



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MÁRCIA REGINA TERRA

**CONJUGAÇÃO *IN VITRO* DE *Enterococcus sp.*
RESISTENTE À VANCOMICINA**

MÁRCIA REGINA TERRA

**CONJUGAÇÃO *IN VITRO* DE *Enterococcus sp.*
RESISTENTE À VANCOMICINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina com o objetivo de obter o título de mestre.

Orientadora: Prof. Dr^a. Márcia Cristina Furlaneto

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

T323c Terra, Márcia Regina.
Conjugação *in vitro* de *Enterococcus sp.* resistente à vancomicina / Márcia
Regina Terra. – Londrina, 2013.
79 f. : il.

Orientador: Márcia Cristina Furlaneto.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de
Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Enterococcus – Teses. 2. Drogas – Resistência em microorganismos –
Teses. 3. Genética microbiana – Teses. 4. Conjugação (Biologia) – Teses.
I. Furlaneto, Márcia Cristina. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro
de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.
III. Título.

CDU 579.86

MÁRCIA REGINA TERRA

**CONJUGAÇÃO *IN VITRO* DE *Enterococcus sp.* RESISTENTE À
VANCOMICINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina com o objetivo de obter o título de mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof.Dr^a Márcia Cristina Furlaneto
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr^a Luciana Furlaneto-Maia
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -
UTFPR

Prof. Dr. Fernando Gomes Barcellos
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 18 de Dezembro de 2013.

TERRA, Márcia Regina. **Conjugação *in vitro* de *Enterococcus* sp. resistente à vancomicina.** 2013. 79f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

O gênero *Enterococcus* tem grande importância na Microbiologia de Alimentos devido a sua utilização como probiótico e seu uso como cultura iniciadora. No entanto, tem emergido como importante patógeno de infecções nosocomiais. A resistência de *Enterococcus* à maioria dos antimicrobianos de escolha e também a vancomicina tem sido relatado como um problema de saúde mundial. *Enterococcus* possui a habilidade natural de adquirir resistência a diferentes antimicrobianos por meio de transferência horizontal de genes, principalmente pela obtenção de plasmídeos de resistência via processo conjugativo, que conferem a capacidade de expressar fenótipos de resistência a diversas drogas. Um dos principais genes de resistência a vancomicina detectados em *Enterococcus* é o gene *vanA* com isso o objetivo do presente estudo foi avaliar a transferência do gene *vanA*, via processo conjugativo, entre isolados de *E. faecium* e *E. faecalis*, em meio de cultura e em leite. No presente estudo foi determinado o perfil genotípico e fenotípico de 30 isolados de *Enterococcus* spp. por meio de reação em cadeia de polimerase (PCR) com os oligonucleotídeos iniciadores *vanA*, *tetL*, *gelE* e *cpd* e pela técnica de Concentração Inibitória Mínima (CIM). A transferência do gene *vanA* *in vitro* foi demonstrada em caldo Mueller Hinton e em leite reconstituído na razão de 1:1 (doador: receptor), seguido de incubação a 37°C, a 80 rpm, por 6 horas. A cada 2 horas 100µl do co-cultivo foi semeado em ágar Mueller Hinton contendo Tetraciclina (16µg/mL) e Vancomicina (32µg/mL), e as placas foram incubadas a 37°C por 18 horas, com posterior contagem de UFC/mL. A frequência de transconjugantes foi obtida pela razão do número de transconjugantes pelo número de células doadoras utilizadas no co-cultivo. A estabilidade plasmidial e a confirmação dos transconjugantes foi realizada PCR com os oligonucleotídeos citados acima. A mesma metodologia foi realizada com doador morto por aquecimento. A análise do perfil genotípico e fenotípico nos proporcionou formar 30 pares, sendo 10 isolados doadores e 3 isolados receptores. Foram obtidos transconjugantes do gene *vanA* em todos os pares e tempos testados. No experimento de conjugação do gene *vanA* em MH a maior frequência obtida foi de $5,5 \times 10^5$ e a menor foi de $0,3 \times 10^5$ UFC/mL, com duas horas de co-cultivo. Não obtivemos transconjugantes com a técnica doador morto, excluindo assim o processo de transformação como método de transferência do gene. Foi observado 100% de estabilidade com todos os pares. A eficiência de *Enterococcus* em transferir o gene *vanA* leva a disseminação deste gene de resistência o que pode resultar no aumento da frequência de *Enterococcus* spp. resistente à vancomicina, limitando cada vez mais as alternativas de terapêutica.

Palavra-chave: *Enterococcus* spp. Conjugação. Resistência. Vancomicina. Transconjugante.

TERRA , Márcia Regina . **In vitro conjugation of vancomycin-resistant *Enterococcus sp*** . 2013. 79p. Dissertation (Masters in Microbiology) - State University of Londrina , Londrina , 2013.

ABSTRACT

The genus *Enterococcus* is of great importance in Food Microbiology due to their use as probiotics and their use as starter culture. However, it has emerged as an important pathogen of nosocomial infections. The resistance of *Enterococcus* to most antimicrobials of choice and also to vancomycin has been reported as a global health problem. *Enterococcus* has the natural ability to acquire resistance to antimicrobials through horizontal gene transfer, especially by obtaining plasmids resistance via conjugative process, conferring the ability to express phenotypic resistance to many drugs. One of the key genes of vancomycin resistance detected in *Enterococcus* *vanA* gene is thus the aim of this study was to evaluate the transfer of the *vanA* gene, via conjugative process, among isolates of *E. faecalis* and *E. faecium* in culture medium and in milk. In the present study we determined the phenotypic and genotypic profile of 30 isolates of *Enterococcus* spp. by polymerase chain reaction (PCR) with oligonucleotide primers *vanA*, *tetL*, *gelE* and *cpd* and the technique of minimal inhibitory concentration (MIC). The *vanA* gene transfer *in vitro* was demonstrated in Mueller Hinton broth and milk reconstituted in a 1:1 ratio (donor: recipient), followed by incubation at 37 °C, 80 rpm for 6 hours. Every two hours 100 µl of the co-culture was seeded on Mueller Hinton agar containing tetracycline (16µg/mL) and vancomycin (32µg/mL), and the plates were incubated at 37 ° C for 18 hours, with subsequent counting of CFU / mL. The frequency of transconjugants was obtained by the ratio of the number of transconjugants by the number of donor cells used in co-cultivation. The plasmid stability and confirmation of transconjugants PCR was performed with oligonucleotides mentioned above. The same methodology was performed by heating dead donor. The analysis of phenotypic and genotypic profile form provided in 30 pairs, 10 donors and 3 isolates isolated receivers. Transconjugants were obtained of the *vanA* gene in all pairs and times tested. In the experiment conjugation of the *vanA* gene in MH the highest frequency obtained was $3,5 \times 10^{-5}$ and the lowest was $0,3 \times 10^{-5}$ CFU / mL, with two hours of co-cultivation. No transconjugants obtained with the technique dead donor, thereby excluding the transformation process as the method of gene transfer. It was observed 100 % stability for all pairs. The efficiency of gene transfer in *Enterococcus* leads to dissemination of the *vanA* resistance gene which can result in increased frequency of *Enterococcus* spp. vancomycin-resistant, limiting increasingly alternative therapy.

Keyword: *Enterococcus* spp. Conjugation. Resistance. Vancomycin. Transconjugant.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1** – Biossíntese do peptídeo glicano e mecanismo de ação da vancomicina22
- Figura 2** – Principais mecanismos de resistência de enterococos a antimicrobianos25
- Figura 3** – Estrutura e composição do *cluster* de resistência *vanA-M*.....28

PARTE 1

- Figura 1** – Gel de eletroforese com produto de amplificação do gene *vanA* (231 pb *E. faecium*) e *tetL* (696 pb) utilizando DNA total de isolados doadores e receptores57
- Figura 2** – **A)** Detecção da presença do gene *geIE* (402 pb); em **B)** detecção da presença do gene *cpd* (782 pb), ambas nos isolados de *Enterococcus* spp. doadores.....57
- Figura 3** – **A)** detecção por PCR do gene *tetL* (696 pb) e *vanA* (231 pb *E. faecium*) nos transconjugantes provenientes da conjugação do receptor 906 com doadores; em **B)** detecção do gene *geIE* (402 pb) nos pares conjugativos formados pelo receptor 906 e demais doadores.....58
- Figura 4** – Frequência dos transconjugantes advindos do ensaio de transferência do gene *vanA* entre o isolado receptor 848 com os isolados doadores58
- Figura 5** – Frequência dos transconjugantes advindos do ensaio de transferência do gene *vanA* entre o isolado receptor 872 com os isolados doadores59
- Figura 6** – Frequência dos transconjugantes advindos do ensaio de transferência do gene *vanA* entre o isolado receptor 906 com os isolados doadores59

PARTE 2

- Figura 1** – gel de eletroforese com produto da amplificação do gene *vanA* (231 pb *E. faecium*) e *tetL* (696 pb) utilizando DNA genômico de isolados doadores e receptores76

Figura 2 – A) detecção da presença do gene <i>gel E</i> (402 pb); em B) detecção da presença do gene <i>cpd</i> (782 pb), ambas nos isolados de <i>Enterococcus</i> spp. doadores	76
Figura 3 – A) detecção por PCR do gene <i>tetL</i> (696 pb) e <i>vanA</i> (231 pb <i>E. faecium</i>) nos transconjugantes provenientes da conjugação do receptor 848 com doadores; em B) detecção do gene <i>gelE</i> (402 pb) nos pares conjugativos formados pelo receptor 848 e demais doadores.....	77

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Tabela 1** – Antimicrobianos e mecanismo de ação 21
- Tabela 2** – Fenótipo de *Enterococcus* spp. resistente à vancomicina 30

