trabalho aos meus pais Gerardo Yerena e Josefina Guadalupe  
Huesca*

*Com carinho*

*“Há biologia em tudo, mesmo quando você está se sentindo espiritual.”*

*Helen Fisher*

## **AGRADECIMENTOS**

A minha Família e amigos que me apoiaram com amor e carinho durante os dois anos que morei no Brasil, especialmente em Porto Alegre.

À Profa. Dra. Ana Paula Guedes Frazzon por ter me aberto a porta para realizar meu projeto profissional e pessoal no Brasil. Sou grato pela dedicação e esforço colocado em meu aprimoramento acadêmico e emocional. Pelo tempo e carinho oferecido desde minha chegada à Universidade.

Agradeço sinceramente a meus colegas de laboratório 222-C por me ter compartilhado o tempo deles, orientações, experiências, amizade e confiança durante o período no Brasil.

Aos colegas e amigos do PPGMAA

À equipe de professores do PPGMAA pelos ensinamentos e experiências

À equipe administrativa da Secretaria do PPGMAA pela confiança e realização tanto de maneira profissional como pessoal. Assim como, com a ajuda econômica e laboral.

**DETECÇÃO DE CRISPRs EM *ENTEROCOCCUS FAECALIS* E *ENTEROCOCCUS FAECIUM* E BACTERÍOFAGOS  $\Phi$ PHI2AB,  $\Phi$ PHI3AB E  $\Phi$ PHI4A DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* ISOLADOS A PARTIR DE AMOSTRAS ALIMENTARES, ANIMAIS E CLÍNICAS.**

Autor: Cristopher Gerardo Yerena Huescas

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Guedes Frazzon

## **Resumo**

**Introdução.** As Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas (CRISPRs) são DNAs que consistem de repetições de nucleotídeos. Existem 3 tipos: CRISPR1-CAS, CRISPR3-CAS e CRISPR2. Os bacteriófagos são partículas virais que infectam bactérias. Os bacteriófagos SAP6, IME-EF1, BC-611, VD-13 e F4 são encontrados em *E. faecalis* assim como  $\Phi$ FL1ABC,  $\phi$ FL2AB,  $\phi$ FL3AB e  $\phi$ FL4A. **Objetivo.** Identificar e caracterizar as classes de CRISPRs e bacteriófagos de *E. faecalis* e *E. faecium* isoaldos de amostras alimentares, clínicas e fezes de animais. **Materiais e métodos.** Foram usadas DNA de 153 isolados, sendo 98 de *E. faecalis* e 55 de *E. faecium*. A técnica de detecção foi a PCR utilizando iniciadores para os genes *CRISPR1-Cas*, *CRISPR2*, *CRISPR3-cas* e bacteriófagos, seguido por electroforese em gel de agarose. **Resultados.** Para *E. faecalis* foram detectadas 58 isolados que amplificaram para o gene *CRISPR1-Cas*; 87 para *CRISPR2* e 13 para *CRISPR3-Cas*. Para *E. faecium* foram detectadas 4 isolados positivos para o gene *CRISPR1-Cas*; 18 para *CRISPR2* e 1 para *CRISPR3-CAS*. O bacteriófago  $\phi$ FL2AB foi detectado em 13 isolados de *E. faecalis*; o bacteriófago  $\phi$ FL3AB em 13 isolados de *E. faecalis* e o  $\phi$ FL4A em 28 isolados de *E. faecalis*. **Conclusão.** Neste estudo nos encontramos diferentes proporções e distribuições dos genes *CRISPRs* em *E. faecalis* e *E. faecium*. O bacteriófago  $\phi$ FL4A apresentou-se como o mais frequente entre os bacteriófagos avaliados.

Palavras-chave: CRISPRs, *Enterococcus. faecalis*, *Enterococcus. faecium*, Bacteriófagos

<sup>1</sup> Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (88 p.) Março, 2017.

**DETECTION OF CRISPR IN *ENTEROCOCCUS FAECALIS* AND *ENTEROCOCCUS FAECIUM*  
AND BACTERIOPHAGES  $\Phi$ PHI2,  $\Phi$ PHI3 AND  $\Phi$ PHI4 *ENTEROCOCCUS FAECALIS* ISOLATED  
FROM FOOD, ANIMALS AND CLINICALSAMPLES.**

Autor: Cristopher Gerardo Yerena Huescas

Advisor: Profa. Dra. Ana Paula Guedes Frazzon

**Abstract**

**Introduction.** The CRISPR are small portions of DNA consisting of nucleotide repeats. There are three types of CRISPRs recognized: CRISPR-associated genes *cas*: CRISPR1-CAS and CRISPR3-CAS and a orphan locus lacking *cas* genes: CRISPR2. Bacteriophages are viral particles that infect bacterial. The bacteriophages SAP6, IME-EF1, BC-611 and F4 are found in *E. faecalis* as well as  $\Phi$ FL1ABC,  $\phi$ FL2AB,  $\phi$ FL3AB,  $\phi$ FL4A. **Objective:** To Identify and to characterize CRISPRs genes and bacteriophage genes in *E. faecalis* and *E. faecium* isolated from food, clinical and animal fecal samples.

**Materials and methods.** A total of 153 DNA samples were used, 98 from *E. faecalis* and 55 from *E. faecium*. The PCR technique using *primers* was used to detect the genes *CRISPR1-Cas*, *CRISPR2*, *CRISPR3-cas* and bacteriophages, followed the agarose gel electrophoresis. **Results.** To *E. faecalis* was detected 58 isolates that amplified the *CRISPR1-Cas* genes, 87 to *CRISPR2* and 13 to *CRISPR3-Cas*. To *E. faecium* was detected 4 isolates positive to *CRISPR1-Cas* gene, 18 to *CRISPR2* e 1 to *CRISPR3-CAS*. The  $\phi$ FL2AB bacteriophage was detected in 13 isolates of *E. faecalis*; the  $\phi$ FL3AB bacteriophage in 13 isolates of *E. faecalis* and the  $\phi$ FL4A in 28 isolates of *E. faecalis*. **Conclusion.** In this work, we found out different proportions and distributions of *CRISPRs* genes in *E. faecalis* e *E. faecium*. The  $\phi$ FL4A bacteriophage showed a high frequency among the bacteriophages tested.

Keywords: CRISPRs, *E. faecalis*, *E. faecium*, Bacteriophages

<sup>1</sup>Master of Science Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.(88 p.) March, 2017.



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Isolados de enterococos provenientes de diferentes tipos de amostras.	42
Tabela 2. <i>Primers</i> utilizados na reação de PCR e tamanho esperado de pares de bases (pb) do fragmento gerado.	43
Tabela 3. <i>Primers</i> utilizados nas reações de PCR e tamanho esperado de pares de bases (pb) dos fragmentos gerados.	44
Tabela 4. <i>Primers</i> utilizados nas reações de PCR e tamanho esperado de pares de bases (pb) dos fragmentos gerados.	45
Tabela 5. <i>Primers</i> utilizados nas reações de PCR e tamanho esperado de pares de bases (pb) dos fragmentos gerados.	47
Tabela 6 <i>Primers</i> utilizados para as reações de PCR e tamanho esperado de pares de bases esperados para detectar os bacteriófagos $\Phi$ FL1ABC, $\Phi$ FL2AB, $\Phi$ FL3AB E $\Phi$ FL4.	48
Tabela 7. Resultados da presença dos genes <i>CRISPR1-Cas</i> , <i>CRISPR2</i> e <i>CRISPR3-Cas</i> de <i>Enterococcus faecalis</i> isolados de diferentes tipos de amostras.	52
Tabela 8. Resultados da presença dos genes <i>CRISPR1-Cas</i> , <i>CRISPR2</i> e <i>CRISPR3-Cas</i> de <i>Enterococcus faecium</i> isolados de diferentes tipos de amostras.	53
Tabela 9. Resultados da presença dos genes <i>gp26</i> , <i>gp48</i> , <i>gp35</i> para os bacteriófagos $\Phi$ FL2AB, $\Phi$ FL3AB e $\Phi$ FL4A de <i>Enterococcus faecalis</i> isolados de diferentes tipos de amostras.	58

Tabela 10. Relação entre número (porcentagens totais) sobre a presença ou ausência de CRISPRs e bacteriófagos em <i>E. faecalis</i> isolados de amostras de alimentos.	59
Tabela 11. Relação entre número (porcentagens totais) sobre a presença ou ausência de CRISPRs e bacteriófagos em <i>E. faecalis</i> isolados de amostras de clínicos.	61
Tabela 12. Relação entre número (porcentagens totais) sobre a presença ou ausência de CRISPRs e bacteriófagos em <i>E. faecalis</i> isolados de amostras de cloaca de frango	64
Tabela 13. Relação entre número (porcentagens totais) sobre a presença ou ausência de CRISPRs e bacteriófagos em <i>E. faecalis</i> isolados de amostras de fezes de leão marinho.	65

## LISTA DE FIGURAS

Figura. 1. Estrutura típica do locus CRISPR.	30
Figura. 2. Mecanismo de CRISPRs-cas	34
Figura. 3. Arquitetura do locus CRISPR em <i>E. faecalis</i> .	34
Figura. 4. Representação do locus CRISPR3-cas em <i>E. faecalis</i> T11.	35
Figura. 5. Fotografia de bacteriófago obtida por microscopia eletrônica de coloração negativa (Microbiology and Immunology On-line).	36
Figura. 6. Representação das fases de replicação para bacteriófagos. Ciclo Lítico e Ciclo Lisogênico.	37
Figura 7. Eletroforese em gel de agarose a 1 % dos produtos de amplificação do gene <i>CRISPR1-Cas</i> de <i>Enterococcus faecalis</i> .	51
Figura. 8. Eletroforese em gel de agarose a 1 % dos produtos de amplificação do gene <i>CRISPR2</i> de <i>Enterococcus faecalis</i> .	54
Figura. 9. Eletroforese em gel de agarose a 1,5 % dos produtos de amplificação do gene <i>CRISPR3-Cas</i> de <i>Enterococcus faecalis</i>	55
Figura. 10. Eletroforese em gel de agarose a 1,5 % dos produtos de amplificação do gene <i>CRISPR3-Cas</i> de <i>Enterococcus faecium</i> .	55
Figura. 11 Eletroforese em gel de agarose a 1,6 % dos produtos de amplificação dos genes em bacteriófagos. Linha 1: Ladder 100 pb; Linha 2: gene <i>gp26</i> , <i>gp48</i> , <i>gp35</i> ; Linha 3: Controles negativos.	57

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1: Características morfológicas e moleculares dos bacteriófagos de *Enterococcus faecalis* identificados por sequenciamento. Fonte: Adaptação de Yasmin *et al.*, 2010. 39
- Quadro 2: Estudo comparativo de genomas dos bacteriófagos de *E. faecalis* utilizando Fasta3. Fonte adaptação de Yasmin *et al.*, 2010 40
- Quadro 3: Relação dos *E. faecalis* isolados de amostras de alimentos mostrando a presença (verde) ou ausência (branco) de CRISPRs, presença (roxo) ou ausência (branco) de Bacteriófagos e susceptibilidade (branco) e resistência (vermelho) aos antimicrobianos Ampicilina (Amp.), Cloranfenicol (Clo), Gentamicina (Genta) e Tetraciclina (Tetra). Presença de resistência intermediária (amarelo). 59
- Quadro 4: Relação dos *E. faecalis* isolados de amostras clínicas mostrando a presença (verde) ou ausência (branco) de CRISPRs, presença (roxo) ou ausência (branco) de bacteriófagos e susceptibilidade (branco) e resistência (vermelho) aos antimicrobianos Ampicilina (Amp.), Cloranfenicol (Clo), Gentamicina (Genta) e Tetraciclina (Tetra). Presença de resistência intermediária (amarelo) 60
- Quadro 5: Relação dos *E. faecalis* isolados de amostras de fezes de tartaruga mostrando a presença (verde) ou ausência (branco) de CRISPRs, presença (roxo) ou ausência (branco) de bacteriófagos e susceptibilidade (branco) e resistência (vermelho) aos antimicrobianos Ampicilina (Amp.), Cloranfenicol (Clo), Gentamicina (Genta) e Tetraciclina (Tetra). 61
- Quadro 6: Relação dos *E. faecalis* isolados de amostras de fezes de pinguins mostrando a presença (verde) ou ausência (branco) de CRISPRs, presença (roxo) ou ausência (branco) de bacteriófagos e susceptibilidade (branco) e resistência (vermelho) aos antimicrobianos Ampicilina (Amp.), Cloranfenicol (Clo), Gentamicina (Genta) e Tetraciclina (Tetra). 62

Quadro 7: Relação dos *E. faecalis* isolados de amostras de cloacas de frango mostrando a presença (verde) ou ausência (branco) de CRISPRs, presença (roxo) ou ausência (branco) de bacteriófagos e susceptibilidade (branco) e resistência (vermelho) aos antimicrobianos Ampicilina (Amp.), Cloranfenicol (Clo), Gentamicina (Genta) e Tetraciclina (Tetra). Presença de resistência intermediária (amarelo).

63

Quadro 8: Relação dos *E. faecalis* isolados de amostras de fezes de leão marinho mostrando a presença (verde) ou ausência (branco) de CRISPRs, presença (roxo) ou ausência (branco) de bacteriófagos e susceptibilidade (branco) e resistência (vermelho) aos antimicrobianos Ampicilina (Amp.), Cloranfenicol (Clo), Gentamicina (Genta) e Tetraciclina (Tetra).

64

Quadro 9: Relação dos *E. faecalis* isolados de amostras de alimentos mostrando a presença (verde) ou ausência (branco) de CRISPRs, presença (azul) ou ausência (branco) de genes de resistência *tetM*, *tetL*, *ermB* e presença (amarelo) ou ausência (branco) de genes de virulência *gelE*, *esp*, *agg* e *ace*.

66

Quadro 10: Relação dos *E. faecalis* isolados de amostras clínicas mostrando a presença (verde) ou ausência (branco) de CRISPRs, presença (azul) ou ausência (branco) de genes de resistência *tetM*, *tetL*, *ermB* e presença (amarelo) ou ausência (branco) de genes de virulência *gelE*, *esp*, *agg* e *ace*.

67

Quadro 11: Relação dos *E. faecalis* isolados de amostras de alimentos mostrando a presença (roxo) ou ausência (branco) de bacteriófago, presença (azul) ou ausência (branco) de genes de resistência *tetM*, *tetL*, *ermB* e presença (amarelo) ou ausência (branco) de genes de virulência *gelE*, *esp*, *agg* e *ace*.

68

Quadro 12: Relação dos *E. faecalis* isolados de amostras clínicas mostrando a presença (roxo) ou ausência (branco) de bacteriófago, presença (azul) ou ausência (branco) de genes de resistência *tetM*, *tetL*, *ermB* e presença (amarelo) ou ausência (branco) de genes de virulência *gelE*, *esp*, *agg* e *ace*.

69

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	por cento
µL	microLitro
BHI	caldo infusão cérebro coração
CRISPR	Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas
CrRNA	moléculas pequenas de RNA –CRISPR
CrRNP	Complexos Ribonucleoproteicos
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
°C	Graus Celcius
°F	Graus Fahrenheit
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
h.	hora
HGT	transferência gênica horizontal
ICBS	Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Kb.	Kilo bases
M.	Molar
ME	Microscopia Eletrônica
Min.	minuto
mL.	miliLitro
mM.	miliMolar
NAOH	Hidróxido de Sódio
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica
PAM	Motivo adjacente ao protoespaçador
Pb	pares de bases
PPGMAA	Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PH	Potencial hidrogeniônico
RNA	Ácido Ribonucleico
R-M	Sistema de modificadores de restrição
RPM	Rotação por minuto
SDS	Dodecyl sulfato de sódio
SgRNA	simple guia RNA

TracrRNA	molécula transativadora crRNA
TBE	Tampão Tris/Borato/EDTA
TE	Tampão tris-EDTA
<i>tuf</i>	gene do fator de alongação Tu
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UFCSPA	Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
Uv.	Ultravioleta

## Sumário

<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE QUADROS.....</b>	<b>11</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....</b>	<b>13</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
2.1 Objetivos Gerais.....	19
2.2 Objetivos Específicos.....	19
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>20</b>
3.1 O Gênero <i>Enterococcus</i> .....	20
3.2 <i>Enterococcus faecalis</i> .....	22
3.2.1 <i>Enterococcus faecalis</i> V583.....	23
3.2.2 <i>Enterococcus faecalis</i> OG1RF.....	23
3.3 <i>Enterococcus faecium</i> .....	24
3.4 Resistência a antibióticos em enterococos .....	25
3.5 Fatores de virulência em enterococos. ....	25
3.6 Repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas (CRISPRs) .....	26
3.6.1 Cronologia da descoberta dos CRISPRs em bactérias.....	27
3.6.2 Estrutura e características dos Sistemas CRISPRs.....	29
3.6.2.1 Sequências de Repetições.....	30
3.6.2.2 Sequências Espaçadoras .....	30



3.6.2.3 Sequência Líder .....	30
3.6.2.4 Proteínas Cas.....	31
3.6.2.4.1 Enzima Cas9.....	32
3.6.3 Mecanismos de interferência .....	32
3.6.4 CRISPR em <i>Enterococcus faecalis</i> .....	34
3.7 Bacteriófagos .....	35
3.8. Bacteriófagos de <i>E. faecalis</i> .....	37
3.8.1. Bacteriófago SAP6.....	38
3.8.2 Bacteriófago IME-EF1 .....	38
3.8.3 Bacteriófago BC-611 .....	38
3.8.4 Bacteriófago F4.....	38
3.8.5 Bacteriófagos $\phi$ FL1ABC, $\phi$ FL2AB, $\phi$ FL3AB, $\phi$ FL4A.....	38
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>41</b>
4.1 Isolados de <i>Enterococcus</i> .....	41
4.2 Extrações do DNA Bacteriano.....	42
4.3 Confirmação do gênero <i>Enterococcus</i> .....	43
4.4 Confirmação das espécies <i>E. faecalis</i> e <i>E. faecium</i> .....	44
4.5 Detecção dos genes <i>CRISPRs</i> de enterococos.....	45
4.6 Sequenciamento dos fragmentos dos genes <i>CRISPRs</i> .....	46
4.7 Detecções dos genes dos bacteriófagos de enterococos .....	46
4.7.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção dos genes dos bacteriófagos SAP6, IME-EF1, F4, VD13 e BC-611. ....	46
4.7.2 Reação em cadeia da polimerase para detecção dos genes dos bacteriófagos $\Phi$ FL1ABC, $\Phi$ FL2AB, $\Phi$ FL3AB e $\Phi$ FL4A.....	48
4.7.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção do bacteriófagos $\Phi$ FL1ABC.....	48

4.7.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR) duplex para detecção dos genes dos bacteriófagos $\Phi$ FL2AB e $\Phi$ FL3AB .....	49
4.7.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção do bacteriófago $\Phi$ FL4A.....	49
4.8 Sequenciamento dos fragmentos de bacteriófago .....	50
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
5.1 Confirmação do gênero e espécies de <i>Enterococcus</i> .....	51
5.2 Detecção dos genes <i>CRISPR1-Cas</i> , <i>CRISPR2</i> e <i>CRISPR3-Cas</i> .....	51
5.3 Detecção dos genes dos bacteriófagos .....	56
5.3.1 Detecção dos genes de bacteriófagos SAP6, IME-EF1, VD13, F4 e BC-611.....	56
5.3.2 Detecção dos bacteriófagos $\Phi$ FL1ABC $\Phi$ FL2AB, $\Phi$ FL3AB e $\Phi$ FL4A....	56
5.4. Relação entre os genes <i>CRISPRs</i> , bacteriófagos e fenótipo.....	58
5.5. Relação <i>CRISPRs</i> e genes de resistência e virulência.....	66
5.5. Relação bacteriófagos e genes de resistência e virulência.....	68
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>70</b>
6.1. Detecção dos genes <i>CRISPR1-Cas</i> , <i>CRISPR2</i> e <i>CRISPR3-Cas</i> em <i>E.faecalis</i> e <i>E.faecium</i> isolados de amostras de animais, clínicos e alimentares. ....	70
6,2 Detecção dos genes dos bacteriófagos em <i>E.faecalis</i> isolados de amostras de animais, clínicos e alimentares. ....	71
6.3 Relação presença dos genes <i>CRISPRs</i> , $\Phi$ FL2AB, $\Phi$ FL3AB e $\Phi$ FL4A com genótipo e fenótipo de resistência dos isolados de <i>Enterococcus faecalis</i> provenientes de amostras de animais, clínicos e alimentares. ....	73
6.3.1 Relação <i>CRISPRs</i> , bacteriófagos e fenótipo.....	73
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>7. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>76</b>
<b>8. REFERENCIAS.....</b>	<b>77</b>

## 9 APÊNDICE..... 88

### 9.1 Estruturas 3D da Proteína cas9 para *E. faecalis* e *E. faecium*..... 88

## 1. INTRODUÇÃO

As Repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente inter espaçadas do inglês *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPRs) foram descobertas nos anos 80s em bactérias. Em seguida foram descritas em Archaeobacteria nos 90s. A distribuição e caracterização destas moléculas levou a ideia de que estas realizavam funções fisiológicas, morfológicas e evolutivas (Mojica *et al.*, 2000). As estruturas e as sequências das repetições possuíam diferenças com outros sistemas conhecidos da época. A primeira evidência documentada foi estudada em Haloarchaeobacteria, nas quais por estudos nos transcritos das repetições foi possível a identificação dos loci CRISPRs tipo selvagem (Mojica *et al.*, 1993). Esta descoberta ajudou a entender como os sistemas CRISPRs têm sido modificados ao longo do tempo.