PARTE 1

- Tabela 1** – Oligonucleotídeos iniciadores e condições para amplificação dos genes em *Enterococcus* spp..... 60
- Tabela 2** – Isolados de *Enterococcus* spp. denominados doadores e respectivas características genótípicas e fenotípicas 60
- Tabela 3** - Isolados de *Enterococcus* spp. denominados receptores e respectivas características genótípicas e fenotípicas 61

PARTE 2

- Tabela 1** – Oligonucleotídeos iniciadores e condições para amplificação dos genes em *Enterococcus* spp. por PCR..... 78
- Tabela 2** – Isolados de *Enterococcus* spp. denominados doadores e receptores e suas respectivas características genótípicas e fenotípicas 79

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVOS GERAIS	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1	CARACTERÍSTICAS DO GÊNERO <i>ENTEROCOCCUS</i>	16
3.2	<i>ENTEROCOCCUS</i> SPP. EM ALIMENTOS	18
3.3	VIRULÊNCIA EM <i>ENTEROCOCCUS</i>	19
3.4	RESISTÊNCIA EM <i>ENTEROCOCCUS</i>	21
3.4.1	<i>Enterococcus spp.</i> resistente a vancomicina	26
3.5	CONJUGAÇÃO	31
	REFERÊNCIAS	35
	PARTE 1 TRANSFERÊNCIA VIA PROCESSO CONJUGATIVO DO GENE	
	<i>vanA</i> ENTRE ISOLADOS DE <i>Enterococcus spp.</i>	42
1	INTRODUÇÃO	44
2	MATERIAL E MÉTODOS	45
2.1	AMOSTRAGEM.....	45
2.2	DETECÇÃO E LOCALIZAÇÃO DO GENE DE RESISTÊNCIA <i>VAN_A</i> , DOS MARCADORES SELETIVOS E DO GENE <i>CPD</i>	45
2.3	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA	46
2.4	TRANSFERÊNCIA VIA PROCESSO CONJUGATIVO <i>IN VITRO</i>	46
2.4.1	Seleção dos Isolados e Preparo do Inoculo	46
2.4.2	Experimento de Conjugação em Meio Mueller-Hinton.....	47
2.5	TÉCNICA DO DOADOR MORTO	47
2.6	ESTABILIDADE PLASMIDIAL E CONFIRMAÇÃO DOS TRANSCONJUGANTES	48
3	RESULTADOS	48

4	DISCUSSÃO	50
5	CONCLUSÃO.....	51
	AGRADECIMENTOS.....	52
	REFERÊNCIAS.....	53
	PARTE 2 TRANSFERÊNCIA DO GENE DE RESISTÊNCIA <i>vanA</i> VIA PROCESSO CONJUGATIVO ENTRE ISOLADOS DE <i>Enterococcus</i> spp. EM LEITE RECONSTITUÍDO.....	62
1	INTRODUÇÃO	64
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	66
3	RESULTADOS	68
4	DISCUSSÃO	69
5	CONCLUSÃO.....	71
	AGRADECIMENTOS	71
	REFERÊNCIAS.....	72

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Enterococcus* faz parte da microbiota normal do trato gastrointestinal de invertebrados e mamíferos como o homem, mas tem emergido como importante patógeno de infecções nosocomiais tais como: infecções do trato urinário, de pele, neonatais, intra-abdominais, pélvicas, bacteremias e endocardites. Sua emergência como importante patógeno de infecções hospitalares está relacionada a seus fatores de virulência e a fatores de resistência a antimicrobianos proporcionando vantagens quanto à sobrevivência em ambientes adversos. *Enterococcus* spp. possui a habilidade natural de adquirir resistência a diferentes antimicrobianos por meio de transferência horizontal de genes, principalmente pela obtenção de plasmídeos de resistência via processo conjugativo, que conferem a capacidade de expressar fenótipos de resistência a diversas drogas. *Enterococcus* spp. é resistente a grande parte dos antimicrobianos comumente utilizados, como os β -lactâmicos e também a vancomicina que é uma das alternativas terapêuticas no tratamento de infecções enterocócicas causadas por micro-organismos resistentes ou em pacientes alérgicos a Beta-lactâmicos.

Desde o isolamento de Enterococos resistentes à vancomicina (VRE) na década de 80 e 90, na Europa e no Brasil, respectivamente, VRE tornou-se um problema de saúde pública mundial, pois têm sido detectados causando surtos hospitalares ou de forma endêmica, limitando a terapêutica antimicrobiana e aumentando o índice de mortalidade entre pacientes infectados por *Enterococcus* spp.

Nessa abordagem, suscita a necessidade de avaliar o mecanismo de transferência de genes de resistência à vancomicina via processo conjugativo entre isolados de *Enterococcus* spp.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a transferência do gene *vanA*, via processo conjugativo, entre isolados de *E. faecium* e *E. faecalis*, em meio de cultura e em leite.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a presença dos genes de resistência *vanA* e *tetL* e dos genes de virulência *cpd* e *geE* em cepas de *E. faecalis* e *E. faecium*;
- Verificar a localização dos genes *vanA* e *tetL*;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos isolados frente aos antimicrobianos tetraciclina e vancomicina;
- Verificar a transferência do gene *vanA* em meio de cultura e em leite;
- Avaliar a estabilidade plasmidial dos transconjugantes; e
- Detectar a presença dos genes *cpd*, *geE*, *vanA* e *tetL* nos transconjugantes.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CARACTERÍSTICAS DO GÊNERO *ENTEROCOCCUS*

Inicialmente o gênero *Enterococcus* spp. foi classificado como *Streptococcus* sp. pertencente ao grupo D de Lancefield (STILES; HOLZAPFEL, 1997). *S. faecalis* foi isolado em 1906 por Andrewes e Holder de um paciente com endocardite e recebeu este nome por fazer parte da microbiota intestinal humana. Em 1919, Orla-Jensen descreveram um micro-organismo com características de fermentação que diferiam de *S. faecalis* e o nomearam como *S. faecium* (MURRAY, 1990).

O nome “entérococoque” foi inicialmente usado por Thiercelin em 1899, para enfatizar a origem intestinal deste micro-organismo (STILES; HOLZAPFEL, 1997). Kalina propôs em 1970 baseado nas características fenotípicas e no arranjo celular à criação de um novo gênero para os *Streptococcus* do grupo enterococos, porém a proposta não foi bem aceita (FACKLAN *et al.*, 1999). Em 1984, com o advento da biologia molecular Schleifer e Ilper- I estabeleceram que as espécies *S. faecium* e *S. faecalis* eram suficientemente distintas das outras espécies de *Streptococcus*, e sugeriram a designação do gênero *Enterococcus* (FOULQUIE MORENO *et al.*, 2006). As espécies *S. faecalis* e *S. faecium* foram transferidas para o gênero *Enterococcus* (SCHLEIFER *et al.*, 1984), sendo descritas cerca de 40 espécies (FRANZ *et al.*, 2011).

Enterococcus spp. são bactérias que possuem a forma de cocos Gram-positivos com tamanho que varia de 0.6-2.5 μm que podem estar dispostos isolados, aos pares ou curtas cadeias, não formam esporos e podem ser móveis contendo poucos flagelos (DUNNY *et al.*, 2001; HUYCKE *et al.*, 1998; MADIGAN *et al.*, 2010). São quimiorganotróficos e anaeróbios facultativos fermentando uma ampla variedade de carboidratos como a lactose, com produção de L(+)-ácido láctico sem a produção de gás, pertencendo ao grupo de bactérias ácido lácticas (BAL). São catalase negativos e em presença de sangue as culturas são em geral gama hemolítica (não hemolíticas), mas

pode apresentar beta ou alfa hemólise e a temperatura de crescimento ótima é de $\pm 35^{\circ}\text{C}$ (FACKLAM *et al.*, 1999).

São ubíquos, sendo comumente isolados de plantas, solo, água e alimentos, predominando na microbiota do trato gastrointestinal de humanos e outros mamíferos, mas podem ser isolados da orofaringe, trato genital feminino e da pele (GIRAFFA, 2002). Isto pode resultar da tolerância natural às condições adversas como alta concentração de NaCl (6,5%) e a pH extremos (4,4 a 9,6) e ainda elevada temperatura (60°C por 30 minutos), (revisado por FOULQUIÉ MORENO *et al.*, 2006; revisado por FISHER; PHILIPS, 2009; FACKLAM *et al.*, 1999).

Por muitos anos *Enterococcus* spp. foi considerado importante somente na microbiologia de alimentos devido à utilização de algumas espécies na produção de alimentos probióticos ou como culturas iniciadoras, sendo considerados inofensivos para os seres humanos e sem importância médica (revisado por FOULQUIE MORENO *et al.*, 2006). No entanto, devido à sua emergência em infecções hospitalares, associada à presença de resistência intrínseca e adquirida a uma ampla gama de antimicrobianos (MAIETTI *et al.*, 2007), vem se destacando como importante patógeno de infecções nosocomiais (GIRAFFA, 2002; FURTADO *et al.*, 2005). Os principais fatores de risco para aquisição de infecções hospitalares por *Enterococcus* spp. são a presença de doenças subjacentes graves, internação prolongada, insuficiência renal, neutropenia, transplante, uso de catéteres urinários ou vasculares, o tratamento em unidade de cuidados intensivos e a antibioticoterapia precedente para outras doenças infecciosas (KAYSER, 2003).

As espécies *E. faecalis* e *E. faecium* apresentam maior importância médica devido ao seu isolamento de doenças humanas e por serem responsáveis por um elevado número de infecções, sendo *E. faecalis* a espécie predominante seguido de *E. faecium* que tem sido mais correlacionada a amostras multirresistentes (HUYCKE *et al.*, 1998; FRANZ *et al.*, 2001; revisado por GIRAFFA, 2002).

3.2 *ENTEROCOCCUS* SPP. EM ALIMENTOS

O gênero *Enterococcus* têm importante implicação na indústria de alimentos podendo ser utilizado como probiótico ou cultura iniciadora (revisado por GELSOMINO *et al.*, 2001).