As possíveis funções dos sistemas de defesa bacterianos em diferentes ecossistemas tem sido uma área de investigação por distintos pesquisadores. Em 2005, os sistemas CRISPRs foram relacionados com o processo de resistência adquirida contra vírus. Em 2007, graças às ferramentas de biologia molecular e bioinformática, realizou-se uma ligação entre o sistema CRISPRs e imunidade contra bacteriófagos, vírus de Archaeobacteria, plasmídeos e elementos extra-cromossômicos. Atualmente, existe interesse em conhecer modelos estruturais e funcionais deste sistema CRISPRs em diferentes ambientes que poderiam explicar mecanismos de defesa em procariotos e troca de elementos genômicos que aumentem adaptações a diversos ecossistemas.

Estudos da presença e função dos CRISPRs têm sido realizados em bactérias ácido-lácticas. Devido à complexidade e carência de informação sob a presença destes bacteriófagos em conjunto com os CRISPRs para *Enterococcus spp.* em diferentes ambientes, surge a necessidade de investigar em isolados de

*Enterococcus spp.* de diferentes origens a relação da presença de CRISPRs, bacteriófagos e ambiente.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos Gerais

O presente trabalho teve como objetivos gerais:

Identificar a presença dos genes *CRISPRs* em *E. faecalis* e *E. faecium* isolados a partir de amostras clínicas, alimentares e de fezes de animais;

Detectar a presença de bacteriófagos em *E. faecalis* a partir de amostras clínicas, alimentares e de animais.

### 2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Selecionar a partir de uma bacterioteca *E. faecalis* e *E. faecium* resistentes e susceptíveis aos antimicrobianos isolados clínicos, alimentares e de animais;

2.2.2 Confirmar a identificação dos isolados por PCR empregando *Primers* espécies-específicas para *E. faecalis* e *E. faecium*;

2.2.3 Detectar nos isolados a presença do gene *csn1* (CRISPR1-cas), gene *órfão* (CRISPR2) e gene *csn1* (CRISPR3-cas);

2.2.4- Avaliar a presença dos bacteriófagos SAP6, IME-EF1, F4, VD13 e BC-611 em *E. faecalis*;

2.2.5 Determinar a presença de genes dos bacteriófagos  $\Phi$ FL#ABC de *E. faecalis* por PCR simple e duplex;

2.2.6 Comparar as características genotípicas, como genes de resistência e virulência, e características fenotípicas, como resistência e susceptibilidade aos antimicrobianos, com a presença ou ausência dos genes *CRISPRs* e de bacteriófagos.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 O Gênero *Enterococcus*

O nome *Enterococcus* foi utilizado para descrever os diplococos gram positivos isolados de intestino em 1899 (Thiercelin, 1899). No ano de 1906, Andrewes propôs o nome de *Streptococcus faecalis* (Andrewes & Horder, 1906). Em 1919, Orla-Jansen descreveu uma nova espécie chamada *Streptococcus faecium* (Deibel, 1964). Ao longo do tempo, foram-se desenvolvendo novas classificações taxonômicas e métodos moleculares. Para 1970, Kalina baseando-se em características morfológicas, biológicas e sorológicas, estabeleceu o gênero *Enterococcus* reconhecido até hoje. Os representantes do gênero caracterizam-se por serem cocos, que geralmente se dispõem em pares e cadeias curtas. São anaeróbios facultativos e apresentam temperatura ótima de crescimento de 35°C, embora a maioria deles capazes de tolerar variações de temperatura (10 – 45°C) e pH (4,5 – 10,0), assim como toleram condições hipotônicas e hipertônicas (Sherman, 1938). Não formadores de esporo e são catalase negativo (Tyne & Gilmore, 2014). Estudos realizados reconhecem mais de 40 espécies (Gilmore *et al*, 2013).

Para a identificação em nível de gênero existem método em biologia molecular. Entre os mais utilizados encontra-se a reação em cadeia da polimerase (PCR) ou identificação bioquímica por microplaca (Morrison *et al*, 1997). A técnica molecular tem a capacidade de obter resultados de maneira rápida, barata e de fácil interpretação (Woodford *et al*, 1997). O gene *tuf*, o qual codifica para o fator de alongação EF-tu, é amplificado de maneira versátil para identificar o gênero (Ke *et al*, 1999). Por outro lado, existem comercialmente meios de culturas seletivos e diferenciais cromogênicos como Spectra VRE (Jenkins *et al*, 2011), o qual permite a detecção de enterococos isolados de fezes.

Devido à sua capacidade de crescer e sobreviver em condições tão adversas, *Enterococcus* sp. encontram-se amplamente dispersos na natureza, podendo ser encontrados na água, solo, alimentos, plantas e animais. O habitat

deste gênero encontra-se distribuído em diferentes ecossistemas: trato gastrointestinal humano e outras cavidades corporais, outros mamíferos, aves, répteis, insetos, plantas, solo e água (Deibel, 1964). Metabolicamente, o crescimento auxotrófico sugere que este gênero desenvolveu co-evolução com outros organismos devido a que existe uso de nutrientes do hospedeiro (Gilmore *et al.*, 2013). Em seres humanos podem ser encontrados na microbiota do trato intestinal e geniturinário. Entre as espécies de *Enterococcus* mais frequentemente detectados no intestino de mamíferos, destacam-se os *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus hirae* e *Enterococcus durans* (Devriese & De Pelsmaecker, 1987). As espécies *E. faecalis* e *E. faecium* são também as mais frequentemente encontradas em produtos: alimentares como leite, queijos e carnes fermentadas. São espécies formadoras de biofilme (Suzzi, *et al.*, 2000). Em 2009, Riboldi e colaboradores estudaram a presença de enterococos no Sul do Brasil isolados de diferentes produtos alimentares como mandioca, beterraba, batata, batata doce, salsinha, repolho, carne, leite e queijos. Entre os resultados as bactérias *E. faecalis* e *E. faecium* foram as mais frequentes.

Algumas espécies de *Enterococcus* podem ser encontradas em animais como cachorros, ratos, macacos, aves, frangos, pombos, gado, peixes, porco, lobos marinhos, tartarugas e pinguins. Entre os grupos de espécies detectadas encontram-se *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. gallinarum* e *E. cecorum* (Byappanahalli *et al.*, 2012). Em 2017, Medeiros e colaboradores realizaram um estudo para avaliar a presença de enterococos em fezes de animais marinhos selvagens. Entre os resultados, *E. faecalis* e *E. mundtii* foram frequentes em mamíferos aquáticos. Em tartarugas, trinta-réis-róseo, maçarico-de-papo-vermelho, e o albatroz-de-sobrancelha a espécie *E. faecalis* foi a mais frequente. Em ambientes como solo, água, plantas e esgoto tem se encontrado diversos grupos de *Enterococcus*. Entre os representativos encontram-se *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. gallinarum* e algumas outras espécies como *E. saccharolyticus*, *E. aquimarinus*, *E. sulphureus* e *E. camelliae* (Byappanahalli *et al.*, 2012).

Em 2013, Garbinato e colaboradores fizeram um estudo da presença de enterococos em amostras de águas provenientes do Rio Dilúvio no Sul do Brasil. Entre os resultados, encontraram-se com maior frequência as bactérias *E. faecium* seguidas de *E. faecalis*, *E. casseliflavus*, *E. hirae* e *E. gallinarum*. Uma das grandes preocupações com bactérias pertencentes ao gênero *Enterococcus* e que algumas espécies podem apresentar mecanismos de resistência a várias classes de agentes antimicrobianos. Entre os quais, resistência a estreptomicina, gentamicina e glicopeptídeos tem sido estudada (Correa, 2011)

Estudos dos genomas do gênero *Enterococcus* sugerem a existência do fenômeno de polilissogenia (Duerkop *et al.*, 2014) no qual profagos conferem adaptações ou fatores de virulência à bactéria, o qual promove mudanças evolutivas significativas para a população bacteriana (Matos *et al.* 2013). Também sugerem a existência de um sistema imunológico adquirido procariótico conhecido como sistema CRISPR-cas. Este sistema apresenta a característica de proteção contra a introdução de DNA exógeno proveniente de bacteriófagos ou plasmídeos, o qual poderia explicar o incremento do tamanho do genoma dos *Enterococcus* (Palmer & Gilmore, 2010).

### 3.2 *Enterococcus faecalis*

A espécie *E. faecalis* habita normalmente no trato gastrointestinal de humanos e animais. Esta bactéria, de interesse clínico para o microbioma humano (Quin *et al.*, 2010) , apresenta diferentes estratégias de sobrevivência. Encontrase em diferentes ambientes com alimentos, água, solo, animais e plantas, mas também se associa com infecções. Acredita-se que esta espécie se encontra relacionada com infecções adquiridas de maneira intra-hospitalar, como urinárias, intra-abdominais, endocardites e bacteremia (Arias & Murray, 2002).

A importância das infecções associadas à saúde tem relevância (Sievert *et al.*, 2013). As linhagens têm revelado a presença de complexos clonais de alto risco (CC) de cepas invasoras e colonizadoras multiresistentes associadas a hospitais (Freitas *et al.*, 2009; Kuch *et al.*, 2012). Os enterococos que apresentam alto risco para saúde humana estes pertencem aos isolados CC2, os quais têm se adaptado ao ambiente hospitalar e relacionado com doenças

invasivas (Nallapareddy *et al.*, 2005). A cepa *faecalis* V583 forma parte do complexo CC2 e foi o primeiro isolado resistente a glicopeptídicos encontrado nos Estados Unidos (Sahm *et al.*, 1989). Finalmente, os isolados CC2 apresentam genes de profagos, o que leva a ideia da existência de elementos genéticos móveis (Solheim *et al.*, 2011).

Esta bactéria apresenta propensão marcável para adquirir genes de resistência para antibióticos via transferência gênica horizontal (HGT). Atualmente, os considerados elementos genéticos móveis, como os plasmídeos conjugativos ou móveis e transposões têm sido encontrados em isolados clínicos de *E. faecalis*. Estes elementos estão relacionados com resistência a glicopeptídeos, aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol, ampicilinas, linezolid e outros (Leclercq *et al.*, 1988; Murray *et al.*, 1988; Arthur *et al.*, 1993; Palmer & Gilmore, 2010; Llu *et al.*, 2013). (Clewell *et al.*, 2014)

### 3.2.1 *Enterococcus faecalis* V583

*Enterococcus faecalis* V583 foi a primeira cepa a ser completamente sequenciada (Paulsen *et al.*, 2010). No seu genoma foram identificados elementos móveis que constituem 25% do genoma, entre os quais se encontram plasmídeos, profagos, transposões e ilhas de patogenicidade (PAI) (Shankar *et al.*, 2002; Paulsen *et al.*, 2010). O sequenciamento de *E. faecalis* V583 abriu a probabilidade de examinar a diversidade genômica e identificar características específicas para a virulência (Vebo *et al.*, 2010; Palmer *et al.*, 2012; Solheim *et al.*, 2011;).

### 3.2.2 *Enterococcus faecalis* OG1RF

Esta bactéria foi isolada da cavidade oral humana. A cepa carece de elementos móveis e DNA exógeno e nela foram localizados os CRISPRs (Bourgogne *et al.*, 2008). Para esta cepa foram descobertos dois loci CRISPR, sendo que somente um deles possui genes *cas* associados (CRISPR1-*cas*) e outro CRISPR (Bourgogne *et al.*, 2008).



### 3.3 *Enterococcus faecium*

Estas bactérias metabolicamente produzem ácido a partir de ribose, galactose e outros açúcares. O piruvato, citrato, malato e serina não são utilizados como fonte de energia. O tipo de peptidoglicano encontrado é Lys-D-Asp (Kandler *et al*, 1968; Schleifer & Kandler, 1967; Klipper-Baelz *et al*, 1982). O conteúdo G+C do DNA apresenta entre 37 a 40 % (Schleifer & Klipper-Baelz, 1984). Historicamente, *E. faecalis* tem sido reconhecido como agente causal de infecções por enterococos em hospitais, mas na década de 80 foram diagnosticadas infecções nosocomiais por *E. faecium*. Este fato coincide com a aquisição de múltiplos mecanismos de resistência a antibióticos, por exemplo, ampicilinas e glicopeptídeos (van Schaik *et al.*, 2010).

Estudos sugerem que as cepas patogênicas de *E. faecium* pertencem à linhagem de complexos clonais de alto risco 17, CC17 (Willems *et al.*, 2005; Leavis *et al.*, 2006). No ano de 2007, Levis *et al.*, encontraram 100 genes em cepas da linhagem *E. faecalis* CC17. Estes genes pertencem às chamadas sequências de inserção, também foram detectados genes relacionados à virulência. Van Schaik *et al.*, no ano de 2010, realizaram uma caracterização de cepas de *E. faecium*, onde foram encontradas sequências tipo fago associadas a cepas não virulentas, sendo também possível identificar sequências tipo CRISPR sem o gene *cas1*.

O primeiro genoma completo de *E. faecium* foi publicado em 2012 com o nome de cepa Aus0004. Esta cepa apresentava resistência a vancomicina (Lam *et al.*, 2012). A partir desse momento foram sequenciadas outras cepas de *E. faecium*, o que tornou possíveis estudos de biologia molecular comparativa, assim como explicar a origem da transferência gênica entre bactérias.

Segundo o estudo de Palmer & Gilmore de 2010, a hipótese da presença ou carência de CRISPR-cas para *E. faecium* poderia ser a explicação da aquisição de genes que codificam genes de resistência a antibióticos. Por outro lado, Van Schaik *et al.* em 2010 estabeleceram que algumas cepas comensais como E1039 e E980 que careciam de sistema CRISPR, não necessariamente acumulam genes de resistência. Através do sequenciamento completo do genoma

tem se mostrado que a existência de plasmídeos, prófagos e ilhas de patogenicidade são fatores que conduzem a diversidade genômica de *E. faecium* (Palmer *et al.*, 2014)

### 3.4 Resistência a antibióticos em enterococos

Em 2011, os enterococos começaram ser considerados como agentes patogênicos emergentes relacionados com a elevada resistência a antibióticos (Semedo-Lemsaddek e Mato). Os tipos de resistência podem ser divididos em dois: intrínseca e adquirida. A intrínseca esta relacionada com a presença dos genes localizados no cromossomo, Esses genes são utilizados para indicar uma característica presente em todos ou na maioria das linhagens da espécie, o que confere uma vantagem cumulativa para aquisição de mais genes codificadores de altos níveis de resistência. Por outro lado, a resistência adquirida é determinada por elementos móveis como plasmídeos e transposões, resultantes de uma mutação no DNA existente ou pela aquisição de novos fragmentos de DNA, o que costuma ocorrer por conjugação, transformação ou transdução. Estas transferências genéticas ocorrem naturalmente, mesmo antes da exposição de bactérias aos antibióticos na terapêutica, e são frequentemente observadas nos tratos gastrointestinais de seres humanos e animais, situações em que se encontram com outras bactérias sobre pressão seletiva (Murray, 1988).

Resistência intrínseca a antimicrobianos em enterococos incluem: resistência a cefalosporinas, sulfonamidas e baixos níveis a  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos e clindamicina. Exemplos de resistência adquirida incluem a resistência a cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina, fluoroquinolonas, glicopeptídeos e altos níveis a clindamicina, aminoglicosídeos e  $\beta$ -lactâmicos (Fisher & Phillips, 2009).

### 3.5 Fatores de virulência em enterococos

O processo de patogenicidade em enterococos é atribuída à presença ou expressão de fatores de virulência como os genes *agg*, *esp*, *gelE*, *cylA*, *epa* e *ace*. Existe também a presença de enzimas ou toxinas que teriam importância em danificar as células de mamíferos (Correia, 2011). Existem diversos estudos que

relacionam a presença destes fatores em amostras clínicas e ambientais (Palmer & Gilmore, 2010; Katyal *et al.*, 2013)

### 3.6 Repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas (CRISPRs)

As Repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas do inglês *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat* (CRISPR), são regiões genéticas hipervariáveis amplamente distribuídas em bactéria e Archaea (Jansen *et al.*, 2002). Estas regiões apresentam sequências de DNA curtas, repetidas, altamente conservadas e parcialmente palindrômica, chamadas de **repetições**. Estas sequências de DNA CRISPRs estão intercaladas por sequências de DNA variáveis e curtas, chamadas de **espaçadoras**, muitas vezes adjacentes a genes *cas*, de proteínas CRISPR-associados (Haft *et al.*, 2005; Makarova *et al.*, 2006a; Sorek *et al.*, 2008).

Embora aparentemente inócuas, as sequências CRISPR são um componente crucial do sistema imune das bactérias. Se uma infecção viral ameaça uma célula bacteriana, o sistema CRISPR pode impedir o ataque, destruindo o genoma do vírus invasor. Assim, ao destruir o genoma viral, o sistema CRISPR protege as bactérias da infecção viral em curso. As sequências espaçadoras acreditam-se que sejam regiões homólogas as sequências genômicas de fago, e que a presença destas moléculas conferem uma imunidade bacteriana contra bacteriófagos. Esta similaridade de sequências de espaçadoras e sequências de profago levantaram a hipótese de que os CRISPRs poderiam promover a resistência contra elementos genéticos exógenos (Mojica *et al.*, 2005; Bolotin *et al.*, 2005; Makarova *et al.*, 2006; Horvath *et al.*, 2008).

A ausência do sistema CRISPRs-Cas em *E. faecalis* poderia explicar o porque de certas cepas terem se adaptado ao ambiente hospitalar. Devido a extensão do genoma destas, que é maior em 25% quando em comparação com outras bactérias comensais (Palmer *et al.*, 2012). Um estudo realizado no Canadá em 2013 demonstrou o surgimento de resistência a ampicilina em *E. faecium* associada à falta de sequências CRISPRs (Tremblay *et al.*, 2013).

O processo de defesa mediado por CRISPR-Cas pode ser dividido em três etapas: O primeiro estágio é denominado de adaptação, neste o DNA de um vírus invasor é processado em segmentos curtos que são inseridos na sequência de CRISPR como novos espaçadores. Na segunda fase, expressão e produção do crRNA, o sistema se prepara para a ação expressando os genes *cas* e transcrevendo o CRISPR em um RNA de CRISPR precursor longo (pré-crRNA). O pré-crRNA é subsequentemente transformado em crRNA maduro por proteínas Cas e fatores acessórios. Na terceira e última fase, a interferência, o ácido nucleico alvo é reconhecido e eliminado pela ação combinada das proteínas Cas. Como as sequências de crRNA são copiadas das sequências de DNA virais adquiridas durante a adaptação, elas são correspondências exatas do genoma viral e, assim, servem como excelentes guias.

### 3.6.1 Cronologia da descoberta dos CRISPRs em bactérias.

O primeiro trabalho descrevendo a existência dos CRISPRs foi descrito em 1987 por Ishino e colaboradores da Universidade de Osaka no Japão. Nesse estudo os pesquisadores clonaram e sequenciaram o gene *iap* (responsável pela conversão de isoenzima de fosfatase alcalina em *Escherichia coli*). Eles encontraram *downstream* ao gene *iap* cinco segmentos de DNA compostos de sequências repetidas de 29 nucleotídeos (repetições). Estas sequências eram separadas uma das outras por blocos de sequências de 32 nucleotídeos não relacionadas e não repetitivos (espaçadoras) (Ishino *et al.*, 1987; Nakata *et al.*, 1989). Após este primeiro relato de um *locus* CRISPR, descrições semelhantes derivadas de genes ou de genomas foram encontrados em bactérias e archaea. A partir de sequências de DNAs obtidas pelos diversos projetos de sequenciamento de genes e genomas bacterianos, iniciou-se uma ampla pesquisa com genômica computacional de CRISPRs. O primeiro estudo foi realizado em 2000 por Mojica e colaboradores, os quais encontraram frequências de 40% de CRISPRs no genoma das bactérias e 90% no genoma de Archaea. Em 2002, Jansen e colaboradores identificaram quatro genes associados aos CRISPRs, estes foram denominados de *cas* do inglês *CRISPR-associated genes*. As proteínas Cas são

preditas ou identificadas para interagir com ácidos nucleicos, por exemplo, nucleases, helicases e recombinases.