Probióticos são micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (revisado por FRANZ *et al.*, 2011). Para um micro-organismo ser considerado probiótico deve possuir como características ser seguro, não invasivo, não carcinogênico e não patogênico, conseguir formar coagregados na microbiota normal em equilíbrio, aderir as células, persistir e se multiplicar, reduzir ou excluir a aderência de micro-organismos patogênicos, produzir bacteriocinas, ácidos e peróxido de hidrogênio antagônicos ao patógeno em crescimento (revisado por FOULQUIÉ MORENO *et al.*, 2006). Os probióticos são empregados em alimentos como iogurtes, leite fermentado e não fermentado e preparações farmacêuticas (revisado por FOULQUIÉ MORENO *et al.*, 2006).

Os enterococos também podem ser utilizados como culturas iniciadoras (*starters*) que consistem em bactérias viáveis adicionadas a alimentos com o intuito de aprimorar as características sensoriais provendo qualidades organolépticas, a conservação e a segurança do alimento por meio da antibiose prevenindo o aparecimento de micro-organismos que causem danos aos alimentos ou a saúde humana (revisado por LEROY *et al.*, 2004).

No entanto, apesar dos benefícios trazidos pelo uso do enterococos na microbiologia de alimentos este micro-organismo pode ser encontrado como um contaminante, sendo considerado um indicador de condições sanitárias insuficientes durante a produção e transformação de leite. Pode colonizar alimentos crus como leite e carne e multiplicar nestes substratos durante a fermentação, sobrevivendo até mesmo aos processos de conservação como pasteurização, salgagem e defumação. Isto se deve a sua habilidade de resistir a condições extremas de temperatura, pH e de salinidade, podendo se multiplicar em números elevados e atuar como agentes deterioradores em carnes e produtos lácteos processados (revisado por

GIRAFFA, 2002). Além disso, um fator preocupante do uso de *Enterococcus* spp. em alimentos é que este micro-organismo pode possuir resistência a uma ampla gama de antimicrobianos e alguns destes genes de resistência podem ser transferidos (revisado por FRANZ *et al.*, 2011) dissipando a resistência a antimicrobianos entre outras bactérias.

3.3 VIRULÊNCIA EM *ENTEROCOCCUS*

Fator de virulência é qualquer componente que seja requerido ou aumente a capacidade do micro-organismo causar doença no hospedeiro (MUNDY *et al.*, 2000). Shankar *et al.* (2002), ao estudar uma amostra clínica de *E. faecalis* MMH594, descreveram que os determinantes de virulência *esp*, operon da citolisina, gene da substância de agregação *asc10* e *gls24-like* gene da proteína induzível por *stress* estão agrupados, possuem menor conteúdo de C + G que o resto do genoma de *Enterococcus* spp. (32,2%), possuem genes que codificam transposases, reguladores de transcrição, duplicação terminal do sítio alvo, adaptação e sobrevivência em diferentes ambientes e tamanho grande (aproximadamente 150 kb) caracterizando uma Ilha de Patogenicidade (IPA).

Alguns fatores de virulência de *E. faecalis* como as citolisinas (“hemolisinas”), proteína de superfície, substância de agregação e gelatinase estão intimamente associados com a virulência *in vitro* e em modelos *in vivo* (SHANKAR *et al.*, 1999; revisado por GIRAFFA, 2002).

A citolisina atua como uma toxina β -hemolítica causando ruptura dos glóbulos vermelhos e diversas outras células humanas (VELASCO *et al.*, 2002). Os genes relacionado à produção da citolisina *cyLL*, *cyLS*, *cyM*, *cyB*, *cyIA*, *cyII*, *cyIR1* e *cyIR2* formam um operon que pode estar localizado em ilhas de patogenicidade (SHANKAR *et al.*, 2002) ou em plasmídeos autotransmissíveis responsivo a feromônio como Pad1 (IKE *et al.*, 1990; KOCH *et al.*, 2004; revisado por FOULQUIÉ MORENO *et al.*, 2006). Sua produção por *E. faecalis* é reconhecida pelo desenvolvimento de um halo claro em torno das colônias em meio ágar sangue, aparecendo em até 60% dos isolados provenientes de surtos (revisado por JETT *et al.*, 1994; MUNDY *et al.*, 2000).

A proteína de superfície de enterococos (Esp) localiza-se na superfície da parede celular sendo codificada pelo gene cromossomal *esp* que possui 5.622 e foi descrita por Shankar *et al.* (1999) no isolado clínico *E. faecalis* MMH594. Esp atua na adesão e na evasão dos sistema imune do hospedeiro, onde as variações em sua estrutura podem contribuir para a habilidade de *E. faecalis* persistir nos sítios de infecção (SHANKAR *et al.*, 1999; revisado por FOULQUIÉ MORENO *et al.*, 2006).

A substância de agregação (Agg) é uma glicoproteína de superfície associada à parede de bactérias Gram-positivas (CLEWELL, 1993; MUNDY *et al.*, 2000). A Agg é codificada pelos genes plasmidiais *asa1*, *asc10*, *asa 373* e *ash 701* (MUNDY *et al.*, 2000) que podem ser encontrados em quatro plasmídeos de *E. faecalis* pAD1, pCF10, pD1 e pAM373A, sendo raramente encontrada em *E. faecium*. A Agg atua sobre células eucarióticas impedindo ou retardando a formação do fagolisossomo promovendo a sobrevivência intracelular de *E. faecalis* em neutrófilos e, pode aumentar a aderência de *Enterococcus* spp. a células do intestino e do epitélio renal (revisado por KAYSER, 2003; revisado por FISHER; PHILIPS *et al.*, 2009). Em células procarióticas facilita o processo conjugativo, pois a linhagem doadora é induzida a sintetizar a Agg quando exposta a ferômonios sexuais bacterianos secretados pela linhagem receptora, modificando a superfície da bactéria doadora promovendo a adesão à célula receptora, o que causa agregação celular, potencializando a transferência do plasmídeo (CLEWELL, 1993; revisado por JETT *et al.*, 1994; revisado por FOULQUIÉ MORENO *et al.*, 2006).

A gelatinase é uma metaloproteinase codificada pelo gene cromossomal *geE* de *E. faecalis*. Esta enzima hidrolisa gelatina, colágeno, caseína, hemoglobina e outros compostos bioativos fornecendo nutrientes para a bactéria (revisado por JETT *et al.*, 1994; SU *et al.*, 1991; VERGIS *et al.*, 2002). Em seu estudo sobre fatores de virulência Eaton e Gasson (2001), utilizaram enterococos de isolados clínicos humanos, enterococos utilizados como culturas iniciadoras e enterococos utilizados como probióticos em alimentos e como resultado obtiveram o gene *geE* em amostras que não expressavam a gelatinase. Os pesquisadores relataram que este gene se torna ativo devido a alguns fatores ambientais, como por exemplo, o ambiente

encontrado no trato gastrointestinal, o equilíbrio do micro-organismo na microbiota intestinal e efeitos de sinergismo bacteriano, assim como a presença e persistência de um grande número de *Enterococcus* spp. viáveis.

3.4 RESISTÊNCIA EM *ENTEROCOCCUS*

Na década de 50 os antimicrobianos foram introduzidos para o tratamento de doenças bacterianas e até os dias atuais são uma importante ferramenta utilizada para combater diversos tipos de infecções (GROHMANN *et al.*, 2003). No mercado farmacêutico há diversas famílias de antimicrobianos que apresentam diferentes mecanismos de ação (Tabela 1).

Tabela 1: Antimicrobianos e mecanismos de ação.

Mecanismo de ação	Antimicrobianos
Inibição da síntese da parede celular	Penicilinas, cefalosporinas, carbapenems, monobactâmicos, glicopeptídeos (vancomicina).
Inibição da síntese proteica	Tetraciclinas, aminoglicosídeos, oxazolidononas, estreptograminas, macrolídeos, lincosamidas.
Inibição da síntese de DNA	Fluoroquinolonas.
Inibição competitiva da síntese de ácido fólico	Sulfonamidas, trimetopim.
Inibição da síntese de RNA	Rifampicina.

Fonte: Levy, 2002.

Os antimicrobianos β -lactâmicos (penicilinas) atuam na inibição da síntese de parede celular que compartilham um componente estrutural característico o anel β -lactâmico, também chamado de núcleo. As enzimas transpeptidases (PBP-penicillin binding proteins) catalisam a reação de transpeptidação que é responsável pela ligação cruzada de duas cadeias

peptídicas ao glicano. As PBPs ligam-se aos β -lactâmicos e tornam-se incapazes de catalisar a reação de transpeptidação. Assim, não há formação da ligação cruzada na parede celular bacteriana recém-sintetizada, tornando-se mais frágil (MADIGAN *et al.*, 2010).

O sítio-alvo da vancomicina é a parede celular bacteriana (REYNOLDS, 1989; SILVEIRA *et al.*, 2006). O mecanismo de ação da vancomicina (Figura 1) consiste em inibir e interromper a síntese da parede celular, sendo assim considerada bactericida por desestabilizar a parede celular provocando a morte da bactéria (HICKS *et al.*, 2011).

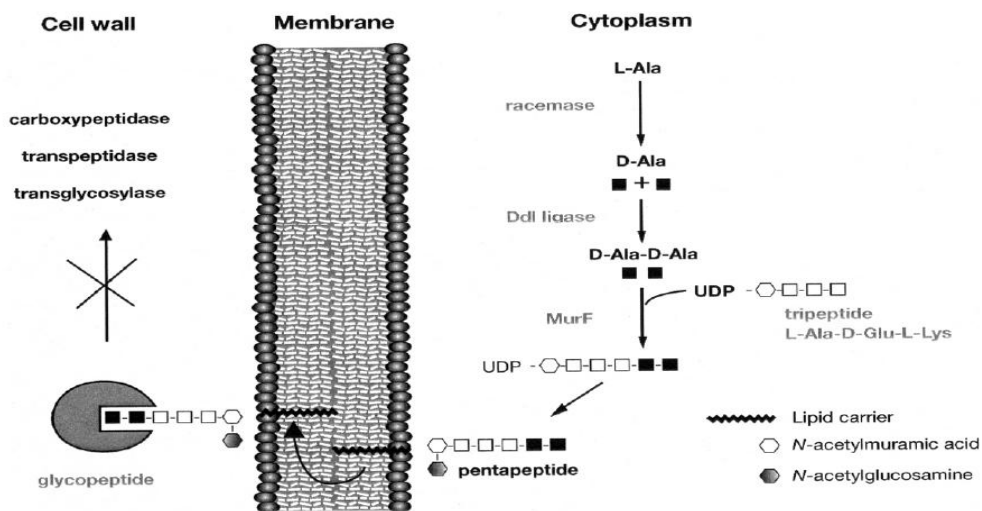


Figura 1: Biossíntese do peptídeo glicano e mecanismo de ação da vancomicina. No citoplasma, uma racemase converte a L-alanina em D-alanina (D-Ala), em seguida, duas moléculas de D-Ala são unidas por uma ligase, criando o dipeptídeo D-Ala-D-Ala, que é então adicionada uma uracil difosfatase-N-acetilmuramyl-tripeptídeo para formar uma uracil difosfato-N-acetilmuramyl-pentapeptídeo. Uracil difosfato-N-acetilmuramyl-pentapeptídeo está vinculada ao carreador de lipídios undecaprenol, o qual, após a adição de GlcNAc a partir de uracil difosfato-GlcNAc, permite a translocação dos precursores a superfície exterior da membrana citoplasmática. O N-acetilmuramyl-pentapeptídeo é, em seguida, incorporado no peptídeo glicano nascente por transglicosilação o que permite a formação de pontes cruzadas por transpeptidação. Vancomicina liga-se com elevada afinidade a porção C-terminal do pentapeptídeo D-Ala-D-Ala, bloqueando a adição de precursores por transglicosilação a cadeia nascente de peptídeo glicano e prevenindo subsequente ligação por transpeptidação. A vancomicina não penetra no citoplasma; portanto, a interação com o seu alvo ocorre somente após a translocação dos precursores para a superfície externa da membrana.

Fonte: Courvalin, 2006.

Como antimicrobianos que atuam na inibição da síntese proteica, interagindo com o ribossomo e interrompendo a tradução, podemos citar a tetraciclina, aminoglicosídeos e macrolídeos (MADIGAN *et al.*, 2010). A tetraciclina possui um anel naftaceno básico e a substituição desse anel origina novos análogos de tetraciclina. São antimicrobianos produzidos por espécies de *Streptomyces* e possuem como sítio-alvo a subunidade ribossomal 30S bacteriana inibindo a síntese proteica. Foi um dos primeiros antibióticos de largo espectro que inibem praticamente todas as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (MADIGAN *et al.*, 2010). Os aminoglicosídeos têm como alvo a subunidade ribossomal 30S, inibindo a síntese proteica e são efetivos contra bactérias Gram-negativas e devido a sua toxicidade são utilizados quando outros antibióticos falham. Nesta classe estão inclusos a estreptomicina que é produzida pelo *Streptomyces griseus* e seus relacionados canamicina, neomicina, gentamicina, amicacina entre outros (MADIGAN *et al.*, 2010). Os macrolídeos têm como alvo a subunidade 50S do ribossomo bacteriano. É um antibiótico de largo espectro que e o mais conhecido é a eritromicina produzida por *Streptomyces erythreus*. Esta classe inclui ainda a azitromicina, a diritromicina e a claritromicina, sendo utilizados em substituição aos antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos em caso de alergia (MADIGAN *et al.*, 2010).

A inibição da atividade da DNA girase ou topoisomerase II, enzima essencial à sobrevivência bacteriana é promovido pelos antimicrobianos da classe das quinolonas e fluoquinolonas como o ácido nalidíxico, o norfloxacin e o ciprofloxacina. A DNA girase torna a molécula de DNA compacta e biologicamente ativa. Ao inibir essa enzima, impedindo o superenovelamento do DNA que é uma etapa necessária para o empacotamento do DNA na célula bacteriana a molécula de DNA passa a ocupar grande espaço no interior da bactéria e suas extremidades livres determinam síntese descontrolada de RNA mensageiro e de proteínas, determinando a morte das bactérias (MADIGAN *et al.*, 2010).

O mecanismo de inibição competitiva da síntese de ácido fólico é apresentado pelas sulfonamidas que possuem um efeito bacteriostático (TORTORA *et al.*, 2012). A inibição da síntese de RNA é promovida pelo antimicrobiano rifampicina. Ela age durante a fase de crescimento da bactéria

unindo-se a RNA polimerase, bloqueando assim, a síntese de RNA mensageiro que produz proteínas (FLOSS *et al.*, 2005).

O aumento da prevalência de bactérias patogênicas resistentes a antimicrobianos resulta principalmente da pressão seletiva devido à utilização generalizada de antimicrobianos na medicina humana e veterinária, nutrição de animais e agricultura e também à capacidade das bactérias serem altamente resistentes a muitos antimicrobianos utilizados (MATHUR *et al.*, 2005; GROHMANN *et al.*, 2003; LEVY, 2002).

A resistência pode ser classificada como intrínseca, quando a espécie já possui genes de resistência e estes se encontram no cromossomo, ou extrínseca (adquirida) quando a resistência pode advir de uma mutação no DNA original ou à aquisição de material genético (ZARRILLI *et al.*, 2005) por meio de mecanismos de transferência horizontal de genes (THG). Há descrito três mecanismos de THG, a transformação que ocorre quando a bactéria capta, incorpora e expressa um DNA que estava livre no ambiente; a transdução que envolve a transferência do DNA de bacteriófagos para bactérias e a conjugação que envolve a célula doadora portadora de plasmídeo, a célula receptora livre de plasmídeo e há a necessidade de contato físico para que ocorra a transferência do material genético (WOZNIAK *et al.*, 2010; STECHER *et al.*, 2013).

A resistência extrínseca a antimicrobianos foi inicialmente detectada em *Enterococcus* spp. na década de 1970 (COURVALIN *et al.*, 1972; JACOB *et al.*, 1974). Cepas de *Enterococcus* spp. resistentes a antimicrobianos tornaram-se uma grande preocupação para a comunidade médica devido ao aumento do número de infecções causadas por estes microorganismos (HUYCKE *et al.*, 1998).

Ao longo das décadas, *Enterococcus* spp. tem emergido como patógeno nosocomial, sendo classificado como a quarta causa mais comum de bacteremia nos Estados Unidos (BIEDENBACH *et al.*, 2004). Uma das maiores razões para *Enterococcus* spp. sobreviver em ambiente hospitalar é a resistência intrínseca a antimicrobianos e sua habilidade de adquirir genes de resistência à maioria dos antimicrobianos, possuindo uma ampla gama de mecanismos de resistência (Figura 2). Isto limita a escolha do agente a ser

utilizado contra estes micro-organismos (MURRAY, 1990; revisado por CETINKAYA *et al.*, 2000, LEVY *et al.*, 2004).