Em 2005, vários grupos analisaram as sequências espaçadoras em vários loci CRISPR e revelaram que as regiões espaçadoras comumente apresentavam DNA proveniente de elementos genéticos móveis, tais como bacteriófagos e plasmídeos, levando à conclusão de que poderiam ser um sistema contra infecções por agentes extras cromossômicos (Mojica *et al* 2005.; Pourcel *et al.* 2005; Bolotin *et al.*, 2005).

Em 2007, Barrangou e colaboradores confirmaram a hipótese experimentalmente com *Streptococcus thermophilus* que os loci CRISPR representam uma via de imunidade adaptativa contra infecção fágica.

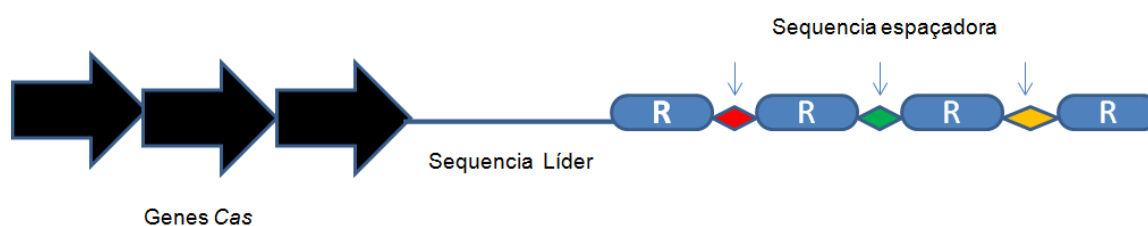
Em 2008, Horvath e colaboradores realizaram estudos sobre CRISPRs em bactérias ácido lácticas. Como resultado da pesquisa, foram identificadas 104 sequências espaçadoras, destas 27 sequências apresentaram 100 % de identidade com profagos, 49 com bacteriófago, 5 com plasmídeos e 23 mostraram identidade com elementos cromossômicos. Foram encontrados 37 genes associados *cas*. Para *E. faecalis*, foi reconhecido o CRISPR2, como carente de genes *cas*. Para *E. faecium* foi detectado o plasmídeo Pht beta (Barrangou *et al.*, 2007; Deveau *et al.*, 2008). Finalmente, o estudo filogenético revelou que as bactérias adquirem genes de forma seletiva dependendo do habitat (Makarova *et al.*, 2006b; Makarova & Koonin, 2007), o que contribuem na distribuição e evolução dos sistemas CRISPRs.

Em 2010, Palmer & Gilmore, realizaram um estudo visando correlacionar a presença de CRISPRs e o surgimento da resistência a antibióticos em diferentes cepas de *Enterococcus*. Para isso, foram utilizadas sequências de cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* isoladas de diferentes anos. Os pesquisadores mostraram que a resistência a múltiplos fármacos e a incidência de CRISPR-Cas estão negativamente correlacionada em *E. faecalis* e *E. faecium*. Os resultados obtidos por bioinformática identificaram três CRISPRs de Tipo II, onde foram identificadas 16 cepas de *E. faecalis* com regiões homólogas para CRISPRs da cepa *E. faecalis* V583 que apresentavam genes *cas* associados, chamando-as

CRISPR1-Cas. Também foi identificada a região homóloga sem a presença de genes *cas*, conhecida como CRISPR2. Finalmente, para as cepas *E. faecalis* Fly1 e T11, foi descrita a existência de um terceiro elemento homólogo com diferente conformação, à CRISPR1 e CRISPR2 com diferentes genes *cas* em comparação com CRISPR1. Esse nomeado CRISPR3-Cas. Por conclusão, entre os principais elementos genéticos móveis encontrados nas sequências espaçadoras, destacaram-se os plasmídeos com resposta a feromônios, os quais ajudam na plasticidade genômica e conferem a capacidade de transferir determinantes de resistência a antibióticos e virulência. Em 2015, Lyons e colaboradores, publicaram um estudo da incidência da presença do gene CRISPR1-*cas1* no gênero *Enterococcus* utilizando 275 isolados ambientais e animais. Como resultado, encontrou-se o gene em 110 cepas da espécie *E. faecalis*.

### 3.6.2 Estrutura e características dos sistemas CRISPRs

Os agrupamentos CRISPRs juntamente com as proteínas Cas compõem o denominado sistema CRISPR. As sequências repetidas frequentemente divergem entre as espécies (Jansen *et al.*, 2002; Godde *et al.*, 2006) e também são observados diferentes genes *cas* (Makarova *et al.*, 2006). A estrutura molecular típica dos sistemas CRISPRs é composta de: sequências de repetição, sequências espaçadoras, sequência líder e genes *cas*. As sequências repetidas podem variar entre 24 a 47 pares de bases de nucleotídeos (pb) e as espaçadoras entre 26 a 72 pb (Grissa *et al.*, 2007). O número de sequências espaçadoras varia dependendo o organismo, assim como, a quantidade de genes *cas* varia também (Figura. 1).



**Figura 1.** Estrutura típica do locus CRISPR. Genes *cas* (caixas pretas), sequência líder (Azul), sequências espaçadoras (diamantes vermelho, verde e amarelo) e repetições (caixas azuis e brancas). Fonte: Adaptação de Sorek *et al.*, 2008.

### 3.6.2.1 Sequências de Repetições

As sequências de repetições são quase sempre idênticas, no que diz respeito ao número e sequência de nucleotídeos (Jansen *et al.*, 2002). Apesar da divergência entre as espécies, as repetições podem ser agrupadas por similaridades de seqüências em pelo menos doze grupos principais (Kunin *et al.*, 2007). Algumas repetições tem sequências de DNA conservada (GAAA) na porção 3', sugerindo que este ponto poderia agir como o local de ligação de uma ou mais proteínas Cas. As sequências palíndromicas foram identificadas como elementos provenientes de uma estrutura secundária de RNA (Kunin *et al.*, 2007).

### 3.6.2.2 Sequências Espaçadoras

São sequências de DNA provenientes do DNA de vírus que infetaram a bactéria hospedeira anteriormente. Assim como os espaçadores, atuam como uma “memória genética” de infecções anteriores. Vários estudos com as sequências CRISPRs mostram que alguns espaçadores possuem similaridade com sequências de fagos e outros elementos extra-cromossômicos (Pourcel *et al.*, 2005; Makarova *et al.*, 2006; Lillestol *et al.*, 2006; Barrangou *et al.*, 2007). Em 2005, Mojica e colaboradores estudaram 4500 espaçadores de 67 cepas, e demonstraram a presença de sequências idênticas a fagos e plasmídeos. Em *Streptococcus thermophilus* foi observado que 40% de sequências dos espaçadores tinham homologia com fagos ou plasmídeos (Bolotin *et al.*, 2005). As sequências espaçadoras podem se ativar ou desativar, também podem acumular polimorfismos ao longo do tempo (Barrangou & Marraffini, 2014; Shariat & Dudley, 2014)

### 3.6.2.3 Sequência Líder

A sequência líder, é uma sequência de DNA com aproximadamente de 500 pb, localiza-se na posição 5' do loci CRISPR, próxima à primeira sequência de

repetição (Jansen *et al.*, 2002; Lillestol *et al.*, 2006). Esta sequência consenso contém em sua maioria de bases nitrogenadas adeninas e timinas (Jansen *et al.* 2002). A sequência líder funciona como alvo de reconhecimento para agregar novas sequências espaçadoras (Pourcel *et al.*, 2005; Barrangou *et al.*, 2007).

#### 3.6.2.4 Proteínas Cas

As proteínas Cas são um grupo altamente diversificado. Muitas são preditas ou identificadas para interagir com ácidos nucleicos; como por exemplo recombinases (ligadas ao processo de aquisição), ribonucleases (formação do crRNA) e nucleases (degradação de DNA ou RNA alvo) (van der Oost *et al.*, 2014). As proteínas Cas1 e Cas2 estão envolvidas na adaptação e são praticamente universais para os sistemas CRISPR-Cas (Makarova *et al.*, 2006). Outras proteínas Cas estão associadas apenas a certos tipos de sistemas CRISPR-Cas. A diversidade de proteínas Cas, a presença de múltiplos loci CRISPR e a frequente transferência horizontal dos sistemas CRISPR-Cas tornam a classificação uma tarefa complexa. A classificação mais comumente adotada identifica os sistemas CRISPR-Cas Tipo I, II e III, cada um com vários subgrupos. Diferentes tipos de sistemas CRISPR-Cas podem coexistir em um único organismo

Em 2011, Makarova e colaboradores, propuseram um novo sistema de classificação para os sistemas CRISPRs, onde os sistemas tipo I são definidos pela presença da proteína de assinatura Cas3. Essa proteína apresenta domínios de helicase e Dnase, responsáveis pela degradação do alvo. Além de *cas1*, *cas2* e *cas3*, todos os sistemas de tipo I codificam um complexo tipo-cascata, que liga crRNA e localiza o alvo, e a maioria das variantes também são responsáveis pelo processamento do crRNA. Seis subtipos do sistema de Tipo I que apresentam um número variável de genes *cas* foram identificados (Tipo I-A a Tipo I-F).

Os sistemas CRISPR-Cas tipo II codificam as proteínas Cas1, Cas2, a proteína de assinatura Cas9 e, algumas vezes, uma quarta proteína (Csn2 ou Cas4). Cas9 auxilia na adaptação, participa no processamento de crRNA e cliva o DNA alvo assistido por crRNA e um RNA adicional denominado tracrRNA. Os sistemas de tipo II foram divididos em subtipos II-A, II-B e II-C. Os genes *csn2* e



*cas4*, ambos codificando proteínas envolvidas na adaptação, estão presentes no subtipo II-A e II-B, respectivamente, enquanto o Tipo II-C carece do quarto gene (Makarova *et al.*, 2011).

Os sistemas CRISPR-Cas tipo III contêm a proteína de assinatura chamada Cas10 com função pouco clara. A maioria das proteínas Cas 10 é destinada aos complexos Csm (em Tipo III-A) ou Cmr (em Tipo III-B), que são semelhantes a Cas. Curiosamente, embora todos os sistemas de Tipo I e II sejam conhecidos por serem alvo de DNA, os sistemas de Tipo III tem como alvos DNA e/ou RNA. Os sistemas de Tipo II foram encontrados exclusivamente em bactérias enquanto os sistemas Tipo I e Tipo III ocorrem tanto em bactérias como em Archaea.

Recentemente, foi proposto um sistema Tipo IV, que contém vários genes *cas*, mas não CRISPR, *cas1* ou *cas2*. O sistema tipo IV seria guiado pela interação proteína-DNA, não pelo crRNA, e constitui um sistema imune inato predefinido para atacar certas sequências.

#### 3.6.2.4.1 Enzima Cas9

Para realizar a função, o sistema CRISPR tipo II, presente em enterococos, necessita do RNA guia (sgRNA), a enzima Cas 9 (endonuclease) e as sequências motivo adjacente ao protoespaçador (PAM) (5'-NGG-3') presentes no DNA alvo (Gasiunas *et al.*, 2012; Jinek *et al.*, 2012). Esta enzima é utilizada para edição genômica em células de procaríotos e eucariotos (Sternberg & Doudna, 2015). (Apêndice 9.1). A estrutura da proteína conserva uma arquitetura que consiste em dois domínios: o domínio de reconhecimento, responsável pela ligação do sgRNA (união do crRNA e tracrRNA) na enzima e o domínio nuclease, responsável do reconhecimento nos PAMs e conseqüentemente na clivagem do DNA alvo (van der Oost *et al.*, 2014). Esta enzima forma complexos que unem o DNA do fago ou plasmídeo para a clivagem (Garneau *et al.*, 2010).

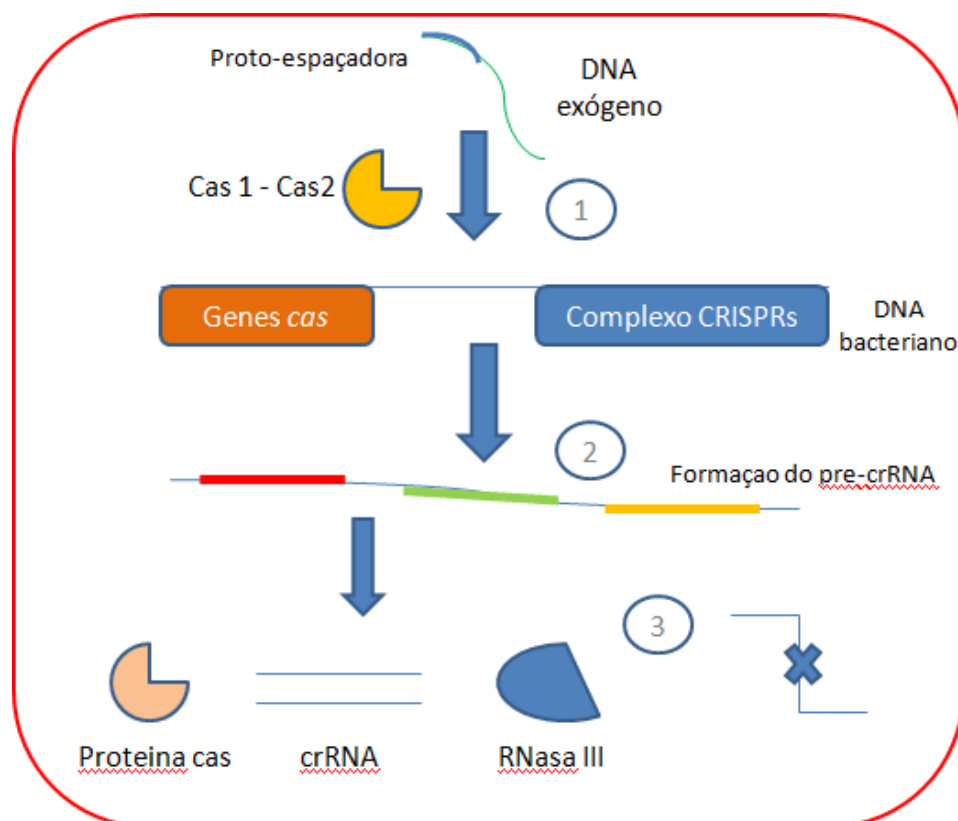
#### 3.6.3 Mecanismos de interferência

Estudos propõem a existência de imunidade adaptativa através do sistema CRISPRs em três etapas (Figura 2): A **etapa de adaptação** corresponde ao recrutamento de novos DNAs. O DNA do vírus invasor é processado em

segmentos curtos que são inseridos na sequência do CRISPR, como novas sequências espaçadoras. Para iniciar este processo é necessário o reconhecimento do PAM; Na **etapa de expressão**, acontece a transcrição dos genes do CRISPRs seguido de um processo de geração de um transcrito denominado de RNAs CRISPRs (crRNA), que tem com função ser uma sequencia antisense do DNA do fago ou plasmídeo invasor. Finalmente ocorre a **etapa de interferência**, onde o crRNA realiza clivagem do DNA invasor por meio de nucleases. Como as sequências de crRNA são copiadas das sequências de DNA virais adquiridas durante a adaptação, elas são sequencias exatas do genoma viral e, assim, servem como excelentes guias (van der Oost *et al.*, 2014).

Os sistemas CRISPR tipo II possuem um mecanismo diferente devido à presença de uma molécula chamada de transativador crRNA, tracrRNA (Deltcheva *et al.*, 2011). Esta molécula forma um híbrido com outra molécula (pre-crRNA), uma vez unida resulta um RNA maduro (crRNA-tracrRNA) que é reconhecido e clivado por uma enzima ribonuclease RNase III.

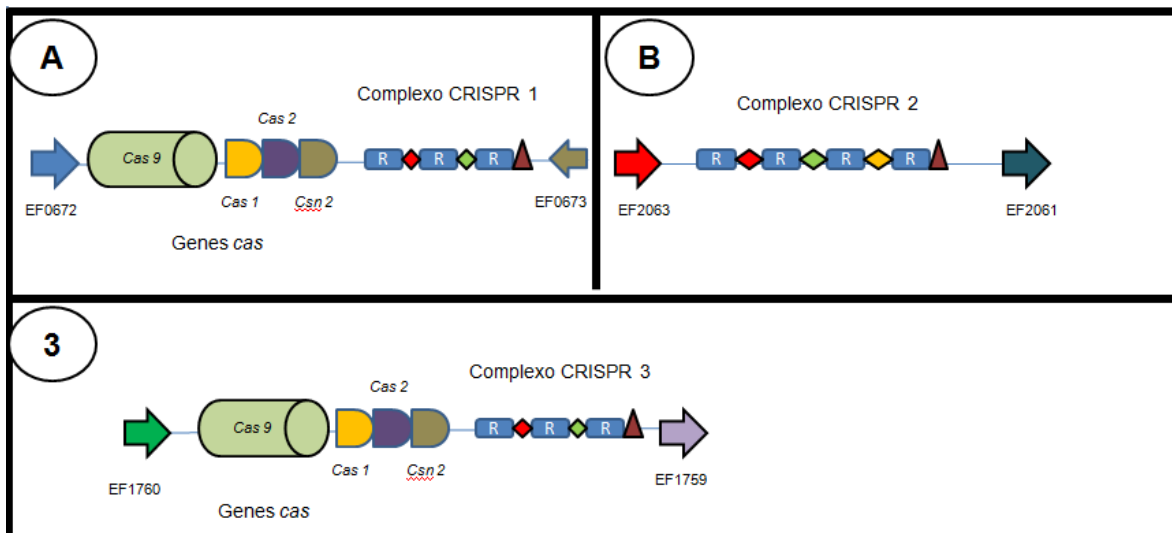
Representativa do sistema CRISPR tipo II (A, B, C) aparece uma cadeia simple de RNA chamada sgRNA, a qual forma uma molécula hibrida com o DNA alvo (Nishimasu *et al.*, 2014)



**Figura 2.** Mecanismo de CRISPRs-cas. Na etapa de **aquisição**, as proteínas cas1 e cas2 capturam o DNA do fago/plasmídeo (sequência protoespaçadora). 1) esta sequência é integrada ao locus CRISPR, no caso do sistema CRISPR tipo II a enzima cas9 reconhece o motivo adjacente do protoespaçador (PAM). 2) Na etapa de **expressão**, o locus CRISPR é transcrito para o precursor chamado RNA CRISPR (crRNA).3) Na etapa de **interferência**, surge a formação do complexo crRNA-tracrRNA-cas9 maduro, aonde a nuclease realiza a eliminação do DNA exógeno (sistemas CRISPR tipo II). Fonte: Este estudo

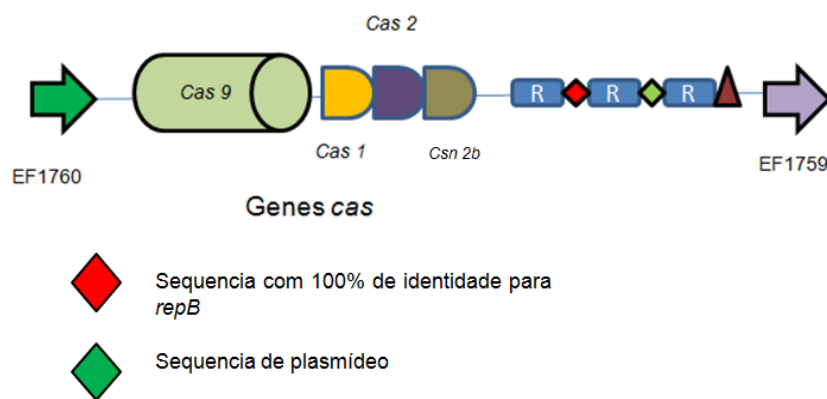
### 3.6.4 CRISPR em *Enterococcus faecalis*.

Para a bactéria *E. faecalis*, tem sido identificados dois sistemas CRISPRs do tipo II: CRISPR1-Cas e CRISPR3-Cas (Bourgogne *et al.*, 2008; Palmer & Gilmore, 2010). A distribuição dos CRISPR1-Cas e CRISPR3-Cas varia entre a cepa de *E. faecalis*, sendo ausentes para as cepas resistentes aos antibióticos (Palmer & Gilmore, 2010). A existência de outro CRISPR, identificado como CRISPR2, carente de genes *cas*, tem se tornado objeto de diversos estudos (Palmer & Gilmore, 2010) (Figura 3).



**Figura 3.** Arquitetura do locus CRISPR em *E. faecalis*. A) CRISPR1-cas B) CRISPR2 C) CRISPR3-cas. A sequência líder 5' é mostrada com uma linha azul. As repetições estão indicadas por quadrados azuis e as sequências espaçadoras indicadas por diamantes de diferentes cores (vermelho, verde e roxo). A repetição terminal está indicada por um triângulo. Fonte: Adaptação de Hullahalli *et al.*, 2015.

Em 2016, Price e colaboradores realizaram um estudo na cepa T11 para determinar a relação entre o CRISPR3-Cas, o CRISPR2 (órfão) e outro sistema complementar conhecido como modificador de restrição (R-M) (que atuam como sistemas de defesa contra plasmídeos conjugativos *Pam714* e *pCF10* (Figura 4). Entre os resultados, encontraram que o sistema CRISPR3-Cas e o R-M forneceram defesas complementarias para a célula e o CRISPR2 necessita dos fatores codificados pelo locus CRISPR1 para atuar na defesa, já que por si mesmo não confere resistência contra elementos gênicos móveis.



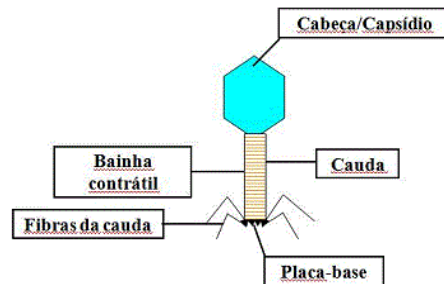
**Figura 4.** Representação do locus CRISPR3-cas em *E. faecalis* T11. O locus CRISPR3-cas de T11 consiste em 21 sequências espaçadores únicas representadas por diamantes, intercaladas entre sequências repetidas de 36 nucleotídeos representadas em retângulos. As sequências espaçadores mostram identidade significativa com elementos gênicos móveis: bacteriófagos (vermelho), plasmídeos (roxo), pró-fagos (verde). Fonte: Adaptação de Price *et al.*, 2016.

### 3.7 Bacteriófagos

Os bacteriófagos são vírus que infectam e matam células bacterianas com alta eficiência e encontram-se presentes em diversos ecossistemas (Elbreki *et al.*, 2014). Como os bacteriófagos são capazes de lisar células ou transferir genes entre as bactérias, estes possuem a capacidade de alterar a composição das populações microbianas (Young, 2014).

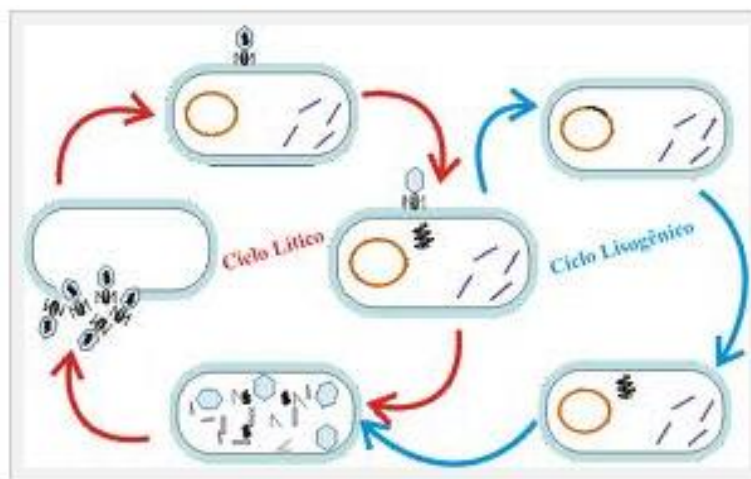
Estes vírus possuem uma cabeça protéica/capsídea, a qual carrega e protege o material genômico (RNA ou DNA) do vírus. (Figura 5). O material genético apresenta diferenças em tamanho, em conformação (circular, linear ou

segmentado), e estrutural (fita de DNA simples, fita de DNA dupla, fita de RNA simples e fita de RNA dupla) (Ackermann, 2007).



**Figura 5.** Desenho da estrutura presentes em um bacteriófago Fonte: (Microbiology and Immunology On-line).

O processo de replicação dos bacteriófagos consiste de dois ciclos: **ciclo lítico** e **ciclo lisogênico**. No ciclo lítico, o vírus insere o material genético na célula alvo, produzindo a montagem e liberação de partículas em grande número, levando à lise celular. Por outro lado, no ciclo lisogênico, o vírus insere o material genético na célula alvo, quando este DNA se integra ao DNA da célula hospedeira sendo denominado de pró-fago e as funções biológicas da bactéria hospedeira continuam. Este processo gerará células-filhas com o material genômico do fago (Stephens *et al.*, 2009) (Figura 6).



**Figura 6.** Representação das fases de replicação para bacteriófagos. Ciclo Lítico em linhas vermelhas e Ciclo Lisogênico em linhas azuis (Disponível em <https://leandromatheusbioifes.wordpress.com/2011/02/15/cavalo-de-troia/>. Acesso em: 2 de fevereiro. 2017).

A classificação para bacteriófagos tem sido discutida desde o descobrimento destes (Nelson, 2004). A ordem Caudovirales (caudas não contrátil longas), contem três famílias: Myoviridae, Podoviridae, Siphoviridae e outras ainda não classificadas em Taxons (Adriaenssens *et al.*, 2015).

### 3.8. Bacteriófagos de *Enterococcus faecalis*.

Os primeiros bacteriófagos em enterococos foram caracterizados como partículas tipo-fago isolados de intestino de ratas. Depois de análises com anticorpos, Rogers & Sarles (1963) capturaram imagens das partículas utilizando Microscopia Eletrônica (ME). Eles determinaram que estes vírus apresentavam cabeças icosaédricas e caudas curtas não contráteis. Thomas Brock (1964) publicou um estudo detalhado sobre os hospedeiros dos bacteriófagos, assim como a identificação de cepas lisogênicas.

Os bacteriófagos fornecem informação sob diversos processos de patogenicidade bacteriana, um exemplo são os diversos fatores de virulência presentes nos bacteriófagos e que são encontrados em bactérias patogênicas para humanos e animais (Novick *et al.*, 2010).

Destacam-se os seguintes bacteriófago: SAP6 (Lee & Park, 2012); IME-EF1 (Zhang *et al.*, 2013); BC-611 (Horiuchi *et al.*, 2012) e F4 (Nigutová *et al.*, 2008). Outros grupos também têm sido reconhecidos, como os bacteriófagos, como os  $\Phi$ FL1A,  $\phi$ FL1B,  $\phi$ FL1C,  $\phi$ FL2A,  $\phi$ FL2B,  $\phi$ FL3A,  $\phi$ FL3B e  $\phi$ FL4A (Yasmin *et al.*, 2010). Uma grande parte dos bacteriófagos de ciclo lítico tem sido isolado de fontes ambientes, como: esgotos, água para o gado e tratos intestinais (Horiuchi *et al.*, 2012).

### 3.8.1. Bacteriófago SAP6

As características do SAP6 foram examinadas por ME. Os estudos apresentam um vírus da Família Siphoviridae (Ackermann, 2003). O SAP6 foi isolado de amostras de esgoto e a sequência genômica é composta por 58,619 pb. Os genes de morfogênese e montagem de DNA contêm proteínas relacionadas com a formação da cabeça, proteínas associadas à formação da cauda, a terminase e outras proteínas.

### 3.8.2 Bacteriófago IME-EF1

O IME-EF1 foi isolado de *E. faecalis* proveniente de esgoto hospitalar. A análise da sequência genômica apresenta 57,081 pb. O genoma possui 40% de G+C. O IME-EF1 apresenta uma cabeça isométrica. A endolisina do bacteriófago tem sido reconhecida como um agente potencial para o tratamento de infecções clínicas causadas por bactérias resistentes a antibióticos (Harper *et al.*, 2011).

### 3.8.3 Bacteriófago BC-611

O BC-611 foi examinado por ME. Este foi classificado na Família Siphoviridae (Ackermann, 2003). A sequência genômica estabelece 53,996 pb. O genoma possui 40,45 % G+C. Este foi isolado de *E. faecalis* NP10011, a qual foi identificada por Nichinichi Pharmaceutical Co., Ltd.

### 3.8.4 Bacteriófago F4

O F4 foi isolado por Styriak *et al.* o ano 1994 de amostras de fluido de boi. O genoma é DNA circular e com uma massa molecular de 60,4 kb. O fago tem uma cabeça alongada e uma cauda não contrátil flexível. O F4 é o segundo bacteriófago identificado de *E. faecalis*.

### 3.8.5 Bacteriófagos $\phi$ FL1ABC, $\phi$ FL2AB, $\phi$ FL3AB, $\phi$ FL4A.

Baseado no estudo realizado por Yasmin *et al.* (2010) que utilizaram pirosequenciamento, revelaram-se 4 grupos de fagos isolados de amostras clínicas.

Determinaram-se as características morfológicas e moleculares (Quadro 1) e realizaram-se comparações de sequências genômicas dos bacteriófagos dos grupos identificados (Quadro 2).

Bacteriófago $\Phi$ FL								
Propiedades	1A	1B	1C	2A	2B	3 A	3B	4 A
Genoma (pb)	38,764	38,989	38,721	36,270	36,826	39,576	40,275	37,856
G+C (mol%)	36,7	34	34	34,6	34,6	34,5	34,5	37,8
Capsídio (nm)	48	53	48	48	50	49	51	48
Cauda (nm)	225	205	243	229	221	220	225	204

**Quadro 1:** Características morfológicas e moleculares dos bacteriófagos de *Enterococcus faecalis* identificados por sequenciamento. Fonte: Adaptação de Yasmin *et al.*, 2010



Porcentagem de identidade de DNA (%) bacteriófago $\Phi$ FL								
	1A	1B	1C	2A	2B	3A	3B	4A
1A	100	99	99	88	87	37	38	5
1B		100	99	88	87	37	38	4
1C			100	88	87	37	38	4
2A				100	99	40	40	12
2B					100	41	41	12
3A						100	99	3
3B							100	3
4A								100

**Quadro 2:** Estudo comparativo de genomas dos bacteriófagos de *E. faecalis* utilizando Fasta3. Fonte adaptação de Yasmin *et al.*, 2010.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Isolados de *Enterococcus*

Cento e cinquenta e três isolados de enterococos provenientes de diferentes tipos de amostras (53 alimentares, 33 clínicas e 67 de fezes de diferentes espécies de animais) foram empregados neste trabalho (Tabela 01). Os isolados alimentares e de animais foram previamente identificados por Riboldi *et al.*, 2008; Cassenego *et al.*, 2013; Prischula *et al.*, 2013, Santestevan *et al.*, 2015 e Prischula *et al.*, 2016. Os isolados clínicos foram provenientes da bacterioteca do Prof. Dr. Pedro Alves de Azevedo da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

Todos os isolados haviam sido previamente avaliados quanto a características fenotípicas de resistência e genotípica para a presença de genes de fatores de virulência e resistência.

As colônias foram preservadas em solução de 10 % (p/v) de leite desnatado Molico® (Nestlé) acrescido de 10 % (v/v) de glicerol e congeladas a -20 °C para análises moleculares posteriores e a fim de evitar que características importantes se percam com o tempo de manuseio das colônias, como plasmídeos de resistências, por exemplo.

Antes da realização dos ensaios, os isolados foram submetidos à crescimento em ágar Infusão de cérebro e coração (*Brain Heart Infusion* – BHI, Himedia®, India) à 37°C durante 24 h.

**Tabela 1.** Isolados de enterococos provenientes de diferentes tipos de amostras.

Origem das amostras	Quantidade de isolados	
	<i>E.faecalis</i>	<i>E.faecium</i>
<b>Alimentares</b>		
Verduras/legumes	11	01
Carnes/leite e derivados	11	30
<b>Clínicas</b>		
Urina	23	01
Sangue/Outros	8	01
<b>Animais</b>		
Lobo Marinho	13	01
Cloaca de frango	18	00
Pinguim	05	15
Tartaruga	09	06
<b>Total</b>	<b>98</b>	<b>55</b>

#### 4.2 Extrações de DNA bacteriano.

A extração do DNA total foi realizada por método físico-químico (Donato, 2007). Uma colônia previamente isolada em ágar BHI foi inoculada em 5 mL de caldo BHI a 37 °C por 24 h. Após, 1 mL dessa cultura foi transferida para um microtubo, o qual foi centrifugado a 14.000 rpm durante 5 min. Após centrifugar, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em 40 µL da solução de lise composta por 5 % de NaOH 1M, 2,5 % de SDS 10 % e 92,5 % de TE 1X (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,8).

O *pellet* ressuscitado na solução de lise permaneceu à temperatura de 100 °C durante 15 minutos e, posteriormente, foi diluído em 460 µL de tampão TE 1X, homogeneizado vigorosamente e centrifugado a 14.000 rpm durante 5 min. Após essa centrifugação, O *pellet* foi descartado e o DNA foi transferido para outro

microtubo e armazenado a -20 °C.. A avaliação da quantidade de 90 ng foi determinada pelo NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific™)

#### 4.3 Confirmação do gênero *Enterococcus*

Para a confirmação do gênero foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) verificando a presença do gene *tuf*, levando em consideração o método estabelecido por Ke *et al.*(1999). Os oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação do gene *tuf* estão apresentados na Tabela 02.

**Tabela 2.** *Primers* utilizados na reação de PCR e tamanho esperado de pares de bases (pb) do fragmento gerado.

<b>Primers</b>	<b>Sequência (5'-3')</b>	<b>Produto (pb)</b>	<b>Referências</b>
<b>Ent_1</b>	TACTGACAAACCATTCATGATG	112	Ke <i>et al.</i> , 1999
<b>Ent_2</b>	AACTTCGTCACCAACGCGAAC		

As reações da PCR foram otimizadas em 25 µL de volume total e continham: 1x de tampão *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen®), 200 µM de dNTPs (Ludwig Biotecnologia), 1,25 µM µL de cada Primer (Invitrogen®), 1U, de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®), 90 ng de DNA e água deionizada estéril para completar o volume (MilliQPlus, Millipore®). Os produtos foram amplificados em termociclador *Amplitherm Thermal Cyclers* nas seguintes condições: 3 min. a 95 °C; seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 seg. a 54 °C e 1 min. a 72 °C; e extensão final de 7 min. a 72 °C. A cepa *E. faecalis* ATCC 29212 foi utilizada como controle positivo durante as reações.

O amplicon esperado com tamanho de 112 pb foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1,5 % corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen®).

#### 4.4 Confirmação das espécies *E. faecalis* e *E. faecium*.

A confirmação molecular dos enterococos foi realizada por PCR, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos para identificar as espécies de enterococos alvo do estudo: *E. faecalis* e *E. faecium*. Os oligonucleotídeos iniciadores empregados para a amplificação dos genes alvos para as espécies estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Primers utilizados nas reações de PCR e tamanho esperado de pares de bases (pb) dos fragmentos gerados.

Primers	Sequência (5'-3')	Produto (pb)	Referências
<b><i>E. faecalis</i></b>			
ddl_F	CACCTGAAGAAACAGGC	475	Depardieu <i>et al.</i> , 2004
ddl_R	ATGGCTACTTCAATTTACAG		
<b><i>E. faecium</i></b>			
EFm_F	TATGACAGCGACTCCGATTCC	658	Cheng <i>et al.</i> , 1997
EFm_R	TTGAGGCAGACCAGATTGACG		

As reações da PCR foram otimizadas em 25 µL de volume total e continham: 1x de tampão *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen®), 200 µM de dNTPs (Ludwig Biotecnologia), 1,25 µM µL de cada Primer (Invitrogen®), 1U, de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®), 90 ng de DNA e água deionizada estéril para completar o volume (MilliQPlus, Millipore®). Os produtos foram amplificados em termociclador *Amplitherm Thermal Cyclers* nas seguintes condições: 5 min a 95 °C; seguido por 35 ciclos de 1 min. a 95 °C, 1 min. a 54 °C (*E. faecalis*) e a 56 °C (*E. faecium*) 1 min. a 72 °C; e 7 min. a 72 °C. As cepas *E. faecalis* ATCC 29212 e *E. faecium* ATCC SS1274 foram utilizadas como controle positivo durante as reações.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5 % corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen®).

#### 4.5 Detecção dos genes CRISPRs de enterococos

A detecção molecular dos genes CRISPRs foi realizada por PCR em 98 isolados de *E. faecalis* e 55 de *E. faecium*, utilizando-se *primers* específicos para identificar os CRISPRs. As sequencias dos *primers* empregados para a amplificação dos genes alvos para os CRISPRs estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4.** *Primers* utilizados nas reações de PCR e tamanho esperado de pares de bases (pb) dos fragmentos gerados.

<b>Primers</b>	<b>Sequência (5'-3')</b>	<b>Produto (pb)</b>	<b>Referências</b>
<b>CRISPR 1</b>			
EFLG_01963_F	CAGAAGACTATCAGTTGGTG	783	Palmer <i>et al.</i> , 2010
EFLG_01963_R	CCTTCTAAATCTTCTTCATAG		
<b>CRISPR 2</b>			
EF2063_F	CTGGCTCGCTGTTACAGCT	variável	Palmer <i>et al.</i> , 2010
EF2061_R	CCAATGTTACAATATCAACCA		
<b>CRISPR 3</b>			
EFKG_00787_F	GCTGAATCTGTGAAGTTACTC	258	Palmer <i>et al.</i> , 2010
EFKG_00787_R	CTGTTTTGTTCCACCGTTGGAT		

As PCRs foram otimizadas em 25 µL e continham 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 1x de tampão da *Taq* DNA polimerase (Ludwig®), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Ludwig®), 0,2 µM de dNTPs (Ludwig®), 0,4 µM de Primer (IDT®), 1U de *Taq* DNA polimerase (Ludwig®), 90 ng de DNA e água ultra pura estéril para completar o volume (MilliQPlus, Millipore®).As amplificações foram realizadas em Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler nas seguintes condições: 5 min. a 94 °C, seguidos de 35 ciclos de 1 min. a 94 °C, 1 min. a 55 °C (para *CRISPR 1* e *CRISPR 2*) ou 50 °C (para *CRISPR 3*) e 1 min. a 72 °C, e uma extensão final de 5 min. a 72 °C.

Os produtos de PCR com tamanhos de 783 e 980 pb foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% e o de 258 pb em gel de agarose a 1.5%. Os géis foram corados com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen®).

#### 4.6 Sequenciamento dos fragmentos de CRISPRs

Os amplificadores dos genes *CRISPR 1*, *CRISPR 2* e *CRISPR 3* foram sequenciados no sequenciador modelo ABI 3130 (Applied Biosystems) utilizando o polímero POP6. Para a marcação, foi utilizado o kit *Big Dye Terminator v3.1* (Applied Biosystems). As sequências de nucleotídeos foram analisadas pela ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) ([HTTP://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)).

#### 4.7 Detecções dos genes dos bacteriófagos de enterococos

Como esses bacteriófagos estão presentes em *E. faecalis*, os ensaios de detecção da presença desses bacteriófagos foram realizados com 86 isolados de *E. faecalis*.

##### 4.7.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção dos genes dos bacteriófagos SAP6, IME-EF1, F4, VD13 e BC-611.

A detecção molecular por PCR dos diferentes bacteriófagos foi realizado utilizando-se *primers* desenhados para este trabalho. Para isso, foram pesquisadas diversas sequências depositadas no NCBI. Depois, utilizando programas de bioinformática (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) foi realizado o desenho experimental dos *primers* para amplificar o gene *polA* (*DNA polymerase I*). Para os bacteriófagos IME-EF1, VD13, F4 e BC-611 observou-se uma homologia de 100 % para o gene *polA*, os *primers* foram denominados IME/VD13/F4/BC-16 sense e antisense (Tabela 05). Para o bacteriófago SAP6, os *primers* foram denominados, SAP6 sense e SAP6 antisense (Tabela 05).

**Tabela 5.** *Primers* utilizados nas reações de PCR e tamanho esperado de pares de bases (pb) dos fragmentos gerados.

<b>Primers</b>	<b>Sequência (5'-3')</b>	<b>Produto (pb)</b>	<b>Referências</b>
IME/VD13/F4/BC -611	GAATACTTGGCGATGGACTTT	408	Este estudo
IME/VD13/F4/BC -611	TCATAACATCAACGTCAGC		
SAP6 sense	GAATACTTGGCGATGGACTTTG	522	Este estudo
SAP6 antisense	GATGTTCAACTGCCATTCAAAC		

As reações foram realizadas em 25 µL de volume total e continham: 1x de tampão de PCR (4G ®), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (4G ®), 0,2 µM de dNTPs (4G ®), 0,4 µM de cada primer (IDT®), 1U de *Taq* DNA polimerase (4G ®), 90 ng de DNA e água ultra pura estéril para completar o volume (MilliQPlus, Millipore®).