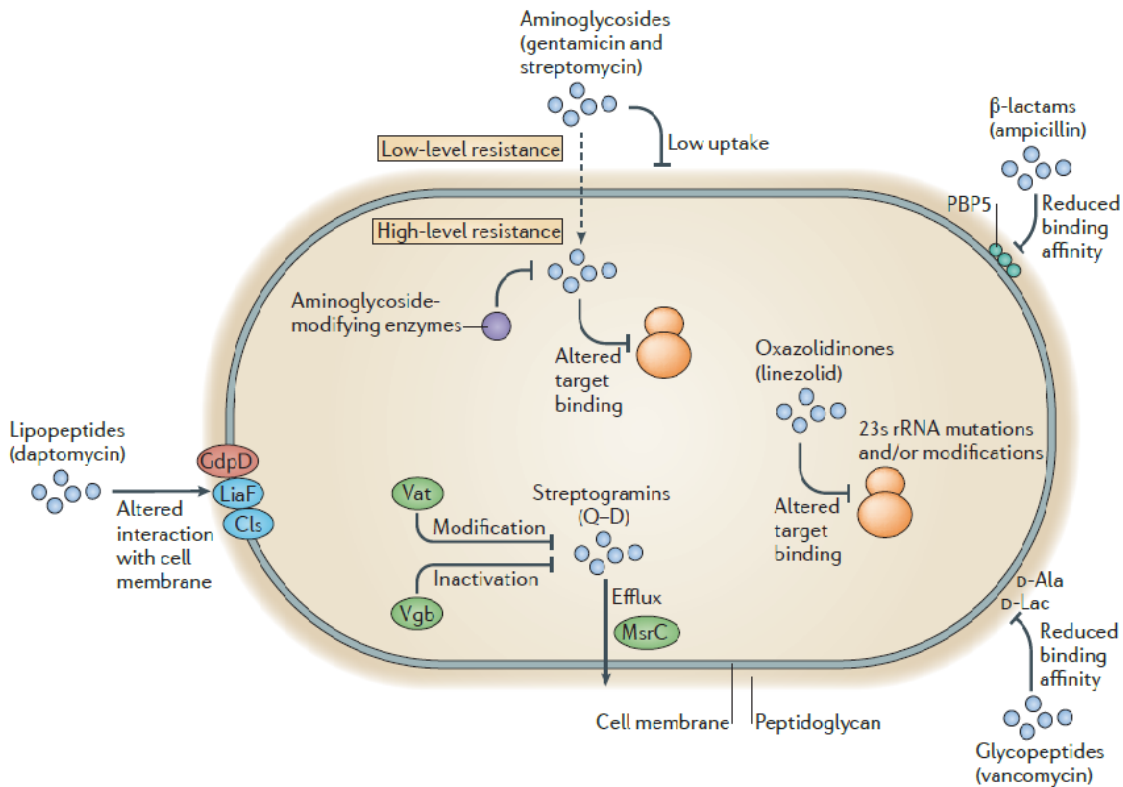


Figura 2: Principais mecanismos de resistência de enterococos a antimicrobianos: Em *Enterococcus faecium*, a resistência à ampicilina ocorre pela a produção de proteínas de ligação à penicilina 5 (P P5), que possui baixa afinidade a β -lactâmicos. Enterococos apresenta baixo nível resistência intrínseca a aminoglicosídeos (estreptomicina ou gentamicina) devido à baixa adesão por moléculas altamente polares. O alto nível de resistência devido a aquisição de enzimas modificadoras de aminoglicósidos ou, por estreptomicina, pode advir de mutações ribossomais que resultam numa modificação da ligação ao alvo. A resistência ao glicopeptídeo vancomicina ocorre por meio da reduzida afinidade de ligação à vancomicina, envolvendo alterações na síntese de peptideoglicano. A resistência de *Enterococcus* spp. as estreptograminas quinupristina-dalfopristina (Q-D) envolve vários mecanismos, como a modificação das drogas (por virginiamicina acetiltransferase (Vat), inativação de drogas (através da virginiamicina B lysase (Vgb) e efluxo de drogas (via ATP-binding cassette protein macrolídeo–estreptogramina proteína de resistência (MsrC)). A resistência à oxazolidinona linezolid é rara, sendo que a via mais comum envolve mutação no RNA ribossomal 23S que é o sitio de ligação ao ribossomo. A resistência de *E. faecalis* a daptomicina envolve a modificação da alteração com a membrana celular e requer uma proteína de membrana LiaF e

enzimas envolvidas no metabolismo do fosfolípido, tal como um membro da família da glicerofosforil diéster fosfodiesterase (GdpD) e cardiolipina sintase (CIs).

Fonte: Arias *et al.*, 2012.

Além do efeito direto da resistência a antimicrobianos sobre a saúde humana, sendo os patógenos fármaco-resistentes a terapêutica comuns em hospitais e também cada vez mais presentes nas comunidades uma grave e crescente ameaça à saúde no mundo, há também um custo econômico para programas de saúde (KNOBLER *et al.*, 2003).

3.4.1 *Enterococcus* spp. resistente à vancomicina

O antimicrobiano glicopeptídeo vancomicina foi descoberto há mais de 50 anos e ainda ocupa lugar de destaque quando se trata de severas infecções causadas por bactérias Gram-positivas (LEVINE, 2006; STEVENS, 2006).

O laboratório “Eli Lilly e Company” iniciou seus estudos por novos antimicrobianos em 1950, devido à escassez de alternativas para o tratamento de infecções causadas por Estafilococos resistente à penicilina. Em 1952, foi isolada a partir da fermentação por *Amycolatopsis orientalis*, uma substância que foi denominada “composto 05865” ou “Mississippi mud” (Lodo do Mississippi) devido ao seu aspecto marrom e após a purificação o composto foi denominado vancomicina (da palavra “to vanquish” que significa destruir, aniquilar) sendo alocada na classe dos glicopeptídeos (LEVINE, 2006; TENOVER *et al.* 2007).

O uso da vancomicina foi aprovado em 1958 após estudos que comprovaram o sucesso em muitas bactérias Gram-positivas, incluindo Estafilococos resistente à penicilina e também *Clostridium*. Porém, devido ao advento das Penicilinas semi-sintéticas e à toxicidade relacionada à vancomicina seu uso restringiu-se a pacientes alérgicos a Beta-lactâmicos ou a cepas resistentes a outros antimicrobianos e suscetíveis à vancomicina (LEVINE, 2006; TENOVER *et al.* 2007).

Antibióticos glicopeptídicos consistem em um anel péptidico no qual vários açúcares estão covalentemente ligados (WERNER, 2012). Não é considerado um agente de primeira linha, sendo reservado para o tratamento de vários micro-organismos aeróbios e anaeróbios Gram-positivos bem como para o tratamento de infecções graves causadas por organismos que não respondem a outros agentes antimicrobianos. Porém, não possui atividade contra bactérias Gram-negativas e micobactérias (SILVEIRA *et al.*, 2006).

Para direcionar seu uso, assim como de outros antimicrobianos devem ser utilizados dados de laboratório de microbiologia que identificam organismos e que estudam sua susceptibilidade a vancomicina (HICKS *et al.*, 2011).

O primeiro micro-organismo patogênico que apresentou resistência adquirida à vancomicina foi *Enterococcus* spp. e o primeiro caso de infecção por *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE) foi observado em 1986 no Reino Unido e na França, estendendo-se para outros países. Desde então, casos de infecções causadas por VRE tem sido observados em todo mundo sendo uma das causas mais importantes de infecções hospitalares (LECLERCQ *et al.*, 1988; UTTLEY *et al.*, 1989; PATEL *et al.*, 2000; revisado por CETINKAYA *et al.*, 2000).

O surgimento de VRE foi inicialmente correlacionado com o uso da avoparcina, um glicopeptídeo análogo da vancomicina utilizado na ração animal como promotor de crescimento. Em 1997 a União Europeia proibiu o uso da avoparcina devido a estudos que demonstraram a correlação entre seu uso e o surgimento de VRE. Há relatos sobre o isolamento de VRE na produção de animais em diferentes países (BAGER *et al.*, 1997; TORRES *et al.*, 2003). No entanto, mesmo após a proibição da avoparcina, o continente europeu continuou a apresentar um aumento importante no isolamento de VRE, indicando que outros fatores podem promover a disseminação do VRE na Europa (revisado por ARIAS *et al.*, 2010; CETINKAYA *et al.*, 2000).

Desde o primeiro isolamento de VRE no Brasil em 1996 em Curitiba-PR e posteriormente em 1997 em São Paulo (DALLA COSTA *et al.*, 1998) o VRE tornou-se uma frequente preocupação entre os epidemiologistas clínicos devido ao seu potencial de disseminação através do contato.

A resistência à vancomicina é codificada por nove genes que formam o cluster *van* (Figura 3) e pode estar contido no transposon 1546 (Tn 1546) ou em seus derivados que geralmente estão alocados em plasmídeos transferíveis (COURVALIN, 2006; WERNER *et al.*, 2006). Os genes possuem funções diferentes: funções de transposição; regulação dos genes de resistência à vancomicina (*vanR* e *vanS*); síntese do depsipeptídeo D-alanil-D-lactato, o qual, quando incorporado no pentapeptídeo precursor de peptídeoglicano constitui um precursor para o qual vancomicina e teicoplanina se ligam com afinidade reduzida (*vanH* e *vanA*) e hidrólise dos precursores do peptídeoglicanos normais (*vanX* e *vanY*). A função de *vanZ* é desconhecida (revisado por PATEL *et al.*, 2000).

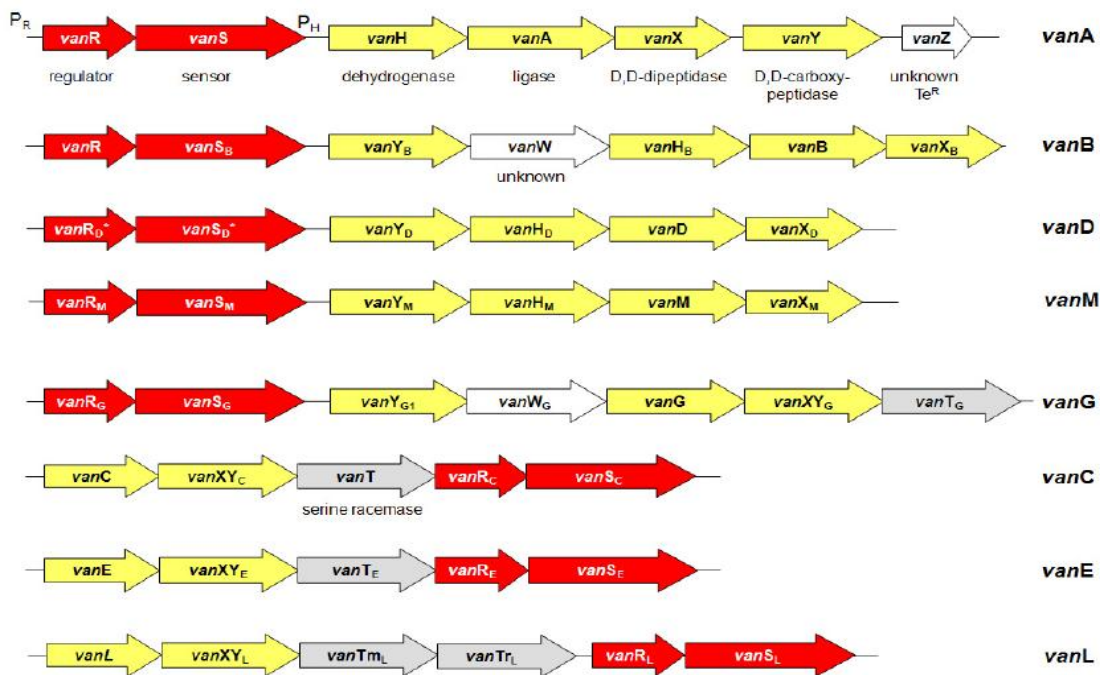


Figura 3: Estrutura e composição do cluster de resistência *vanA-M*. As cores das setas representam grupos funcionais: em vermelho esta representado o sistema regulatório de dois componentes; em amarelo os genes essenciais para a expressão da resistência; em cinza a serina racemase, em branco genes de função desconhecida ou adicionais. O comprimento das setas são de acordo com o tamanho dos genes, mas não estão desenhadas em escala. *P_R* e *P_H* são promotores que precedem *vanR* e *vanH*, respectivamente. *Te^R* esta associado ao decréscimo da suscetibilidade a Teicoplanina.

Fonte: Werner, 2012.