Os produtos foram submetidos a amplificação em termociclador *Amplitherm Thermal Cyclers* nas seguintes condições: 5 min. a 94°C, seguidos de 36 ciclos de 30 seg. a 94°C, 30 seg. a 45°C e 30 seg. a 72°C e extensão final de 10 min. a 72°C. Depois foram testados em diferentes condições: 5 min. a 94°C, seguidos de 36 ciclos de 30 seg. a 94°C, 30 seg. a 50°C e 30 seg. a 72°C e extensão final de 10 min. a 72°C.

Finalmente em condições: 5 min. a 94°C, seguidos de 36 ciclos de 30 seg. a 94°C, 30 seg. a 55°C e 30 seg. a 72°C e extensão final de 5 min. a 72°C.

Os amplicons esperados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen®).



#### 4.7.2 Reação em cadeia da polimerase para detecção dos genes dos Bacteriófagos $\Phi$ FL1ABC, $\Phi$ FL2AB, $\Phi$ FL3AB e $\Phi$ FL4A

A detecção molecular dos bacteriófagos foi realizada por PCR utilizando-se *primers* desenhados para este trabalho. Para isso, foram pesquisadas diversas sequências depositadas no NCBI. Depois, utilizando programas de bioinformática (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) realizou-se o desenho experimental dos oligonucleotídeos iniciadores para amplificar o gene *gp39* (*terminase large subunit*) de  $\Phi$ FL1ABC, o gene *gp35* (*terminase large subunit*) de  $\Phi$ FL2AB, o gene *gp26* de  $\Phi$ FL3AB (*DNA cytosine methyltransferase*) e gene *gp48* (*tail tape measure protein*) de  $\Phi$ FL4A. Os iniciadores indicados para a amplificação dos genes são apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6.** *Primers* utilizados para as reações de PCR e tamanhos esperados de pares de bases (pb) para detectar os bacteriófagos  $\Phi$ FL1ABC,  $\Phi$ FL2AB,  $\Phi$ FL3AB E  $\Phi$ FL4A.

<b>Primers</b>	<b>Sequência (5'-3')</b>	<b>Produto (pb)</b>	<b>Referências</b>
PHIFL1_F	GGAGCTAAGCGTTCTGGTAAA	850	Este estudo
PHIFL1_R	GACGAGCCGAATCACAATAGA		
PHIFL2_F	GAGTGCGGTCAGTTTGTACT	242	Este estudo
PHIFL2_R	GCGTCCATACGTTCCCTCTAATG		
PHIFL3_F	CGCAATCTGTTGTTGGATGG	563	Este estudo
PHIFL3_R	TCGATCTTGTCTCGTGGTAATC		
PHIFL4_F	GTCGGGCTCTCTTACTTCATTC	375	
PHIFL4_R	GCAGCTACCTTGTCACCTAAA		Este estudo

#### 4.7.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção do bacteriófago $\Phi$ FL1ABC

As reações foram realizadas em 25  $\mu$ L de volume total e continham: 1x de tampão de PCR (4G®), 1,5 mM de  $MgCl_2$  (4G®), 0,2  $\mu$ M de dNTPs (4G®), 0,4  $\mu$ M de cada Primer (IDT®), 1U de *Taq* DNA polimerase (4G®), 90 ng de DNA e água ultra pura estéril para completar o volume (MilliQPlus, Millipore®).

As amplificações foram primeiramente realizadas em Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler nas seguintes condições: 5 min. a 94°C,

seguidas de 38 ciclos de 30 seg. a 94°C, 30 seg. a 45°C e 30 seg. a 72°C e extensão final de 5 min. a 72°C.

Depois foram testados em termociclador *Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler* nas seguintes condições: 5 min. a 94°C, seguidos de 38 ciclos de 30 seg. a 94°C, 30 seg. a 50°C e 30 seg. a 72°C e extensão final de 10 min. a 72°C.

Finalmente foram testados em diferentes condições: 5 min. a 94°C, seguidos de 36 ciclos de 30 seg. a 94°C, 30 seg. a 50°C e 30 seg. a 72°C e extensão final de 10 min. a 72°C.

#### 4.7.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR) duplex para detecção dos genes dos bacteriófagos $\Phi$ FL2AB e $\Phi$ FL3AB

A reações da duplex PCR para os gene *gp40* e *gp26* foram feitas em um volume total de 50  $\mu$ L, contendo 1x de tampão de reação da *Taq* DNA polimerase (4G®), 1,5 mM de  $MgCl_2$  (4G®), 0,4  $\mu$ M de dNTPs (4G®), 0,4  $\mu$ M de cada Primer para ambos genes (IDT®), 2U de *Taq* DNA polimerase (4G®), 90 ng de DNA e água ultra pura estéril para completar o volume(MilliQPlus, Millipore®).

As ampliações foram realizadas em *Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler* nas seguintes condições: 5 min. a 94°C, seguidas de 38 ciclos de 1 min. a 94°C, 30 seg. a 55°C e 30 seg. a 72°C e extensão final de 5 min. a 72°C.

Os amplicons esperados de 242 e 563 pb foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,6%. O gel foi corado com SYBR® Safe DNA Gel Strain (Invitrogen®) e visualizado sob luz ultravioleta.

#### 4.7.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção do bacteriófago $\Phi$ FL4A

A reação da PCR para o gene *gp34* foi feita em um volume total de 25  $\mu$ L, contendo 1x tampão de reação da *Taq* DNA polimerase (4G®), 1,5 mM de  $MgCl_2$  (4G®), 0,4  $\mu$ M de dNTPs (4G®), 0,4  $\mu$ M de cada Primer (IDT®), 1U de *Taq* DNA polimerase (4G®), 90 ng de DNA e água ultra pura estéril para completar o volume (MilliQPlus, Millipore®). As ampliações foram realizadas no termociclador *Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler* nas seguintes condições:

5 min. a 94°C, seguidas de 38 ciclos de 1 min. a 94°C, 30 seg. a 55°C e 30 seg. a 72°C e extensão final de 5 min. a 72°C.

O amplicon esperado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,6%. O gel foi corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen®) e visualizado sob luz ultravioleta.

#### 4.8 Sequenciamento dos fragmentos de bacteriófago

Os produtos amplificados dos genes de bacteriófagos foram sequenciados em sequenciador modelo ABI 3130 (*Applied Biosystems*) utilizando o polímero POP6. Para a marcação, foi utilizado o kit *Big Dye Terminator* v3.1 (*Applied Biosystems*). As sequências de nucleotídeos foram analisadas pela ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) ([HTTP://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)).

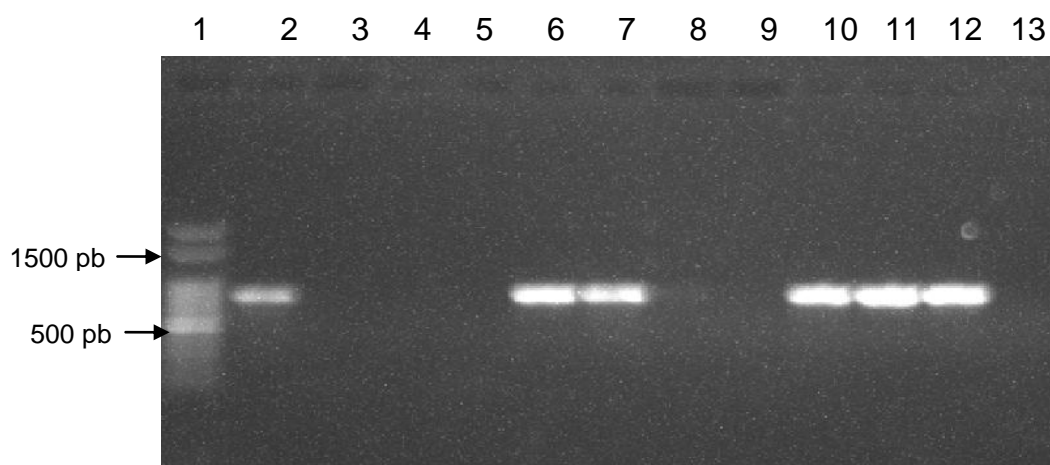
## 5. RESULTADOS

### 5.1 Confirmação do gênero e espécies de *Enterococcus*

A partir da técnica de PCR empregando oligonucleotídeos gênero-específico para a confirmação dos isolados selecionados, verificou-se que todos isolados apresentavam o fragmento de DNA de 112 pb esperado, correspondente com o gene *tuf*. Da mesma forma, a partir das reações de PCR empregando *Primers* espécies-específicas foi possível confirmar que os 98 isolados selecionados pertenciam a espécie *E. faecalis* e os 55 a espécie *E. faecium*.

### 5.2 Detecção dos genes *CRISPR1-Cas*, *CRISPR2* e *CRISPR3-Cas*

O fragmento de 780 pb esperado para o gene *CRISPR1-Cas* foi identificado em 59,19% (58/98) e 7,27% (4/55) dos isolados de *E. faecalis* e *E. faecium*, respectivamente (Tabelas 8 e 9 e Figura 7). No isolados de *E. faecalis*, o genes *CRISPR1-Cas* foi mais frequentemente detectado em amostras clínicas (90,32%), seguidos de amostras de fezes de animais (60,00%) e alimentares (13,66%). O sequenciamento do fragmento de DNA amplificado demonstrou 99% de identidade com o gene *CRISPR1-Cas* de *E. faecalis*



**FIGURA 7.** Eletroforese em gel de agarose a 1 % dos produtos de amplificação do gene *CRISPR1-Cas* de *Enterococcus faecalis*. Coluna 1: Ladder 100 pb; Coluna 2: isolado de alimentos; Coluna 3 à 11: isolados de animais (pinguins), Coluna 12: isolado clínico; Coluna 13: Controle negativo.

**Tabela 7.** Resultados da presença dos genes *CRISPR1-Cas*, *CRISPR2* e *CRISPR3-Cas* em *Enterococcus faecalis* isolados de diferentes tipos de amostras.

Origem dos isolados	N <sup>1</sup>	Número (%) de isolados positivos para os genes		
		<i>CRISPR1-Cas</i>	<i>CRISPR2</i>	<i>CRISPR3-Cas</i>
<b>Alimentares</b>				
Verduras/legumes	11	0	9	1
Carnes/leite e derivados	11	3	6	1
<b>Total</b>	<b>22</b>	<b>3 (13,66)</b>	<b>15 (68,18)</b>	<b>2 (9,09)</b>
<b>Clínicas</b>				
Cateteres	1	1	1	0
Sangue/Urina/Outros	30	27	27	6
<b>Total</b>	<b>31</b>	<b>28 (90,32)</b>	<b>28 (90,32)</b>	<b>6 (19,35)</b>
<b>Animais</b>				
Leões Marinhos	13	12	13	1
Frango	18	9	17	3
Pinguins	5	4	5	0
Tartaruga	9	2	9	0
<b>Total</b>	<b>45</b>	<b>27 (60)</b>	<b>44 (97,77)</b>	<b>4 (8,88)</b>
<b>Total</b>	<b>98</b>	<b>58 (59,18)</b>	<b>87 (88,77)</b>	<b>12 (12,24)</b>

1. N: número de amostras

O gene *CRISPR2* foi o mais frequente encontrado em comparação aos outros CRISPRS avaliado no presente estudo, sendo detectado em 88,77% (87/98) e 32,72% (18/55) dos isolados de *E. faecalis* e *E. faecium*, respectivamente (Tabelas 7 e 8). Os fragmentos de DNA de 780 pb, de tamanho variável e 258 pb esperados pode ser visualizado na Figura 7-9.

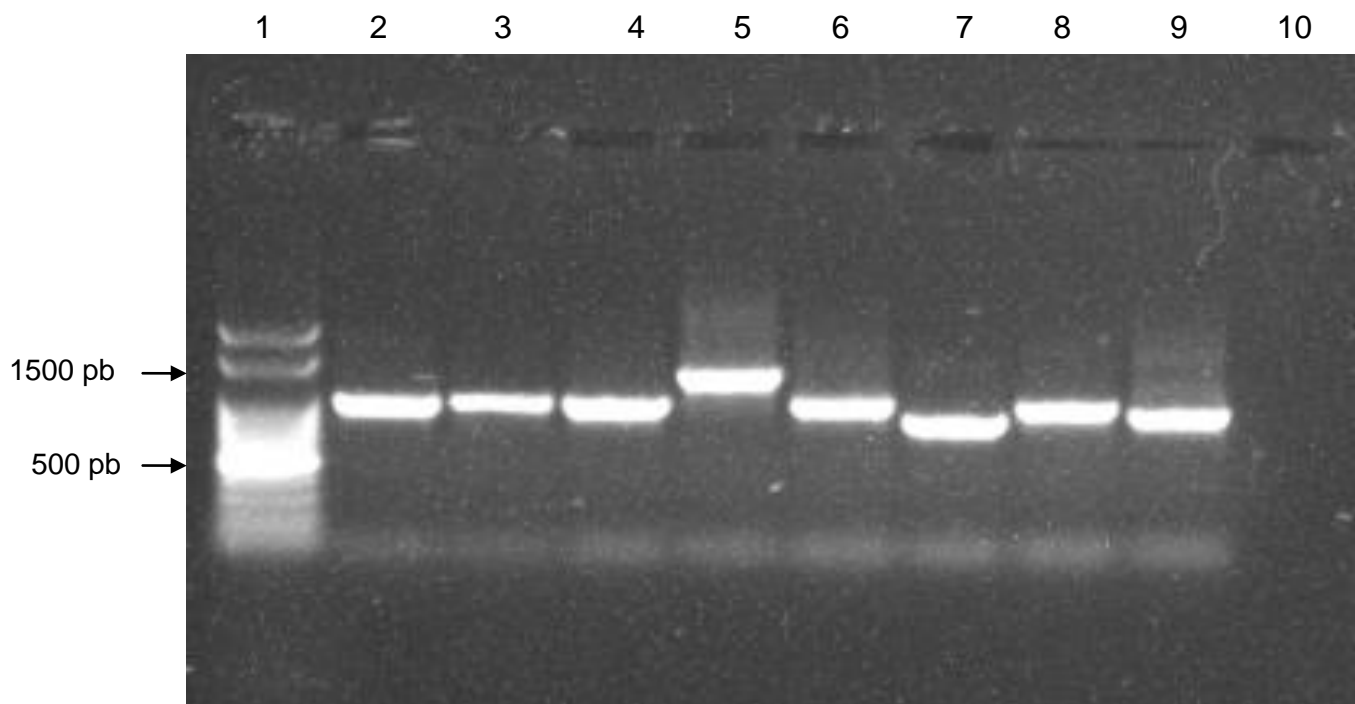
Entre os *E. faecalis* isolados de diferentes tipos de amostras, o gene *CRISPR2* foi mais frequentemente detectado em amostras de animais (97,77%),

seguidos de clínicos (90,32%) e alimentares (68,18%). Em relação à *E. faecium*, os isolados provenientes de amostras clínicas apresentaram a maior frequência (50%) para o gene *CRISPR2*, seguidos de alimentares (48,38%) e animais (9,09%). O sequenciamento do fragmento de DNA amplificado demonstrou 91% a 86% de similaridade com o gene *CRISPR2*.

**Tabela 8.** Resultados da presença dos genes *CRISPR1-Cas*, *CRISPR2* e *CRISPR3-Cas* de *Enterococcus faecium* isolados de diferentes tipos de amostras.

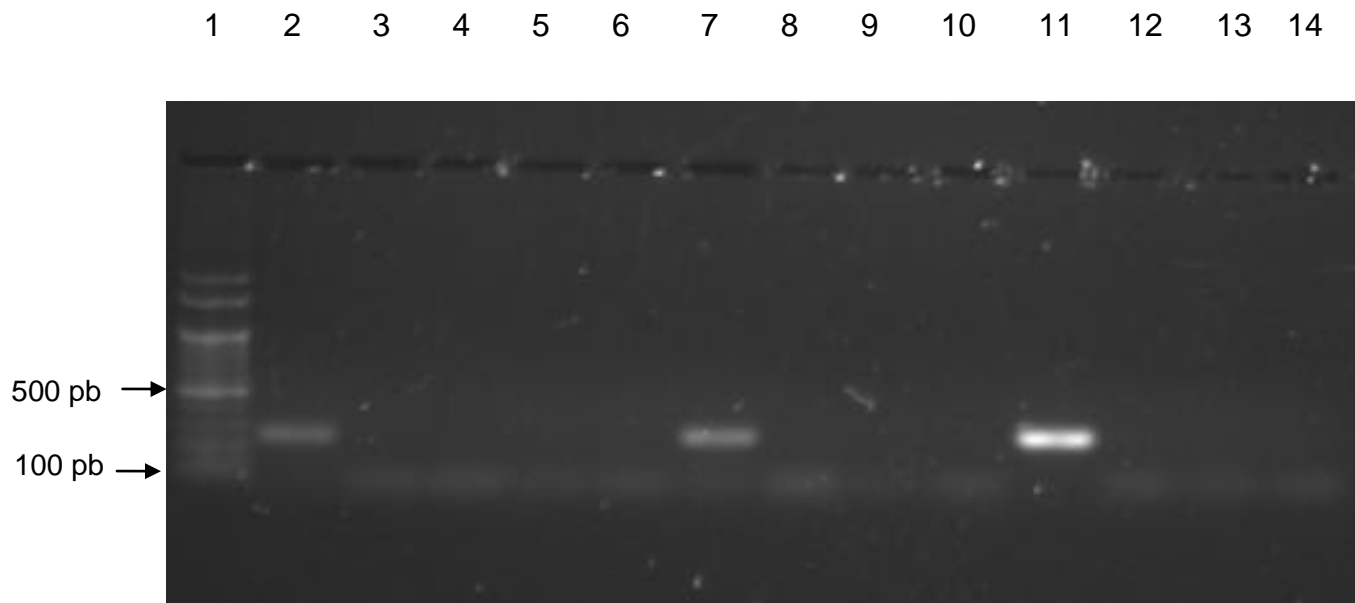
Origem dos isolados	N <sup>1</sup>	Número (%) de isolados positivos para os genes		
		<i>CRISPR1-Cas</i>	<i>CRISPR2</i>	<i>CRISPR3-Cas</i>
<b>Alimentares</b>				
Verduras/legumes	1	0	0	0
Carnes/leite e derivados	30	1	15	1
<b>Total</b>	<b>31</b>	<b>1 (3,22)</b>	<b>15 (48,38)</b>	<b>1 (3,22)</b>
<b>Clínicas</b>				
Urina	1	0	1	0
Sangue/Outros	1	0	0	0
<b>Total</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>1 (50)</b>	<b>0</b>
<b>Animais</b>				
Leões Marinhos	1	0	0	0
Pinguins	15	2	2	0
Tartarugas	6	0	0	0
<b>Total</b>	<b>22</b>	<b>3 (13,63)</b>	<b>2 (9,09)</b>	<b>0 (0)</b>
<b>Total</b>	<b>55</b>	<b>4 (7,27)</b>	<b>18 (32,72)</b>	<b>1 (1,81)</b>

1. N: número de amostras

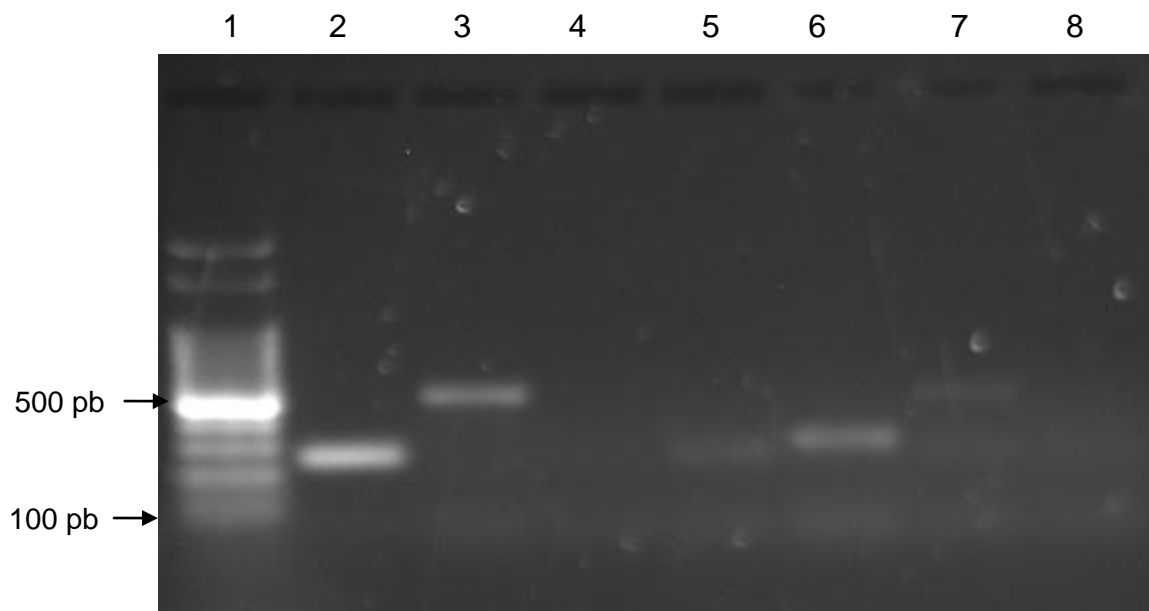


**FIGURA 8.** Eletroforese em gel de agarose a 1 % dos produtos de amplificação do gene *CRISPR2* de *Enterococcus faecalis*. Coluna 1: Ladder 100 pb; Coluna 2: isolado de alimento; Coluna 3 à 9: isolados clínicos, Coluna 10: Controle negativo

O gene *CRISPR3-Cas* foi verificado em 12,24% (12/98) dos isolados de *E. faecalis*, sendo positivo para a PCR em 19,35% (6/31) dos isolados clínicos, seguidos de 8,88% (4/45) dos isolados de animais e 9,09% (2/22) do alimentares (Tabela 9). Em relação a *E. faecium*, o gene *CRISPR3-Cas* foi observado somente em um isolado de origem alimentar (3,22%) (Tabela 8). O fragmentos de DNA de 258 pb esperado para o gene *CRISPR3-Cas* pode ser visualizado nas Figuras 9 e 10. O sequenciamento do fragmento de DNA amplificado demonstrou 98% a 96% de similaridade com o gene *CRISPR3*.