A modificação do aminoácido terminal D-alanina por D-lactato é codificada pelos genes *vanA*, *vanB* e *vanD*, a alteração do aminoácido terminal introduz uma interação eletrostática repulsiva no lugar da ligação de hidrogênio. Em consequência, a afinidade da vancomicina com a camada de peptídeoglicano diminui. Os genótipos *vanA* e *vanD* são responsáveis por alto nível de resistência a vancomicina e níveis moderados de resistência ao glicopeptídeo Teicoplanina, enquanto que *vanB* apresenta variados níveis de resistência a Vancomicina. Quando a resistência é codificada pelos genes *vanC*, *vanE* e *vanG* o aminoácido terminal D-alanina é substituído por D-serina, que confere baixo nível de resistência à vancomicina, enquanto que a teicoplanina mantém sua atividade (Tabela 2). Desta maneira, estes precursores modificados não são reconhecidos pela vancomicina (COURVALIN, 2006; revisado por TAVARES, 2000; SILVEIRA *et al.*, 2006; FISHER ; PHILLIPS, 2009).

Tabela 2: Fenótipo de *Enterococcus* spp. resistente à vancomicina

Fenótipo	Tipo de Resistência								
	Adquirida								Intrínseca
	vanA	vanB	vanD	vanE	vanG	vanL	vanM	vanN	vanC
MIC (mg/L)	64-100	4-1000	64-128	2-32	16	8	>256	16	8-32
Espécie	<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. gallinarum</i> , <i>E. casseliflavus</i> , <i>E. flavescens</i> ,
Modificação	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser
Conjugação	+/-	+/-	-	-	+	-	+	?	-
Elemento móvel	Tn1546	Tn1547 ou Tn1549						?	
Localização	Plasmídeo e Cromossomo	Plasmídeo e Cromossomo	Cromossomo	Cromossomo	Cromossomo	Cromossomo?	Plasmidíó	?	Cromossomo

D-Ala-D-Lac (D-Alanina-D-Lactato); D-Ala-D-Ser (D-Alanina-D-Serina).

Fonte: adaptado de Cetinkaya *et al.*, 2000 e Courvalin, 2006

Na América Latina, América do Norte, Sudeste da Ásia e Leste da Europa os genes *van* mais prevalentes em *E. faecium* são *vanA*, seguido de *vanB* e *vanC* (FISHER; PHILLIPS, 2009; WERNER *et al.*, 2008a,b). A resistência adquirida a glicopeptídeos está associada principalmente com o fenótipo *vanA* que esta frequentemente localizado em plasmídeos conjugativos (NOBLE *et al.*, 1992).

3.5 CONJUGAÇÃO

A conjugação parece ser o meio mais eficaz de transferência gênica dentre os mecanismos de transferência horizontal de genes (MAZODIER *et al.*, 1991), sendo um dos responsáveis pela variabilidade genética, tendo impacto na microbiologia clínica e ambiental (LANKA *et al.*, 1995). A conjugação bacteriana é um mecanismo de transferência de material genético altamente específico em que o DNA é transferido de uma bactéria doadora para uma bactéria receptora. Um importante pré-requisito para a transferência por conjugação é a associação íntima entre as superfícies das células (CLARK, 1962; GROHMANN *et al.*, 2003; MADIGAN *et al.*, 2010; WOZNIAK *et al.*, 2010; STECHER *et al.*, 2013).

O processo envolve a célula doadora que possui o plasmídeo, a célula receptora que é livre de plasmídeo e a junção destas por meio de um poro pelo qual o DNA plasmidial pode ser transferido (GROHMANN *et al.*, 2003; THOMAS *et al.*, 2005).

Em bactérias Gram-negativas, plasmídeos de fertilidade possuem genes necessários para a formação de complexos filamentosos extracelulares, designado pilus sexual que forma um canal proteico entre a célula doadora e a célula receptora que é essencial para que seja estabelecido o contato físico e a transferência do plasmídeo da bactéria doadora para a receptora (GROHMANN *et al.*, 2003; THOMAS *et al.* 2005; WOZNIAK *et al.*, 2010; STECHER *et al.*, 2013).

Já em bactérias Gram-positivas o contato físico é estabelecido quando células receptoras produzem ferômonios e as células doadoras respondem com a síntese de uma adesina que facilita a formação de

agregados, após o contato físico entre doadora e receptora são formados poros nas membranas, por onde ocorre a transferência do DNA plasmidial (GROHMANN *et al.*, 2003).

Os plasmídeos são agentes importantes para a propagação de genes entre as bactérias (ZATYCA *et al.*, 1998) e a crescente importância dos *Enterococcus* spp. como patógenos nosocomiais pode ser atribuída, em parte, à habilidade natural de adquirir plasmídeos (MUNDY *et al.*, 2000). Provavelmente por serem elementos genéticos relativamente pequenos que podem ser transferidos rapidamente (THOMAS *et al.*, 2005), eles contribuem para as trocas de genes de resistência e de genes de virulência (GROHMANN *et al.*, 2003; CLEWELL *et al.*, 2002).

Plasmídeos são elementos genéticos extracromossômicos, constituídos de sequências curtas de DNA circular ou linear, de fita dupla, superenovelado e que variam de tamanho possuindo aproximadamente 10% do tamanho do cromossomo da célula hospedeira. São replicados independentemente do cromossomo bacteriano, não possuem genes essenciais para o crescimento e multiplicação, mas transportam genes que codificam características que permitem a sobrevivência ou vantagens quanto ao crescimento destes micro-organismos em ambientes com condições adversas (revisado por HEGSTAD *et al.*, 2010; revisado por BENNETT, 2008; MUNDY *et al.*, 2000), incluindo os genes que conferem resistência a antimicrobianos, resistência a substâncias tóxicas como metais pesados e determinantes de virulência que permitem a invasão e a sobrevivência em sistemas animais (revisado por BENNETT, 2008; GROHMANN *et al.*, 2003).

Na década de 50 plasmídeos de resistência a antimicrobianos (plasmídeo R ou fator R) foram descobertos no Japão, em linhagens bacterianas entéricas que adquiriram resistência ao antimicrobiano sulfonamida (MADIGAN *et al.*, 2010). Plasmídeos de resistência tendem a ser relativamente pequenos, frequentemente menos de 10 Kb de tamanho, codificando apenas genes de resistência, enquanto que os plasmídeos conjugativos tendem a ser um pouco maiores, 30 Kb ou mais. Muitos plasmídeos de resistência são conjugativos, isto é, codificam as funções necessárias para promover a transferência de DNA célula-a-célula (revisado por BENNETT, 2008).

A resistência aos antimicrobianos mediada por plasmídeos abrange a maioria, se não todas as classes de antimicrobianos em uso clínico e inclui resistência a muitos que estão na vanguarda da antibioticoterapia. Entre estes são normalmente utilizados cefalosporinas, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos (revisado por BENNETT, 2008).

Plasmídeos responsivos a feromônio são altamente transmissíveis entre as cepas de *E. faecalis* e acredita-se que contribua para a disseminação horizontal de genes de resistência a antimicrobianos (CLEWELL, 1990).

Os ferômonios são pequenos peptídeos hidrofóbicos, formados por sete ou oito aminoácidos com especificidade para as células doadoras e são secretados em pequenas quantidades por células receptoras (CLEWELL, 1993, 1999; WIRTH, 1994; revisado por GROHMANN *et al.*, 2003). Podem aumentar a frequência de transferência de um plasmídeo por facilitar a transferência do DNA plasmidial da célula doadora para a célula receptora por conjugação (revisado JETT *et al.*, 1994; revisado por DUNNY *et al.*, 1995; revisado por GROHMANN *et al.*, 2003).

No modelo mais aceito para a indução da transferência de plasmídeo por feromônio, a célula receptora secreta o feromônio, este se difunde e pode chegar à célula doadora em potencial. O feromônio se liga a célula doadora por elevada afinidade, e o reconhecimento específico desta molécula de sinalização serve como um meio de comunicar que uma célula receptora está próxima. Após a ligação é iniciada uma resposta que resulta na ativação da expressão das funções de transferência, incluindo a síntese de substâncias de agregação (Agg), que pode promover a ligação aos receptores por meio de um complemento receptor chamado substância de ligação de enterococos (EBS). O contato célula-célula resultante de ligação Agg-EBS permite a subsequente formação de um tipo de canal de acasalamento entre as duas células que propicia a transferência da cópia do plasmídeo a partir do doador para o receptor (revisado por DUNNY *et al.*, 1995).

Criada a nova célula doadora à síntese e secreção de feromônios específicos para outros plasmídeos é continuada, no entanto um padrão de feromônio induzível idêntico ao do doador original é transferido juntamente com o plasmídeo (mesmo que ele tenha os genes para a produção

e resposta a feromônios), a fim de codificar funções para impedir a célula doadora de responder ao seu próprio ferômonio (revisado JETT *et al.*, 1994; revisado por DUNNY *et al.*, 1995; GROHMANN *et al.*, 2003).

REFERÊNCIAS

- ARIAS CA, CONTRERAS GA, MURRAY BE. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v.10, p.266-278, 2012.
- ARIAS CA, CONTRERAS GA, MURRAY BE. Management of multidrug-resistant enterococcal infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v.16, n. 6, p.555-562, 2010.
- BAGER F, MADSEN M, CHRISTENSEN J, AARESTRUP FM. Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. **Preventive Veterinary Medicine**, v.31, p.95-112, 1997.
- BENNETT PM. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria-review. **British Journal of Pharmacology**, v.153, p. S347–S357, 2008.
- BIEDENBACH DB, MOET GJ, JONES RN. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2002). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 50, p. 59-69, 2004.
- CETINKAYA Y, FALK P, MAYHAL CG. Vancomycin-Resistant Enterococci **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, n.4, p.686-707, 2000.
- CLARK AJ, ADELBERG EA. Bacterial conjugation. **Annual Reviews of Microbiology**,v.16, p.289-319, 1962.
- CLEWELL, DB and DUNNY GM. Conjugation and genetic exchange in enterococci. In M. S. Gilmore (ed.), *The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*. **American Society for Microbiology Press**, Washington D.C., 2002. p.265-300.
- CLEWELL DB, FLANNAGAN SE. Bacterial Conjugation, **Plenum Press**, p. 369–394, 1993.
- CLEWELL DB, PONTIUS LT, AN FY, IKE Y, SUZUKI A, NAKAYAMA J . Nucleotide sequence of the sex pheromone inhibitor (iAD1) determinant of *Enterococcus faecalis* conjugative plasmid pAD1. **Plasmid**, v. 24, ed.2, p.156–161, 1990.
- COURVALIN PM, CARLIER C, CHABBERT YA. Plasmid-linked tetracycline and erythromycin resistance in group D 'streptococcus'. **Annales de l'Institut Pasteur (Paris)**; v.123, p.755–759, 1972.