**FIGURA 9** Eletroforese em gel de agarose a 1,5 % dos produtos de amplificação do gene *CRISPR3-Cas* de *Enterococcus faecalis*. Coluna 1: Ladder 100 pb; Coluna 2: isolado de alimento; Coluna 3 à 13: isolados animais (frangos), Coluna 14: Controle negativo.



**FIGURA 10.** Eletroforese em gel de agarose a 1,5 % dos produtos de amplificação do gene *CRISPR3-Cas* de *Enterococcus faecium*. Coluna 1: Ladder 100 pb; Coluna 2: isolado de alimento; Coluna 3 à 7: isolados alimentares, Coluna 8: Controle negativo.



### 5.3 Detecção dos genes dos bacteriófagos

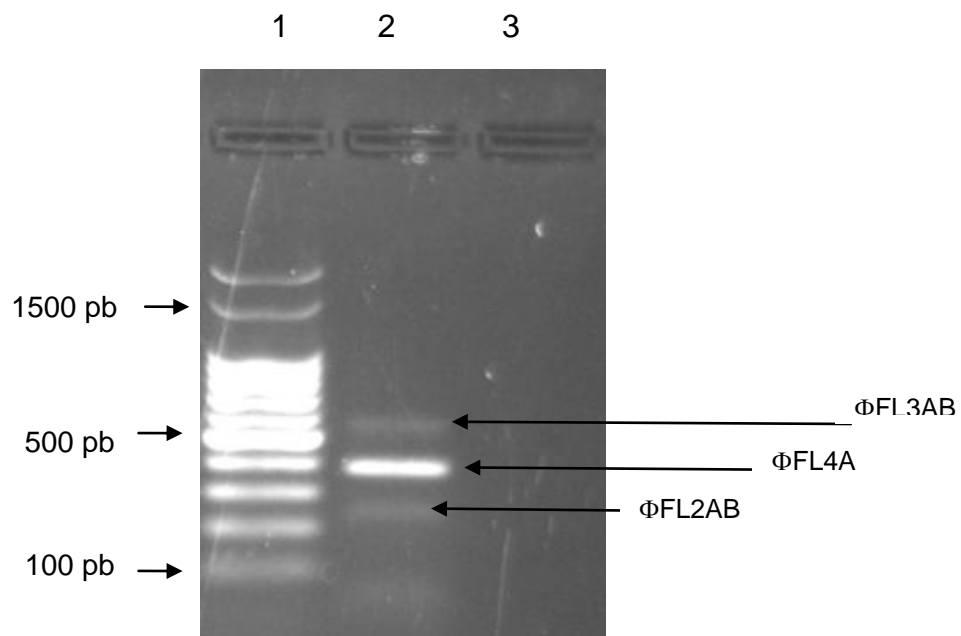
#### 5.3.1 Detecção dos bacteriófagos SAP6, IME-EF1, VD13, F4 e BC-611

Para avaliar a presença dos bacteriófagos SAP6, IME-EF1, VD13, F4 e BC-611, não foi possível obter controles positivos, por consequência foram testadas diferentes temperaturas de anelamento. Na temperatura de 50 °C, foi possível observar fragmentos de DNA de massas moleculares de diferentes das esperadas para os bacteriófagos em estudo. Esses fragmentos foram enviados ao sequenciamento e após a análise do BLAST, eles não confirmaram ser dos provenientes dos bacteriófagos. Dessa forma, não foi possível afirmar se os isolados avaliados possuíam ou não os bacteriófagos testados.

#### 5.3.2 Detecção dos bacteriófagos $\Phi$ FL1ABC $\Phi$ FL2AB, $\Phi$ FL3AB e $\Phi$ FL4A.

Para os bacteriófagos  $\Phi$ FL1ABC, diversos isolados de maneira aleatória foram testados com as condições de temperatura de anelamento teóricas previstas para os iniciadores, mas em diversas tentativas não obtiveram-se ampliações específicas. Como as reações de PCR para avaliar a presença dos bacteriófagos  $\Phi$ FL1ABC não possuíam controles positivos, não foi possível afirmar se os isolados avaliados possuíam ou não os bacteriófagos testados.

Para os bacteriófagos  $\Phi$ FL2AB,  $\Phi$ FL3AB e  $\Phi$ FL4A, foram detectados os fragmentos de 242 pb, 563 pb e 375 pb esperado, respectivamente (Figura 11). O  $\Phi$ FL2AB foi positivo para a PCR em 15,11% (13/86), sendo mais frequente em amostras clínicas (12/31) (Tabela 9). O  $\Phi$ FL3AB foi observado em 15,11%, sendo mais frequente em amostras clínicas (7/31), seguidos de animais (6/41) (Tabela 11). Finalmente o  $\Phi$ FL4A foi o mais frequente detectado em 32,55%, sendo observados com elevada frequência entre as amostras clínicas (26/31) com 83,8% (Tabela 9). O sequenciamento dos fragmentos de DNA amplificado dos bacteriófagos  $\Phi$ FL2AB,  $\Phi$ FL3AB e  $\Phi$ FL4A demonstraram 98%, 98% e 99% de identidade com os genes de bacteriófagos  $\Phi$ FL2AB,  $\Phi$ FL3AB e  $\Phi$ FL4A, respectivamente.



**Figura 11:** Eletroforese em gel de agarose a 1,6 % dos produtos de amplificação dos genes em bacteriófagos. Coluna 1: Ladder 100 pb; Coluna 2: gene *gp26*, *gp48*, *gp35*; Coluna 3: Controles negativos.

**Tabela 9.** Resultados da presença dos genes *gp26*, *gp48*, *gp35* para bacteriófagos  $\Phi$ FL2AB,  $\Phi$ FL3AB e  $\Phi$ FL4A em *Enterococcus faecalis* isolados de diferentes tipos de amostras.

Origem dos isolados	N	Número (%) de isolados positivos para os genes		
		$\Phi$ FL2AB	$\Phi$ FL3AB	$\Phi$ FL4A
<b>Alimentares</b>				
Verduras/legumes	7	1	0	1
Carnes/leite e derivados	7	0	0	0
<b>Total</b>	<b>14</b>	<b>1 (7,14)</b>	<b>0</b>	<b>1 (7,14)</b>
<b>Clínicas</b>				
Cateteres	1	1	0	1
Sangue/urina/Outros	30	11	7	25
<b>Total</b>	<b>31</b>	<b>12 (38,7)</b>	<b>7 (22,58)</b>	<b>26 (83,87)</b>
<b>Animais</b>				
Leões Marinhos	12	0	5	1
Pinguins	5	0	0	0
Tartarugas	9	0	0	0
Frangos	15	0	1	0
<b>Total</b>	<b>41</b>	<b>0</b>	<b>6 (14,63)</b>	<b>1 (7,14)</b>
<b>Total</b>	<b>86</b>	<b>13 (15,11)</b>	<b>13 (15,11)</b>	<b>28 (32,55)</b>

#### 5.4. Relação entre os genes CRISPR, bacteriófagos e fenótipo.

Foram realizadas análises para verificar a relação entre a presença ou ausência de CRISPRs e bacteriófagos nos isolados de *E. faecalis* provenientes das amostras alimentares, clínicas e de fezes de animais. Assim como o cálculo de relação presença/ausência de CRISPRs com presença/ausência de bacteriófagos (Tabela 10-13).

Dos isolados provenientes de alimentos, em 13 (92,85 %) foi observada uma relação inversa entre a presença dos CRISPRs e o fenótipo de resistência (Quadro 3). Em relação à presença dos genes *CRISPRs* e bacteriófagos  $\Phi$ FL#ABC nos isolados, foram observados 9 isolados (64,285%) que apresentavam os genes para os CRISPRs não apresentavam os genes do bacteriófago  $\Phi$ FL#ABC (Tabela 9).

	ID	CRISPRS 1/3	CRISPRS 2	bacteriófagos	Amp	Clo	Genta	Tetra
Carcassa de frango	5							
cenoura	9							
cenoura	23							
beterraba	91							
beterraba	B1			$\Phi$ FL2				
batata	C11							
batata	E1			$\Phi$ FL4				
salsicha de frango	E8							
tempero verde	G7							
Não especificado	I2							
mozzarella	T2							
carne de frango	17							
carne de frango	18							
carne de porco	E17							

**Quadro 3:** Relação dos *E. faecalis* isolados de amostras de alimentos mostrando a presença (verde) ou ausência (branco) de CRISPRs, presença (roxo) ou ausência (branco) de bacteriófagos e susceptibilidade (branco) e resistência (vermelho) aos antimicrobianos Ampicilina (Amp), Cloranfenicol (Clo), Gentamicina (Genta) e Tetraciclina (Tetra). Presença de resistência intermediária (amarelo).

**Tabela 10.** Relação entre número (porcentagens totais) com a presença ou ausência de CRISPRs e bacteriófagos em *E. faecalis* isolados de amostras de alimentos

Bacteriófago \ CRISPR	Número (%) de	
	Presença	Ausência
Presença	2 (14,285)	0
Ausência	9 (64,285)	3 (21,41)

Dos isolados provenientes de amostras clínicas, em 29 (93,54%) foi observada uma relação inversa entre a presença dos CRISPRs e o fenótipo de resistência (Quadro 4). Em relação à presença dos genes *CRISPRs* e bacteriófagos  $\Phi$ FL#ABC nos isolados, foram observadas 27 (87,09%) que apresentavam os genes para os CRISPRs e apresentavam os genes dos bacteriófago  $\Phi$ FL#ABC.

	ID	CRISPRS 1/3	CRISPRS	bacteriófag	Amp.	Clo	Genta	Tetra
urina	322			$\Phi$ FL4				
Não específica	381			$\Phi$ FL4				
urina	497			$\Phi$ FL2				
urina	507			$\Phi$ FL4				
sangue	510			$\Phi$ FL2/4				
Não específica	522			$\Phi$ FL2				
Não específica	525							
cateter	555			$\Phi$ FL2/4				
urina	570			$\Phi$ FL4				
urina	572			$\Phi$ FL2/4				
urina	574			$\Phi$ FL2				
urina	591			$\Phi$ FL4				
urina	598			$\Phi$ FL4				
urina	599			$\Phi$ FL2/4				
urina	1251							
urina	1269			$\Phi$ FL2/4				
Não específica	1313			$\Phi$ FL2/3/4				
urina	595			$\Phi$ FL4				
urina	586			$\Phi$ FL4				
urina	617			$\Phi$ FL2/3/4				
urina	603			$\Phi$ FL4				
sec. Peritonal	606							
urina	619			$\Phi$ FL4				
urina	621			$\Phi$ FL4				
urina	632			$\Phi$ FL3/4				
urina	633			$\Phi$ FL3/4				
urina	637			$\Phi$ FL3/4				
urina	640			$\Phi$ FL2/3/4				
urina	1247			$\Phi$ FL4				
urina	1255			$\Phi$ FL3/4				
escarro	1220			$\Phi$ FL2/4				

**Quadro 4:** Relação dos *E. faecalis* isolados de amostras clínicas mostrando a presença (verde) ou ausência (branco) de CRISPRs, presença (roxo) ou ausência (branco) de bacteriófagos e susceptibilidade (branco) e resistência (vermelho) aos antimicrobianos Ampicilina (Amp), Cloranfenicol (Clo), Gentamicina (Genta) e Tetraciclina (Tetra). Presença de resistência intermediária (amarelo).

**Tabela 11.** Relação entre número (porcentagens totais) sob a presença ou ausência de CRISPRs e bacteriófagos de *E. faecalis* isolados de amostras de clínicos.

Bacteriófago \ CRISPR	Número (%) de	
	Presença	Ausência
Presença	27 (87,096)	1 (3,225)
Ausência	3 (9,677)	0

Dos isolados provenientes de fezes de tartaruga, em 9 (100 %) foi observada uma relação inversa entre a presença dos CRISPRs e o fenótipo de resistência (Quadro 5). Em relação à presença dos genes *CRISPRs* e bacteriófagos  $\Phi$ FL#ABC nos isolados, não apresentavam os genes *gp26*, *gp48*, *gp35* do bacteriófago  $\Phi$ FL#ABC.

	ID	CRISPR 1	CRISPR 2	bacteriófagos	Amp	Clo	Genta	Tetra
fezes de tartaruga	T1-1							
fezes de tartaruga	T2-4							
fezes de tartaruga	T5-1							
fezes de tartaruga	T5-2							
fezes de tartaruga	T6-4							
fezes de tartaruga	T6-14							
fezes de tartaruga	T7-20							
fezes de tartaruga	T8-1							
fezes de tartaruga	T8-4							

**Quadro 5:** Relação dos *E. faecalis* isolados de amostras de fezes de tartaruga mostrando a presença (verde) ou ausência (branco) de CRISPRs, presença (roxo) ou ausência (branco) de bacteriófagos e susceptibilidade (branco) e resistência (vermelho) aos antimicrobianos Ampicilina (Amp), Cloranfenicol (Clo), Gentamicina (Genta) e Tetraciclina (Tetra).

Dos isolados provenientes de fezes de pinguins, em 5 (100 %) foi observada uma relação inversa entre a presença dos CRISPRs e o fenótipo de resistência (Quadro 6). Em relação à presença dos genes *CRISPRs* e bacteriófagos  $\Phi$ FL#ABC nos isolados, não apresentavam os genes *gp26*, *gp48*, *gp35* do bacteriófago  $\Phi$ FL#ABC.

	ID	CRISPR 1	CRISPR 2	bacteriófagos	Amp	Clo	Genta	Tetra
fezes de pinguim	P2-1							
fezes de pinguim	P5-5							
fezes de pinguim	P5-6							
fezes de pinguim	P8-9							
fezes de pinguim	P9-1							

**Quadro 6:** Relação dos *E. faecalis* isolados de amostras de fezes de pinguins mostrando a presença (verde) ou ausência (branco) de CRISPRs, presença (roxo) ou ausência (branco) de bacteriófagos e susceptibilidade (branco) e resistência (vermelho) aos antimicrobianos Ampicilina (Amp), Cloranfenicol (Clo), Gentamicina (Genta) e Tetraciclina (Tetra).

Dos isolados provenientes de cloacas de frangos, em 15 (100%) foi observada uma relação inversa entre a presença dos CRISPRs e o fenótipo de resistência (Quadro 7). Em relação á presença dos genes *CRISPRs* e bacteriófagos  $\Phi$ FL#ABC nos isolados, foi observado que 1 (6,66%) apresentou os genes para os CRISPRS e foram positivos para o bacteriófago  $\Phi$ FL#ABC.

	ID	CRISPR 1	CRISPR 2	bacteriófagos	Amp.	Clo	Genta	Tetra
cloaca de frango	8							
cloaca de frango	13							
cloaca de frango	39							
cloaca de frango	88							
cloaca de frango	98							
cloaca de frango	103							
cloaca de frango	114							
cloaca de frango	198							
cloaca de frango	203							
cloaca de frango	206							
cloaca de frango	247							
cloaca de frango	249							
cloaca de frango	272							
cloaca de frango	292							
cloaca de frango	387			$\Phi$ FL3				

**Quadro 7:** Relação dos *E. faecalis* isolados de amostras de cloacas de frango mostrando a presença (verde) ou ausência (branco) de CRISPRs, presença (roxo) ou ausência (branco) de bacteriófagos e susceptibilidade (branco) e resistência (vermelho) aos antimicrobianos Ampicilina (Amp), Cloranfenicol (Clo), Gentamicina (Genta) e Tetraciclina (Tetra). Presença de resistência intermediária (amarelo).



**Tabela 12.** Relação entre número (porcentagens totais) sob a presença ou ausência de CRISPRs e bacteriófagos em *E. faecalis* isolados de amostras de cloaca de frango.

Bacteriófago \ CRISPR	Número (%) de	
	Presença	Ausência
Presença	1 (6,66)	0
Ausência	14 (93,33)	0

Dos isolados provenientes de fezes de Leões Marinhos, em 12 (100%) foi observada uma relação inversa entre a presença dos CRISPRs e o fenótipo de resistência (Quadro 8). Em relação a presença dos genes *CRISPRs* e bacteriófagos  $\Phi$ FL#ABC nos isolados, Em relação entre a presença dos genes *CRISPRs* e bacteriófagos  $\Phi$ FL#ABC foi de 6 (50%) que apresentavam os genes para os CRISPRs e apresentavam os genes dos bacteriófago  $\Phi$ FL#ABC.

	ID	CRISPR 1	CRISPR 2	bacteriófagos	Tetra	Clo	Genta	Tetra
fezes de leão marinho	L1			$\Phi$ FL3				
fezes de leão marinho	L3			$\Phi$ FL3				
fezes de leão marinho	L6							
fezes de leão marinho	L9			$\Phi$ FL4				
fezes de leão marinho	B2							
fezes de leão marinho	B9			$\Phi$ FL3				
fezes de leão marinho	E20							
fezes de leão marinho	B5							
fezes de leão marinho	B10							
fezes de leão marinho	B15							
fezes de leão marinho	D1			$\Phi$ FL3				
fezes de leão marinho	D7			$\Phi$ FL3				

**Quadro 8:** Relação dos *E. faecalis* isolados de amostras de fezes de leão marinho mostrando a presença (verde) ou ausência (branco) de CRISPRs, presença (roxo) ou ausência (branco) de bacteriófagos e susceptibilidade (branco) e resistência (vermelho) aos antimicrobianos Ampicilina (Amp), Cloranfenicol (Clo), Gentamicina (Genta) e Tetraciclina (Tetra).

**Tabela 13.** Relação entre número (porcentagens totais) sob a presença ou ausência de CRISPRs e bacteriófagos em *E. faecalis* isolados de amostras de fezes de leão marinho.

CRISPR Bacteriófago	Número (%) de	
	Presença	Ausência
Presença	6 (50)	0
Ausência	6 (50)	0

### 5.5. Relação CRISPRs e genes de resistência e virulência

Realizaram-se dois diagramas relacionando os isolados testados para os genes *CRISPRs* em amostras alimentares e clínicas (Quadros 9 e 10) com informação obtida de genes de resistência aos antibióticos e virulência.

Dos isolados provenientes de amostras alimentos, em 13 (92,85 %) não foi observada uma relação entre a presença dos genes *CRISPRs* e os genes de resistência e virulência (Quadro 9).

	ID	CRISPRS 1/3	CRISPRS 2	Genes de Resistência			Genes de virulência			
				<i>tetM</i>	<i>tetL</i>	<i>ermB</i>	<i>gelE</i>	<i>esp</i>	<i>agg</i>	<i>ace</i>
Carcassa de frango	5									
cenoura	9									
cenoura	23									
beterraba	91									
beterraba	B1									
batata	C11									
batata	E1									
salsicha de frango	E8									
tempero verde	G7									
Não especificado	I2									
mozzarella	T2									
carne de frango	17									
carne de frango	18									
carne de porco	E17									

**Quadro 9:** Relação dos *E. faecalis* isolados de amostras de alimentos mostrando a presença (verde) ou ausência (branco) de CRISPRs, presença (azul) ou ausência (branco) de genes de resistência *tetM*, *tetL*, *ermB* e presença (amarelo) ou ausência (branco) de genes de virulência *gelE*, *esp*, *agg* e *ace*.

Dos isolados provenientes de amostras clínicas, em 29 (93,54%) não foi observada uma alguma relação entre a presença dos CRISPRs e os genes de resistência e virulência (Quadro 10).

	ID	CRISPRS 1/3	CRISPRS 2	Genes de Resistência			Genes de virulência			
				<i>tetM</i>	<i>tetL</i>	<i>ermB</i>	<i>gelE</i>	<i>esp</i>	<i>agg</i>	<i>ace</i>
urina	322									
urina	497									
urina	507									
sangue	510									
Não especificad	522									
cateter	555									
urina	570									
urina	572									
urina	574									
urina	591									
urina	598									
urina	599									
urina	1251									
urina	1269									
Não especificad	1313									
urina	595									
urina	586									
urina	617									
urina	603									
sec. Peritonia	606									
urina	619									
urina	621									
urina	632									
urina	633									
urina	637									
urina	640									
urina	1247									
urina	1255									
escarro	1220									

**Quadro 10:** Relação dos *E. faecalis* isolados de amostras clínicas mostrando a presença (verde) ou ausência (branco) de CRISPRs, presença (azul) ou ausência (branco) de genes de resistência *tetM*, *tetL*, *ermB* e presença (amarelo) ou ausência (branco) de genes de virulência *gelE*, *esp*, *agg* e *ace*.

### 5.5. Relação bacteriófagos e genes de resistência e virulência

Realizaram-se dois diagramas relacionando às amostras testadas para bacteriófagos em amostras alimentares e clínicas (Quadros 11 e 12) com informação obtida de genes de resistência aos antibióticos e virulência.

Dos isolados provenientes de alimentos, em 11 de 13 (84,61%) não foi observada uma relação entre a presença dos genes de bacteriófagos e os genes de resistência e virulência (Quadro 11).

	ID	bacteriófagos	Genes de Resistência			Genes de virulência			
			<i>tetM</i>	<i>tetL</i>	<i>ermB</i>	<i>gelE</i>	<i>esp</i>	<i>agg</i>	<i>ace</i>
Carcassa de frango	5								
cenoura	9								
cenoura	23								
beterraba	91								
beterraba	B1	ΦFL2							
batata	C11								
batata	E1	ΦFL4							
salsicha de frango	E8								
tempero verde	G7								
Não especificado	I2								
mozzarella	T2								
carne de frango	17								
carne de frango	18								
carne de porco	E17								

**Quadro 11:** Relação dos *E. faecalis* isolados de amostras de alimentos mostrando a presença (roxo) ou ausência (branco) de bacteriófago, presença (azul) ou ausência (branco) de genes de resistência *tetM*, *tetL*, *ermB* e presença (amarelo) ou ausência (branco) de genes de virulência *gelE*, *esp*, *agg* e *ace*.

Dos isolados provenientes de amostras clínicas, em 2 de 29 (6,89%) não foi observada uma relação entre a presença dos genes de bacteriófagos e os genes de resistência e virulência (Quadro 12).

	Fonte	Bacteriófago	Genes de Resistência			Virulência			
			<i>tetM</i>	<i>tetL</i>	<i>ermB</i>	<i>gelE</i>	<i>esp</i>	<i>agg</i>	<i>ace</i>
322	urina								
497	urina								
507	urina								
510	sangue								
522									
555	cateter								
570	urina								
572	urina								
574	urina								
591	urina								
598	urina								
599	urina								
1251	urina								
1269	urina								
1313									
595	urina								
586	urina								
617	urina								
603	urina								
606	sec. Peritonial								
619	urina								
621	urina								
632	urina								
633	urina								
637	urina								
640	urina								
1247	urina								
1255	urina								
1220	escarro								

**Quadro 12:** Relação dos *E. faecalis* isolados de amostras clínicas mostrando a presença (roxo) ou ausência (branco) de bacteriófago, presença (azul) ou ausência (branco) de genes de resistência *tetM*, *tetL*, *ermB* e presença (amarelo) ou ausência (branco) de genes de virulência *gelE*, *esp*, *agg* e *ace*.

## 6. DISCUSSÃO

6.1. Detecção dos genes *CRISPR1-Cas*, *CRISPR2* e *CRISPR3-Cas* em *E. faecalis* e *E. faecium* isolados de amostras de animais, clínicos e alimentares.

No presente estudo, o gene *CRISPR1-Cas* foi detectado com maior frequência nos isolados de *E. faecalis* (59,18%) quando comparado com os isolados de *E. faecium* (7,27 %). *E. faecalis* também apresentou mais frequentemente os genes *CRISPR2* (88,7 % e 32,72 %) e *CRISPR3-Cas* (13,26% e 1,81 %).

Em relação à origem dos isolados, pode se observar que os *E. faecalis* provenientes de amostras clínicas apresentaram a maior frequência de *CRISPR1-Cas*, *CRISPR2* e *CRISPR3-Cas*, quando comparado com isolados recuperados de amostras de alimentos e animais. Em relação à *E. faecium*, os genes *CRISPR1-Cas* e *CRISPR3-Cas* foram detectados em menor quantidade em amostras de alimentos e animais, respectivamente. O gene *CRISPR2* foi detectado com baixa frequência em todos os grupos de isolados avaliados. A amplificação do gene *CRISPR2* origina produtos de tamanhos variáveis devido ao número de sequências repetidas e sequências espaçadoras presentes no arranjo (Katyal *et al.*, 2013).

Até momento, existem poucos estudos avaliando a incidência dos genes *CRISPRs* em isolados de enterococos (Palmer & Gilmore, 2010; Katyal *et al.*, 2013; Lyons *et al.*, 2015). Palmer & Gilmore (2010) realizaram um estudo para detectar a presença dos genes *CRISPRs* em isolados de *E. faecalis* provenientes de amostras clínicas. Os autores observaram que todos os isolados eram positivos (100%) para o *CRISPR2* e 33% positivos para os *CRISPR1-Cas* e *CRISPR3-Cas*.

Por outro lado, em *E. faecium* foram encontrados sequências tipo *CRISPR1-cas* (EfmCRISPR1-cas) em 37,5% dos isolados clínicos humanos. Para este estudo, os resultados foram diferentes porque os isoaldos eram de origem alimentar e fezes de animais, considerando diferentes ambientes.

Em 2013, Katyal e colaboradores, realizaram um estudo buscando detectar a presença dos genes *CRISPRs* em *E. faecalis* e *E. hirae* isolados de fezes de suíno e observaram que 95% (84/88) dos isolados de *E. faecalis* eram

positivos para o *CRISPR2*, 52 %(46/88) para o *CRISPR1-Cas* e nenhum isolados apresentou o *CRISPR3-Cas*. Os genes *CRISPRs* foram detectados com mais frequência nos isolados de *E. faecalis* quando comparado com *E. hirae*.

Em 2015, Hullahalli e colaboradores, efetuaram um estudo em computador da presença do gene *CRISPR2* em 228 genomas de *E. faecalis* em relação a linhagens filogenéticas de subespécies. Nesse trabalho foram encontrados 15/228 de sequências *CRISPR1-cas*, e ausência do *CRISPR3-cas*. Eles encontraram 710 sequências espaçadoras tipo *CRISPR2* conservadas, que segundo os autores, poderiam ser empregadas para a caracterização filogenéticas de linhagens em *E. faecalis*. Algumas sequências espaçadoras mostram configurações notáveis em várias linhagens de bactérias. Por outra parte, acredita-se que este locus poderia ter funções de regulação de RNA não codificante (Price *et al.*, 2016)

Em 2015, Lyons e colaboradores, fizeram um estudo para detectar e caracterizar a presença do gene *cas1*, o qual está associado universalmente aos 3 sistemas *CRISPRs*, em amostras ambientais e de animais. Entre os resultados obtidos detectou-se 32,7% de frequência do gene nas cepas de enterococos estudados provenientes de ambiente, sendo *E. hirae* a espécie com a maior frequência do gene encontrada em comparação com as outras espécies. O estudo sugere que poderia existir algum tipo de custo/benefício a presença ou ausência de *CRISPRs* no ambiente para adaptação das bactérias a determinados habitat.

6,2 Detecção dos genes dos bacteriófagos em *E. faecalis* isolados de amostras de animais, clínicos e alimentares.

Existe evidência de detecção e isolamento de bacteriófagos de diversas enterobactérias comensais para humanos e animais (Rogers & Sarles, 1963; Caprioli & Kasatiya, 1975; Nigutová *et al.*, 2008). Estes bacteriófagos têm a habilidade de invadir bactérias de *E. faecalis* e *E. faecium* (Caprioli & Kasatiya, 1975). Rogers & Sarles em 1963, isolaram bacteriófagos de enterococos provenientes de trato de gastrointestinal de roedores.

Atualmente, existem estudos que reconhecem a variedade de fagos lisogênicos em *E. faecalis* isolados de diferentes ambientes como esgoto, corpos



de água, tratos gastrointestinais e fezes de animais (Rogers & Sarles, 1963; Mazaheri *et al.*, 2010; Horiuchi *et al.*, 2012; Lee & Park, 2012; Otawa *et al.*, 2012; Parasion *et al.*, 2012). Em outras espécies como *E. casseliflavus* e *E. gallinarum* tem se encontrado elementos tipo-fago no genoma (Palmer *et al.*, 2010). Existe evidência de que fagos novos possuem a capacidade de infectar estas bactérias (Mazaheri & Heuzenroeder, 2010; Purnell *et al.*, 2011).

No presente estudo não foi detectada a presença dos bacteriófagos SAP6, IME-EF1, VD13, F4 e BC-611 em isolados de *E. faecalis*. Uma explicação para este resultado seria o fato de que esses fagos são líticos e como o DNA empregado era proveniente de bactérias vivas, poderia ser a razão pela qual eles não estivessem presentes nos isolados. Devido à natureza lítica de 3/4 bacteriófagos, poderia se considerar que a metodologia empregada de PCR foi limitada. Para os bacteriófagos  $\Phi$ FL2AB,  $\Phi$ FL3AB e  $\Phi$ FL4A foram observadas frequências de 15,11 %, 15,11 % e 32,55 %, dos genes respectivamente nos isolados de *E. faecalis*. Em relação ao  $\Phi$ FL1AB como não houve a amplificação do fragmento de DNA de massa molecular esperada, apesar de terem sido realizados diversos ajustes nas reações de PCR e como não havia um controle positivo para o presente gene, os resultados foram definidos como inconclusivos.

Os bacteriófagos  $\Phi$ FL2AB e  $\Phi$ FL4A, de acordo com os resultados obtidos neste estudo foram detectados em *E. faecalis* de origem alimentar e clínico. Já o bacteriófago  $\Phi$ FL3AB estava presente em isolados de origem animal e clínico. No trabalho de Yasmin *et al.* (2010), estes bacteriófagos foram relacionados como potenciais agentes carregadores de genes virulência. Para o estudo, foram utilizados 47 isolados de amostras clínicas com *E. faecalis*, obtiveram-se 34 fagos e depois foram classificados e caracterizados molecularmente. Na atualidade, existem escassos estudos sob incidência destes bacteriófagos em *E. faecalis* isolados de amostras de origem ambiental e clínico.

Uma característica deste grupo de bacteriófagos foi descrita utilizando genômica comparada com o bacteriófago *Pb1A* de *Streptococcus mitis*. O grupo  $\Phi$ FL#ABC tem a capacidade de codificar uma proteína homologa de ligação que poderia ser uma via para adesão às células (Bensing *et al.*, 2001; Mitchell &

Sullam, 2009). Em 2011, Solheim *et al.*, realizaram um estudo de genômica comparada para bactérias *E. faecalis* associadas a ambiente hospitalar, aonde foram encontrados múltiplas elementos transferidos entre bacterias. Estes apresentaram 51 genes associados a fagos.

6.3 Relação presença dos genes *CRISPRs*, *ΦFL2AB*, *ΦFL3AB* e *ΦFL4A* com genótipo e fenótipo de resistência dos isolados de *Enterococcus faecalis* provenientes de amostras de animais, clínicos e alimentares.

6.3.1 Relação CRISPRS, bacteriófagos e fenótipo.

A relação entre presença de CRISPRs com resistência a antibióticos foi estudada por Palmer & Gilmore (2010), na qual a presença de CRISPRs em isolados clínicos pudesse reduzir ou bloquear a presença de elementos gênicos móveis, os quais teriam a possibilidade de carregar genes relacionados a resistência antibióticos e determinantes de virulência. No presente estudo, a relação entre a presença de CRISPRs e ausência de genes de bacteriófagos em amostras de alimentos e animais foi inversamente proporcional. Por outro lado, a relação entre a presença de CRISPRs e presença de genes de bacteriófagos em isolados de amostras clínicas foi diretamente proporcional. Estes resultados para os *E. faecalis* isolados de amostras clínicos foram diferente dos observados por Palmer & Gilmore (2010). Então, para certificar que a metodologia estava correta, foram selecionados aleatoriamente 15 isolados clínicos que foram cultivados em meio BHI, submetidos à extração de DNA e a uma nova reação da PCR para o gene *CRIPRS1-Cas* e todos os isolados selecionados apresentaram os mesmos resultados anteriormente observados. Dessa forma, a metodologia empregada estava correta. Uma hipótese então levantada para explicar os resultados seria que, apesar dos *E. faecalis* terem sido isolados de diferentes pacientes, todas eram provenientes do mesmo hospital e do mesmo período do ano, podendo os isolados serem clones hospitalares com pequenas diferenças fenotípicas e genotípicas.

Palmer & Gilmore em 2010, realizaram o estudo comparativo de CRISPRs provenientes de bactérias de origem clínica com genes de resistência como *aph2*, *erm*, *cat*, *tetM*, *tetL*, *blaz* e *van A/B*.

Para avaliar a presença de CRISPRs de isolados de animais ou clínicos com genes de virulência *gelE*, *esp*, *agg* e *ace*, existe carência estudos devido a complexidade do tema. Neste estudo, a presença de CRISPRs em isolados alimentares e clínicos e genes de virulência foram pouco conclusivos porque existe presença de um ou vários genes de virulência com a presença de CRISPRs e bacteriófagos.

A resistência aos antibióticos tem se relacionado com mutações espontâneas ou adquiridas pela incorporação de genes (Lupo *et al.*, 2012). Estes últimos utilizam plataformas genéticas conhecidas como elementos genéticos móveis, entre os quais encontram-se os plasmídeos, transposones, integrões e bacteriófagos (Zhang *et al.*, 2009). Os bacteriófagos possuem a capacidade de carregar elementos móveis em bactérias Gram-positivas (Ubukata *et al.*, 1975; Schuch *et al.*, 2006; Mazaheri *et al.*, 2011; Varga *et al.*, 2012). Existe a probabilidade que alguns fagos tenham a capacidade de levar estes elementos genéticos a ambientes, além do hospitalar, como água contaminada com fezes (Zhang *et al.*, 2009). A detecção de elementos genéticos móveis nos bacteriófagos provenientes de ambientes contaminados com fezes levanta a evidência de que os fagos são transportadores destes elementos (Muniesa *et al.*, 2004; Colomer-Lluch *et al.*, 2011)

Para este estudo, a relação do grupo de bacteriófagos  $\Phi$ FL#ABC com genes de resistência e virulência não teve relação direta entre os *E. faecalis* em isolados de animais, alimentos e clínicos. Com base nos resultados, a presença de um maior número de sequências de bacteriófagos e características genotípicas (genes) e fenotípicas foram observadas nos isolados de ambiente hospitalar, o que poderia incrementar a aquisição elementos genéticos relacionados à resistência a antibióticos, devido a maior pressão de seleção do ambiente hospitalar (Leclercq *et al.*, 1988; Murray *et al.*, 1988; Uttley *et al.*, 1989; Arthur *et al.*, 1993; Palmer & Gilmore, 2010; Liu *et al.*, 2013; Clewell *et al.*, 2014).

## 6. CONCLUSÕES

Foi identificada a presença dos genes *CRISPRs* em *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* a partir de isolados de amostras clínicas, alimentares e de fezes de animais;

Foi detectada a presença dos genes dos bacteriófagos  $\Phi$ FL2AB,  $\Phi$ FL3AB e  $\Phi$ FL4A em *Enterococcus faecalis* a partir de isolados de amostras clínicas, alimentares e de fezes de animais.

## 7. PERSPECTIVAS

Analisar o perfil de expressão de genes dos CRISPR1 e CRISPR3 relacionados com DNA exógeno.

Identificar possíveis mecanismos de funcionalidade entre CRISPR1-CRISPR2 e CRISPR1-CRISPR3.

Realizar estudos que relacionem CRISPRs com plasmídeos relacionados a resistência a antibióticos.

Analisar o nível de expressão gênica de Proteínas cas presentes em diferentes CRISPRs de *E. faecalis*.

Detectar a presença de bacteriófagos específicos para *E. faecium*.

Realizar um estudo que relacione as principais espécies de *Enterococcus* com CRISPRs, bacteriófagos, plasmídeos e explique mecanismos de defesa.

Realizar estudos de presença molecular do CRISPR4 e identificar as possíveis Proteínas Cas funcionais.

## 8. REFERENCIAS

- Ackermann HW. 2003. Bacteriophage observations and evolution. *Res. Microbiol.* 154, pp, 245–251.
- Ackermann HW. 2007. 550 phages examined in the electron microscope. *Arch Virol* 152, pp. 227-243,.
- Adriaenssens et al. 2015. Integration of genomic and proteomic analyses in the classification of the Siphoviridae family. *Virology* 447. pp. 144-154.
- Arthur M, Molinas C, Depardieu F, Courvalin P. 1993. Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *J Bacteriol* 175, pp.117–127.
- Arias CA, Murray BE. 2012. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol* 10, pp. 266–278.
- Andrewes F & Horder TJ. 1906. A study of the streptococci pathogenic for man. *Lancet* V. ii, pp.708-13.
- Bensing BA, Siboo IR & Sullam PM. 2001. Proteins PblA and PblB of *Streptococcus mitis*, which promote binding to human platelets, are encoded within a lysogenic bacteriophage. *Infect Immun.* 69(10), pp. 6186–6192.
- Bonacina et al. 2016. A genomic view of food-related and probiotic *Enterococcus* strains. *Dna Research* pp. 1-14.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A., Horvath, P. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* (315), pp. 1709–1712.
- Barrangou R & Marraffini LA. 2014. CRISPR-Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Mol Cell* 54, pp. 234–244.
- Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A., Ehrlich, S.D. 2005. Clustered Regularly Interspaced Short Palindrome Repeats (Crisprs) Have Spacers Of Extrachromosomal Origin. *Microbiology* 151, pp. 2551–2561.
- Byappanahalli MN, Nevers MB, Korajkic A, Staley ZR, Harwood VJ. 2012. *Enterococci in the Environment. Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR.* 76(4) pp. 685-706
- Bourgogne, A., et al. 2008. Large scale variation in *Enterococcus faecalis* illustrated by the genome analysis of strain OG1RF. *Genome Biol.* 9, R110.
- Brock TD. 1964. Host Range of Certain Virulent and Temperate Bacteriophages Attacking Group D Streptococci. *J Bacteriol* 88(1), pp. 165–171.

- Caprioli T, Zaccour F, & Kasatiya SS. 1975. Phage typing scheme for group D streptococci isolated from human urogenital tract. *J Clin Microbiol.* 2(4), pp.. 311–317.
- Colomer-Lluch M, Imamovic L, Jofre J, Muniesa M. 2011. Bacteriophages carrying antibiotic resistance genes in fecal waste from cattle, pigs, and poultry. *Antimicrob. Agents Chemother.* (55), pp. 4908–4911.
- Clewell DB, Weaver KE, Dunny GM, Coque TM, Francia MV, Hayes F. 2014. Extrachromosomal and mobile elements in enterococci: transmission, maintenance, and epidemiology. In Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N (ed), *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection.* Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston.
- Clark PF & Clark AS. 1927. A bacteriophage active against a virulent hemolytic *Streptococcus*. *Proc Soc Exp Biol Med* 24(7), pp. 635–639.
- Cheng, S. et al. 1997. PCR assay for identification of *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.*, 35, (5), pp.1248-1250.
- Deibel RH. 1964. The group D streptococci. *Bacteriol Rev* 28, pp. 330-66.
- Devriese LA & De Pelsmaecker K. 1987. The anal region as a main carrier site of *Staphylococcus intermedius* and *Streptococcus canis* in dogs. *Veterinary Record* 121, pp. 302–303.
- Deltcheva, E. et al. .2011. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 471, pp. 602–607.
- Donato ST. 2007. **Comparação de métodos convencionais e semi-automatizados para identificação de *Enterococcus* spp. frente à Biologia Molecular em identificações discrepantes.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica)- Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza.
- Duerkop BA, Palmer KL & Horsburgh MJ. 2014. Enterococcal Bacteriophages and Genome Defense. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary.
- Deveau, H., Barrangou, R., Garneau, J.E., Labonté, J., Fremaux, C., Boyaval, P., Romero, D.A., Horvath, P., Moineau, S. 2008. Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bacteriology* (190), pp. 1390–1400.
- 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(12), pp.5857-5860.