COURVALIN PM. Vancomycin resistance in Gram-positive cocci. **Clinical Infectious Diseases**, 42 Suppl, v.1, p. S25–34, 2006.

DALLA COSTA LM, SOUZA DC, MARTINS LT, ZANELLA RC, BRANDILONE MC, BOKERMANN S et al. Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*: First case in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.2, n.3, p.160-163, 1998.

DUNNY GM, ANTIPOORTA MH, HIRT H. Peptide pheromone-induced and transfer of plasmid pCF10 in *Enterococcus faecalis*: probing the genetic and molecular basis for specificity of the probe response. **Peptides**, v.22, p. 1529-1539, 2001.

DUNNY GM, LEONARD BAB, HEDBERG PJ. Pheromone-inducible conjugation in *Enterococcus faecalis*: interbacterial and host-parasite chemical communication. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 4 p. 871–876, 1995.

EATON TJ, GASSON M. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. **Applied and Environment Microbiology**, v.67, n. 4, p.1628-1635, 2001.

FACKLAN RR, SAHM DF, TEIXEIRA LM. Enterococcus. In: MURRAY PR, BARON EJ, PFALLER MA, TENOVER FC, YOLKEN RH. **Manual of Clinical Microbiology**. 7 ed. Washington: **American Society for Microbiology Press**, 1999. p. 297-305.

FISHER K, PHILLIPS C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, v.155, p. 1749–1757, 2009.

FLOSS HG, YU TW. Rifamycin - Mode of action, resistance and biosynthesis. **Chemical Reviews**, v.105, p.621-632, 2005.

FRANZ CM, HUCH M, ABRIOUEL H, HOLZAPFEL W, GÁLVEZ A. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v.151, n.2, p. 125–140, 2011.

FRANZ CMAP; MUSCHOLL-SILBERHORN AB; YOUSIF NMK; VANCANNEYT M; SWINGS J; HOLZAPFEL WH. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 4385–4389, 2001.

FOULQUIÉ MORENO MR, SARANTINOPOULOS P, TSAKALIDOU E, DE VUYST L. The role and application of enterococci in food and health, **International Journal of Food Microbiology**, v.106, p.1-24, 2006.

FURTADO GHC, MARTINS ST, COUTINHO AP, SOARES GMM, WEY SB, MEDEIROS EAS. Incidence of vancomycin-resistant *Enterococcus* at a university hospital in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v.39, n.1, p. 1-5, 2005.

GIRAFFA G. Enterococci from foods. **FEMS Microbiology Reviews**, v.26, ed.2, p.163-171, 2002.

GROHMANN E, MUTH G, ESPINOSA M. Conjugative Plasmid Transfer In Gram-Positive. Bacteria microbiology and molecular biology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 2, p. 277–301, 2003.

GELSOMINO R; VANCANNEYT M; CONDON S; SWINGS J; COGAN TM. Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar-type cheesemaking factory. **International Journal of Food Microbiology**, v.71, p.177–188, 2001.

HEGSTAD K, MIKALSEN T, COQUE TM, WERNER G, SUNDSFJORD A. Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. **Clinical Microbiology Infection**, v.16, n.6, p.541- 554, 2010.

HICKS RW, HERNANDEZ J. Perioperative Pharmacology: a focus on vancomycin **Association of Perioperative Registered Nurses Journal**, v. 93, n. 5, p. 593-596, 2011.

HUYCKE MM, SAHM DF, GILMORE MS. Multiply resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. **Emerging Infectious Diseases**, v.4, p.239–249, 1998.

IKE Y; CLEWELL DB; SEGARRA RA; GILMORE MS. Genetic analysis of the pAD1 hemolysin/bacteriocin determinant in *Enterococcus faecalis*: Tn917 insertional mutagenesis and cloning. **Journal of Bacteriology**, v.172, n.1, p.155-163, 1990.

JACOB AE, HOBBS SJ. Conjugal transfer of plasmid-borne multiple antibiotic resistance in *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes*. **Journal of Bacteriology**, v.117, p. 360–372, 1974.

JETT BD, HUYCKE MM, GILMORE MS. Virulence of Enterococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v.7, n. 4, p. 462-478, 1994.

KAYSER FH. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. **International Journal of Food Microbiology**. n. 88, p. 255– 262, 2003.

KNOBLER SL, LEMON SM, NAJAFI M, BURROUGHS T. The resistance phenomenon in microbes and infectious disease vectors: implications for human health and strategies for containment. In: Forum on Emerging Infections Board on Global Health. Institute of medicina of the national academies. Washington, D.C, 2003.

KOCH S, HUFNAGEL M, THEILACKER C, HUEBNER J. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. **Vaccine**, v.22, p.822–830, 2004.

LANKA E, WILKINS BM. DNA processing reactions in bacterial conjugation. **Annual Review Biochemistry**, v.64, p. 141-169, 1995.

LECLERCQ R, DERLOT E, DUVAL J, COURVALIN P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. **The New England Journal of Medicine**, v. 319, n.3, p.157- 61, 1988.

LEROY F; DE VUYST L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**. v.15, p. 67–78, 2004.

LEVINE DP. Vancomycin: a history. **Clinical Infectious Diseases**; 42:S5–12, 2006.

LEVY SB. The Antibiotic Paradox: How Misuse of Antibiotics Destroys their Curative Powers, **Perseus Cambridge**, 2002.

MADIGAN MT, MARTINKO JM, DUNLAP PV, CLARK DP. **Microbiologia de Brock**. 12. ed Porto Alegre: Artmed, 2010.1160 p.

MAIETTI L; BONVINI B; HUYS G; GIRAFFA G. Incidence of antibiotic resistance and virulence determinants among *Enterococcus italicus* isolates from dairy products. **Systematic and Applied Microbiology**. v.30, n. 6, p. 509–517, sep. 2007.

MAZODIER P; DAVIS J. Gene transfer between distantly related bacteria. **Annual Review of Genetic**, v.25, p.147-171, 1991.

MATHUR S, SINGH R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria – a review. **International Journal Food of Microbiology**, v.105, p. 281-295, 2005.

MUNDY L M, SAHM DF, GILMORE M. Relationships between Enterococcal virulence and antimicrobial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 4, p. 513-522, 2000.

MURRAY BE. The life and times of the *Enterococcus*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, n. 1, p. 46-65, Jan. 1990.

NOBLE WC, VIRANI Z, CREE RGA. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiology Letters** v.93, p.195–198,1992.

PATEL R, PIPER K, COCKERILL FR III, STECKELBERG JM, YOUSTEN AA. The biopesticide *Paenibacillus popilliae* has a vancomycin resistance gene cluster homologous to the enterococcal VanA vancomycin resistance gene

cluster. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.44, n.3, p. 705-709, 2000.

REYNOLDS PE. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. **European Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v.8, n.11, p. 943-950, 1989.

SCHLEIFER KH, KILPPER-BÄLZ R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom.rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology**, v. 34, n.1, p.31-34, 1984.

SHANKAR N; BAGHDAYAN AS; GILMORE MS. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin resistant *Enterococcus faecalis*. **Nature**, v. 417, jun. 2002.

SHANKAR V, BAGHDAYAN AS, HUYCKE M M, LINDAHL G, GILMORE M. Infection derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein. **Infection and Immunity**, v.67, p.193-200, 1999.

SILVEIRA GP, NOME F, GESSER JC, MANDOLESI SÁ M. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 29, n. 4, 2006.

STECHER B; MAIER L; HARDT WD. 'looming' in the gut: how dysbiosis might contribute to pathogen evolution. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, p. 277-284, 2013.

STEVENS DL. The role of vancomycin in the treatment paradigm. **Clinical Infectious Diseases**; 42(Suppl 1):S51-7 (in this supplement), 2006.

STILES M.E, HOLZAPFEL WH. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology**, v.36, p.1-29, 1997.

SU YA, SULAVIK MC, HE P, MAKINEN KK, MAKINEN PL, FIEDLER S, WIRTH R, CLEWELL DB. Nucleotide sequence of the gelatinase gene (*geE*) from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. **Infection and Immunity**, v. 59, p. 415-420, 1991.

TAVARES W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n.3, p.281-301,2000.

TENOVER FC, MOELLERING RC JR. The rationale for revising the Clinical and Laboratory Standards Institute vancomycin minimal inhibitory concentration interpretive criteria for *Staphylococcus aureus*. **Clinical Infectious Diseases**, v.44, p.1208-1215, 2007.

THOMAS CM, NIELSEN KM. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, 2005.

TORRES C, TENORIO C, PORTILLO A, GARCÍA M, MARTÍNEZ C, DEL CAMPO R, RUIZ- LARREA F, ZARAZAGA M. Intestinal colonization by *vanA*- or *vanB2*- containing enterococcal isolates of healthy animals in Spain. **Microbial Drug Resistance**, v.9 (Suppl 1),p. S47-52, 2003.

TORTORA GJ, FUNKE BR, CASE CL. **Microbiologia**,10 ed., Ed. Artmed, Porto Alegre, 2012.