- Elbreki et al. 2014. A Bacteriophages and their derivatives as biotherapeutic agents in disease prevention and treatment. J Virol Article ID 382539, 20 paginas. doi:10.1155/2014/382539. Acesso em: 2016
- Evans AC. 1934. The Prevalence of Streptococcus Bacteriophage. Science 80(2063), pp. 40–41.
- Freitas AR, Novais C, Ruiz-Garbajosa P, Coque TM, Peixe L. 2009. Dispersion of multidrug-resistant Enterococcus faecium isolates belonging to major clonal complexes in different Portuguese settings. Appl Environ Microbiol (75), pp. 4904–4908.
- Garneau, J.E., Dupuis, M.E., VillioN,M., Romero, D.A., Barrangou, R., Boyaval, P., et al. 2010. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. Nature 468, pp. 67–71.
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., Siksnys, V. 2012. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. Proc.Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109 (39).
- Gilmore MS, Lebreton F, Van Schaik W. 2013. Genomic transition of enterococci from gut commensals to leading causes of multidrugresistant hospital infection in the antibiotic era. Curr Opin Microbiol. 16(1), pp. 10-6.
- Grissa, I., Vergnaud, G. & Pourcel, C. 2007. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. BMC Bioinformatics 8, (172).
- Godde, J. S. & Bickerton, A. 2006. The repetitive DNA elements called crisprs and their associated genes: evidence of horizontal transfer among prokaryotes. J mol evol 62, pp. 718-29.
- Haft, D.H., Selengut, J., Mongodin, E.F., Nelson, K.E. 2005. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. PLoS Computational Biology 1, e60
- Harper DR, Anderson J, Enright MC. 2011. Phage therapy: delivering on the promise. Ther Deliv 2, pp. 935-947.
- Horvath et al. 2009. Comparative analysis of CRISPR loci in lactic acid bacteria genomes. International Journal of Food Microbiology (131), pp. 62–70.
- Hullahalli K, Rodrigues M, Schmidt BD, Li X, Bhardwaj P, Palmer KL 2015. Comparative Analysis of the Orphan CRISPR2 Locus in 242 Enterococcus faecalis Strains. PLoS ONE 10, pp. 9.
- Horiuchi T, Sakka M, Hayashi A, Shimada T, Kimura T et al. 2012. Complete genome sequence of bacteriophage BC-611 specifically infecting Enterococcus faecalis strain NP-10011. J Virol 86, pp. 9538-9539.



- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. & Nakata, A. 1987. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol* 169, pp. 5429-33.
- Jansen, R., Van Embden, J.D., Gaastra, W., Schouls, L.M. 2002. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology* 43, pp. 1565–1575.
- Jenkins SG, Raskoshina L, Schuetz AN. 2011. Comparison of performance of the novel chromogenic spectra VRE agar to that of bile esculin azide and *Campylobacter* agars for detection of Vancomycin-resistant Enterococci in fecal samples. *J Clin Microbiol* 49 (11), pp. 3947-9.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., Charpentier, E. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337 (6096), pp. 816–821.
- Kalina A. 1970. The taxonomy and nomenclature of enterococci. *Int J Syst Bacteriol* 20, pp. 185-9.
- Kandler O; Schleifer KH & Dandl R. 1968. Differentiation of *Streptococcus faecalis* Andrewes and Horder and *Streptococcus faecium* Orla-Jensen based on the amino acid composition of the murein. *J. Bacteriol*, 96, pp. 1935-1939.
- Katyal I. et al. 2013. CRISPRs of *Enterococcus faecalis* and *E. hirae* Isolates from Pig Feces Have Species-Specific Repeats But Share Some Common Spacer Sequences. *Microb Ecol* 66, pp.182-188.
- Ke, D.; Picard, F. J.; Martineau, F.; Menard, C.; Roy, P. H.; Ouellette, M.; Bergeron, M. G. 1999. Development of a PCR assay for rapid detection of Enterococci. *J. Clin. Microbiol* 37(11), pp.3497-3503.
- Kuch A, Willems RJ, Werner G, Coque TM, Hammerum AM, et al. 2012. Insight into antimicrobial susceptibility and population structure of contemporary human *Enterococcus faecalis* isolates from Europe. *J Antimicrob Chemother* (67), pp. 551–558.
- Kilpper-Baelz, R., G. Fischer, & K. H. SCHLEIFER. 1982. Nucleic acid hybridization of group N and group D streptococci. *Curr. Microbiol.* (7), pp. 245-250.
- Kon K. & Rai M. 2016. Antibiotic Resistance: Mechanisms and New Antimicrobial Approaches. ISBN-13: 978-0128036426
- Krishnamurthy SR, Janowski AB, Zhao G, Barouch D, Wang D. 2016. *Hyperexpansion of RNA Bacteriophage Diversity*. *PLoS Biol* 14(3)
- Lam M. M. et al. 2012. *Comparative Analysis of the First Complete Enterococcus faecium Genome*. *Journal of Bacteriology*. n. 94, pp. 2334–2341.

- Lebreton F, Willems RJL, Gilmore MS. 2014. *Enterococcus* Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. 2014 Feb 2. In: Gilmore MS, CLEWELL DB, IKE Y, ET AL., editors. Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary.
- Leavis HL, Bonten MJM, Willems RJL. 2006. Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol*
- Leavis HL, Willems RJL, Van Wamel WJB, Schuren FH, Caspers MPM, Bonten MJM. 2007. Insertion sequence-driven diversification creates a globally dispersed emerging multiresistant subspecies of *E. faecium*. *PLoS Pathog*
- Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. 1988. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med* 319, pp. 157–161.
- Lee YD & Park JH. 2012. Complete genome sequence of enterococcal bacteriophage SAP6. *J Virol* 86: pp. 5402-5403.
- Lillestøl, R. K., Redder, P., Garrett, R. A. & Brügger, K. 2006. A putative viral defence mechanism in archaeal cells. *Archaea* 2, pp. 59-72.
- Liu Y, Wang Y, Schwarz S, Li Y, Shen Z, Zhang Q, Wu C, Shen J. 2013. Transferable multiresistance plasmids carrying *cfr* in *Enterococcus* spp. from swine and farm environment. *Antimicrob Agents Chemother* 57, pp. 42–48.
- Lupo A, Coyne S, & Berendonk TU. 2012. Origin and evolution of antibiotic resistance: the common mechanisms of emergence and spread in water bodies. *Front. Microbiol.* 3 (18).
- Lyons et al. 2015. Incidence of Type II CRISPR1-Cas Systems in *Enterococcus* Is Species-Dependent. *PLoS ONE* 10(11): e0143544. doi:10.1371/journal.pone.0143544.
- Makarova, K.S., Grishin, N.V., Shabalina, S.A., Wolf, Y.I., Koonin, E.V. 2006a. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biology Direct* 1, pp. 1–26.
- Makarova, K.S et al. 2006b. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, pp. 15611–15616.
- Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mojica FJ, Wolf YI, Yakunin AF, Van Der Oost J, Koonin EV. 2011. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, pp. 467–477.

- Matos RC, Lapaque N, Rigottier-Gois L, Debarbieux L, Meylheuc T, et al. 2013. Enterococcus faecalis Prophage Dynamics and Contributions to Pathogenic Traits. PLoS Genet 9(6).
- Mazaheri R, Barton MD & Heuzenroeder MW. 2010. Novel Bacteriophages in Enterococcus spp. Curr Microbiol. 60(6), pp. 400–406.
- Mazaheri R, Barton MD & Heuzenroeder MW. 2011. Bacteriophage-mediated transduction of antibiotic resistance in Enterococci. Lett. Appl. Microbiol. 52, pp. 559–564.
- Medeiros AL et al, 2017. Enterococcus species diversity in fecal samples of wild marine species as determined by real-time PCR. Canadian Journal of Microbiology 63(2), pp. 129-136.
- Mitchell J, & Sullam PM. 2009. Streptococcus mitis phage-encoded adhesins mediate attachment to  $\alpha$ 2-8-linked sialic acid residues on platelet membrane gangliosides. Infect Immun. 77(8), pp. 3485–3490.
- Morrison D, Woodford N, Cookson B. 1997. Enterococci as emerging pathogens of humans. Soc Appl Bacteriol Symp Ser 26, pp. 89S-99S.
- Mojica et al. 1993. Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified *Pst1* sites. Mol. Microbiol 9, pp. 613-621.
- Mojica, F. J., Díez-Villasenor, C., Soria, E. & Juez, G. 2000. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. Mol Microbiol 36, pp. 244-6.
- Mojica, F.J., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., Soria, 2005. E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. Journal of Molecular Evolution 60, pp. 174–182.
- Morowitz MJ, Deneff VJ, Costello EK, Thomas BC, Poroyko V, Relman DA, Et Al. 2010. Strain-resolved community genomic analysis of gut microbial colonization in a premature infant. Proc Natl Acad Sci U S A. 108, pp. 1128–1133.
- Muniesa M, García A, Miró E, Mirelis B, Prats G, Jofre J, Navarro F. 2004. Bacteriophages and diffusion of beta-lactamase genes. Emerg. Infect. Dis. 10, pp. 1134–1137.
- Murray BE, An FY, Clewell DB. 1988. Plasmids and pheromone response of the beta-lactamase producer *Streptococcus (Enterococcus) faecalis* HH22. Antimicrob Agents Chemother 32, pp. 547–551.
- Nallapareddy SR, Wenxiang H, Weinstock GM, Murray BE. 2005. Molecular characterization of a widespread, pathogenic, and antibiotic resistance-

receptive *Enterococcus faecalis* lineage and dissemination of its putative pathogenicity island. *J Bacteriol* (187), pp. 5709–5718.

MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY ON-LINE. Columbia: University of South Carolina; c2000-06 [(atualizada em 2017 Janeiro 16). Disponível em: <http://pathmicro.med.sc.edu/mayer/phage.html>. Acesso em 2017 Janeiro 18]

Naser et al. 2005. Phylogeny and Identification of Enterococci by *atpA* Gene Sequence Analysis. *Journal of clinical microbiology* 45 (5), pp. 2224–2230.

Nakata, A., Amemura, M. & Makino, K. 1989. Unusual nucleotide arrangement with repeated sequences in the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *J Bacteriol* 171, pp. 3553-6.

Nelson, D. 2004. Phage taxonomy: we agree to disagree. *J.Bacteriol.*186, pp. 7029-- 7031.

Nishimasu, H. et al. 2014. Crystal structure of cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell* 156, pp. 935–949.

Novick RP, Christie GE, Penades JR. 2010. The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria. *Nat Rev Microbiol* 8 (8), pp. 541–551.

Nigutová K. et al. 2008. Partial Characterization of *Enterococcus faecalis* Bacteriophage F4. *Folia Microbiol.* 53(3), pp. 234–236.

Nigutová K, Styriak I, Javorský P, Pristas P. 2008. Partial characterization of *Enterococcus faecalis* bacteriophage F4. *Folia Microbiol (Praha)* 53(3) pp. 234–23.

Otawa K, Hirakata Y, Kaku M, & Nakai Y. 2012. Bacteriophage control of vancomycin-resistant enterococci in cattle compost. *J Appl Microbiol.*113(3), pp. 499–507.

Palmer KL & Gilmore MS. 2010. Multidrug-resistant enterococci lack CRISPR-cas. *MBio* 1, (4).

Palmer KL et al. 2012. Comparative genomics of enterococci: variation in *Enterococcus faecalis*, clade structure in *E. faecium*, and defining characteristics of *E. gallinarum* and *E. casseliflavus*. *mBio* (3), e00318–00311

Palmer KL, Van Schaik W, Willems RJL, et al. 2014. Enterococcal Genomics. 2014 Feb 8. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, et al., editors. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary.

Paulsen, I. T. et al. 2003. Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin resistant *Enterococcus faecalis*. *Science* (299), pp. 2071–2074.

- Parasion S, Kwiatek M, Mizak L, Gryko R, Bartoszcze M, Kocik J. 2012. Isolation and characterization of a novel bacteriophage  $\phi$ 4D lytic against *Enterococcus faecalis* strains. *Curr Microbiol.* 65(3), pp. 284–289.
- Pourcel, C., Salvignol, G. & Vergnaud, G. 2005. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology* 151, pp. 653–63.
- Purnell SE, Ebdon JE, Taylor HD. 2011. Bacteriophage lysis of *Enterococcus* host strains: a tool for microbial source tracking? *Environ Sci Technol.* 45(24), pp. 10699–10705.
- Price VJ, Huo W, Sharifl A, Palmer KL. 2016. CRISPR-Cas and restriction-modification act additively against conjugative antibiotic resistance plasmid transfer in *Enterococcus faecalis*. *mSphere* 1(3).
- Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, et al. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464, pp. 59–65.
- Rogers CG & Sarles WB. 1963. Characterization of *Enterococcus* Bacteriophages from the Small Intestine of the Rat. *J Bacteriol* 85(6), pp.1378–1385.
- Shankar, N., A. S. B & Gilmore MS. 2002. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature* (417), pp. 746 –750.
- Shariat N. & Dudley EG. 2014. CRISPRs: Molecular signatures used for pathogen subtyping. *Appl Environ Microbiol* 80, pp. 430–439.
- Sahm DF, Kissinger J, Gilmore MS, Murray PR, Mulder R, et al. 1989. In vitro susceptibility studies of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* (33), pp. 1588–1591.
- Sherman JM. 1938. The enterococci and related streptococci. *Journal of Bacteriology.*35(2), pp. 81–93
- Semedo-Lemsaddek T, Mato R.2011. Pathogenesis and Virulence. In Semedo-Lemsaddek T., Barreto Crespo M.T., Tenreiro R. (Ed.) *Enterococcus* and Safety, Nova Science Publisher, New York, In Press.
- Solheim M, Brekke MC, Snipen LG, Willems RJ, Nes IF, et al. 2011. Comparative genomic analysis reveals significant enrichment of mobile genetic elements

and genes encoding surface structure-proteins in hospital-associated clonal complex 2 *Enterococcus faecalis*. *BMC Microbiol* 11 (3)

- Sorek, R., Kunin, V., Hugenholz, P. 2008. CRISPR—a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nature Reviews Microbiology* 6, pp.181–186.
- Schleifer KH & Kilpper-Baelz R. 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* norn. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov *Journal of Systematic Bacteriology* Jan, pp. 31-34.
- Schleifer, KH & Kandler, 1972. O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* 36, pp. 407-477.
- Sievert DM, Ricks P, Edwards JR, Schneider A, Patel J, Srinivasan A, et al. 2013. 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* 34, pp.1–14.
- Sternberg SH & Doudna JA. 2015. Expanding the biologist’s toolkit with CRISPR-Cas9. *Mol. Cell* 58, pp.568–74.
- Stephens, PRS, et al. 2009. *Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde*. Rio de Janeiro, EPSJV, IOC p.125-220.
- Styriak I., Spanová A., Montágová H., Kmet V. 1994. Isolation and Characterization of a new ruminal bacteriophage lytic to a *Streptococcus bovis*. *Curr. Microbiol.* 28, pp. 355-358.
- Schuch R, & Fischetti VA. 2006. Detailed genomic analysis of the beta and gamma phages infecting *Bacillus anthracis*: implications for evolution of environmental fitness and antibiotic resistance. *J. Bacteriol.* 188, pp. 3037–3051.
- Tang, T. H. et al. 2002. Identification of 86 candidates for small non-messenger RNAs from the archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, pp. 7536-41.
- Tang, T. H. et al. 2005. Identification of novel non-coding RNAs as potential antisense regulators in the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Mol Microbiol* 55, pp. 469-81.
- Thiercelin M. 1899. Sur un diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogene. *CR Soc Biol* 5, pp. 269-71.

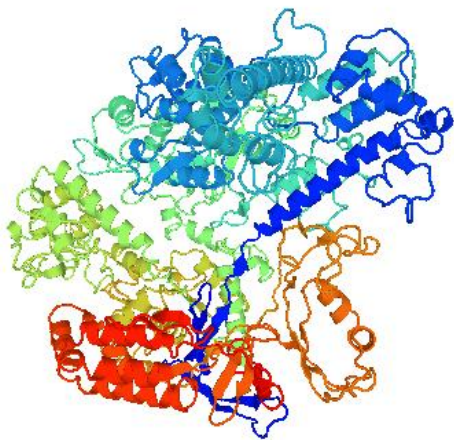
- Tremblay CL, Charlebois A, Masson L, Archambault 2013. M. Characterization of hospital-associated lineages of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* from clinical cases in dogs and humans. *Front. Microbiol.* 4 pp. 245.
- Ubukata K, Konno M, & Fujii R. 1975. Transduction of drug resistance to tetracycline, chloramphenicol, macrolides, lincomycin and clindamycin with phages induced from *Streptococcus pyogenes*. *J. Antibiot. (Tokyo)* n. 28, pp. 681–688.
- Uttley AH, George RC, Naidoo J, Woodford N, Johnson AP, Collins CH, Morrison D, Gilfillan AJ, Fitch LE, Heptonstall J. 1989. High-level vancomycin-resistant enterococci causing hospital infections. *Epidemiol Infect* 103, pp. 173–181.
- Varga M, Kuntová L, Pantůček R, Mašlaňová I, Růžicková V, Doškař J. 2012. Efficient transfer of antibiotic resistance plasmids by transduction within methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone. *FEMS Microbiol. Lett.* 332, pp. 146–152.
- Van Tyne, D. & Gilmore, MS. 2014. Friend turned foe: evolution of Enterococcal virulence and antibiotic resistance. *Annu. Rev. Microbiol* 68 pp. 337–56.
- Van Schaik et al. 2010. Pyrosequencing-based comparative genome analysis of the nosocomial pathogen *Enterococcus faecium* and identification of a large transferable pathogenicity island. *BMC Genomics* (11), pp. 239.
- Van Der Oost et al. 2014. Unraveling the structural and mechanistic basis of CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews* 12, pp. 479–492.
- Van Hal SJ et al. 2016. Evolutionary dynamics of *Enterococcus faecium* reveals complex genomic relationships between isolates with independent emergence of vancomycin resistance *Microbial Genomics* Jan 19, (2)
- Vebo HC, Solheim M, Snipen L, Nes IF, Brede DA. 2010. Comparative genomic analysis of pathogenic and probiotic *Enterococcus faecalis* isolates, and their transcriptional responses to growth in human urine. *PLoSOne* 5, e12489.
- Westra et al. 2016. Evolution and Ecology of CRISPR. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 47, pp. 307–31.
- Woodford N, Egelton CM, Morrison D. 1997. Comparison of PCR with phenotypic methods for the speciation of enterococci. *Adv Exp Med Biol* 418, pp. 405–8.
- Willems RJL, Top J, Van Santen M, Robinson DA, Coque TM, Baquero F, Grundmann H, Bonten MJM. 2005. Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. *Emerging Infect Dis* 2005.

- Yasmin et al. 2010. Comparative Genomics and Transduction Potential of *Enterococcus faecalis* Temperate Bacteriophages. *Journal of bacteriology* 192(4) pp. 1122–1130.
- Young R. 2014. Phage lysis: Three steps, three choices, one outcome. *Journal of Microbiology* 52(3) pp. 243–58.
- Zhang W, Mi Z, Yin X, Fan H, An X, et al. 2013. Characterization of *Enterococcus faecalis* Phage IME-EF1 and Its Endolysin. *PLoS ONE* 8(11)
- Zhang XX, Zhang T, & Fang HH. 2009. Antibiotic resistance genes in water environment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82, pp. 397–414.

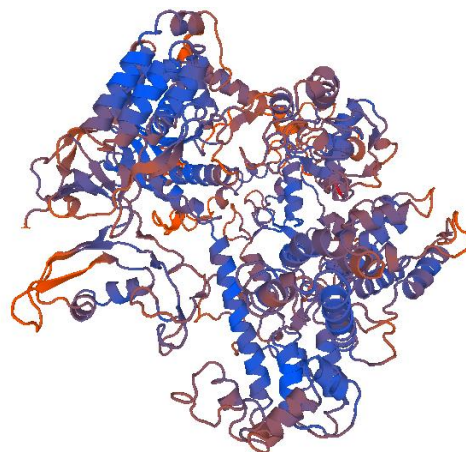


## 9 APÊNDICE

### 9.1 Estruturas 3D da Proteína cas9 para *E. faecalis* e *E. faecium*



SWISS-MODEL: modelling protein  
CRISPR-associated endonuclease Cas9.  
*Enterococcus faecalis* TX0027.



SWISS-MODEL: modelling protein  
CRISPR-associated endonuclease Cas9.  
*Enterococcus faecium* 1, 231,408.