UTTLEY AH, COLLINS CH, NAIDOO J, GEORGE RC. Vancomycin-resistant enterococci. **Epidemiology and Infectious**. n.103, p.173-181, 1989.

VELASCO RG, ACOSTA KH, ADRIANA G, CHÁVES M. Los factores de virulencia y la actual importância clínica de *Enterococcus faecalis*. **Acta Laboratories**, v.14, n.1, p.9-10, 2002.

VERGIS EM, SHANKAR N, CHOW JW, HAYDEN MK, SNYDMAN DR, ZERVOS M J, LINDEN PK, WAGENER MM, MUDER RR. Association between the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin, and enterococcal surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. **Clinical Infectious Diseases**, v.35, p.570-575, 2002.

WERNER Guido. Current trends of emergence and spread of vancomycin-resistant enterococci. In: PANA Marina. **Antibiotic resistant bacteria – a continuous challenge in the new millennium**. 1 ed. Croácia: InTech , 2012. p.303-576.

WERNER G, COQUE TM, HAMMERUM AM, HOPE R, HRYNIEWICZ W, JOHNSON A, KLARE I, KRISTINSSON KG, LECLERCQ R, LESTER CH, LILLIE M, NOVAIS C, OLSSON-LILJEQUIST B, PEIXE LV, SADOWY E, SIMONSEN GS, TOP J, VUOPIO- VARKILA J, WILLEMS RJ, WITTE W, WOODFORD N. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. **Euro Surveillance**, v.13, n.47, p.1-11, 2008a.

WERNER G, STROMMENGER B, WITTE W. Acquired vancomycin resistance in clinically relevant pathogens. **Future Microbiology**, v.3, p. 547–362, 2008b.

WERNER G, DAHL KH, WILLEMS RJ. Composite elements encoding antibiotic resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. In: Kobayashi N, **Drug Resistance in Enterococci: Epidemiology and Molecular Markers**. Fort P.O., Trivandrum, Kerala: Research Signpost, p.157–208, 2006.

WIRTH R. The sex pheromone system of *Enterococcus faecalis*—more than just a plasmid-collection mechanism. **European Journal Biochemistry**, v.222, p.235–246, 1994.

WOZNIAK RAF; WALDOR MK. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. **Nature Reviews Microbiology**, v.8, p. 552-563, 2010.

ZARRILLI R, TRIPODI MF, POPOLO AD, FORTUNATO R, BAGATTINI M, CRISPINO M, FLORIO A, TRIASSI M, UTILI R. Molecular epidemiology of high-level aminoglycoside-resistant enterococci isolated from patients in a university hospital in southern Italy. **Journal of Antimicrobial of Chemotherapy**, v. 56, p.827-835, 2005.

ZATYKA M, THOMAS CM. Control of genes for conjugative transfer of plasmids and other mobile elements. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 21, ed.4, p.291-319, 1998.

PARTE 1
TRANSFERÊNCIA VIA PROCESSO CONJUGATIVO DO GENE *vanA* ENTRE
ISOLADOS DE *Enterococcus* spp.

Transferência via processo conjugativo do gene *vanA* entre isolados de *Enterococcus* spp.

Márcia Regina Terra; Márcia Cristina Furlaneto; Luciana Furlaneto-Maia.

Resumo

Enterococcus spp. tem emergido como patógeno de importantes infecções nosocomiais e esta emergência pode estar associada à habilidade natural de aquisição de plasmídeos que conferem resistência a antimicrobianos. O presente estudo teve como objetivo avaliar a transferência *in vitro* do gene *vanA*, via processo conjugativo, entre isolados de *E. faecium* e *E. faecalis*. O perfil genotípico e fenotípico de 30 isolados de *Enterococcus* spp. foi determinado por meio de reação em cadeia de polimerase (PCR) com os oligonucleotídeos iniciadores *vanA*, *tetL*, *gelE* e *cpd* e pela técnica de Concentração Inibitória Mínima (CIM). A transferência do gene *vanA* *in vitro* foi demonstrada em caldo Mueller Hinton na razão de 1:1 (doador: receptor), seguido de incubação a 37°C, a 80 rpm, por 6 horas. A cada 2 horas 100 µl do co-cultivo foi semeado em ágar Mueller Hinton contendo Tetraciclina (16 µg/mL) e Vancomicina (32 µg/mL), e as placas foram incubadas a 37°C por 18 horas, com posterior contagem de UFC/mL. A frequência de transconjugantes foi obtida pela razão do número de transconjugantes pelo número de células doadoras utilizadas no co-cultivo. A estabilidade plasmidial e a confirmação dos transconjugantes foi realizada por PCR com os oligonucleotídeos citados acima. A mesma metodologia foi realizada com doador morto por aquecimento. A análise do perfil genotípico e fenotípico nos proporcionou formar 30 pares, sendo 10 isolados doadores e 3 isolados receptores. Foram obtidos transconjugantes do gene *vanA* em todos os pares e tempos testados. A maior frequência obtida foi de $3,5 \times 10^{-5}$ e a menor foi de $0,3 \times 10^{-5}$ UFC/mL, com duas horas de co-cultivo. Não obtivemos transconjugantes com a técnica doador morto, excluindo assim o processo de

transformação como método de transferência do gene. Foi observado 100% de estabilidade com todos os pares.

Palavra-chave: *Enterococcus* spp., conjugação, resistência, vancomicina, transconjugante.

1 INTRODUÇÃO

Enterococcus spp. são ubíquos, sendo comumente isolados de plantas, solo, água e alimentos. Esta ampla distribuição provavelmente é resultado da disseminação de origem fecal e de sua tolerância natural a ambientes adversos (GIRAFFA, 2002). *Enterococcus* spp. também pode ser isolado de mamíferos do qual fazem parte da microbiota normal do trato gastrointestinal (revisado por OGIER *et al.*, 2008).

Por muito tempo acreditou-se que *Enterococcus* spp. não ocasionava doenças em humanos, não sendo considerado de importância médica (FOULQUIE MORENO *et al.*, 2006). Atualmente, é uma das bactérias Gram-positivas mais importantes, por ser comumente isolada e estar envolvida em importantes infecções nosocomiais (revisado por FISHER; PHILLIPS, 2009). No Brasil, *Enterococcus* spp tem sido a oitava causa de infecções hematogênicas (MARRA *et al.*, 2011).

Sua emergência se deve em parte a redução intrínseca de suscetibilidade a maioria das classes de antimicrobianos e a habilidade de adquirir e expressar novos determinantes de resistência (revisado por HEGSTAD *et al.*, 2010). A transferência natural de genes frequentemente ocorre por meio de transformação (DNA livre), transdução (bacteriófago) ou conjugação (plasmídeo) (SOREK *et al.*, 2007) e dentre estes mecanismos a conjugação é o mais prevalente (MATHUR *et al.*, 2005).

A aquisição de material genético em *Enterococcus* spp. via processo conjugativo pode ser iniciada pela produção e secreção de feromônio pela célula receptora, o qual induz a célula doadora, que alberga um plasmídeo conjugativo (CLEWELL *et al.*, 2002) a expressar proteínas de

membrana que promovem a agregação entre as células do par conjugativo (THOMAS *et al.*, 2005).

No contexto clínico, os glicopeptídeos são utilizados como último recurso no tratamento de patógenos Gram-positivos multirresistentes, a exemplo de *Enterococcus* (HUYCKE *et al.*, 1998). A emergência de enterococos resistentes a glicopeptídeos tornou-se um importante problema para o tratamento de infecções em humanos (CETINKAYA *et al.*, 2000), resultando no aumento do risco de morte em pacientes infectados por VRE (FISHER; PHILLIPS, 2009).

Em vista do exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a transferência *in vitro* do gene *vanA*, via processo conjugativo, entre isolados de *E. faecium* e *E. faecalis*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAGEM

Neste estudo foram avaliados 30 isolados clínicos estocados em Brain Heart Infusion acrescido de 20% de glicerol e mantidos sob -20°C, sendo 7 *E. faecalis* e 23 *E. faecium*, provenientes de urina, swab retal e orotraqueal de pacientes do Hospital Universitário de Maringá-PR, no período de 2008-2010 (Tabela 2).

2.2 DETECÇÃO E LOCALIZAÇÃO DO GENE DE RESISTÊNCIA *VAN A*, DOS MARCADORES SELETIVOS E DO GENE *CPD*

Para a detecção do gene *vanA*, dos marcadores seletivos empregados nos testes de conjugação (*tetL* e *geIE*) e do gene *cpd* foi realizada a extração de DNA genômico pela técnica de fervura conforme descrito em Marques e Suzart (2004). Para a verificação da localização dos genes *vanA* e *tetL* foi realizada a extração do DNA plasmidial (pDNA) utilizando o kit comercial innuPREP Plasmid Kit (analytikjena-Biometra). As reações de PCR

foram realizadas empregando os oligonucleotídeos iniciadores listados na Tabela 2.

As reações foram realizadas para um volume final de 20 µL contendo: 10 ng de DNA, 1,0U Taq DNA polimerase (Invitrogen), 10X Tampão da Taq, 2,5mM de MgCl₂, 0,17mM de cada dNTP, 1 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador. As condições da PCR foram: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguido por 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, a temperatura de anelamento ideal para cada oligonucleotídeo (Tabela 1) por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, e extensão final a 72°C por 10 minutos. Como controle negativo foi utilizado todos os reagentes sem a amostra de DNA. A amplificação foi realizada em termociclador (Techne-TC3000). Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose a 1,0%, corados em brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados com sistema computadorizado L-PIX ST (LOCCUS). O tamanho do produto amplificado foi comparado com o marcador de DNA ladder de 1Kb plus (Amersham Pharmacia Biotech).

2.3 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os antimicrobianos vancomicina (HIMEDIA) e tetraciclina (HIMEDIA) foi estabelecida segundo a metodologia de microdiluição em caldo preconizada pelo CLSI (2011). Foi realizada a leitura espectrofotométrica em comprimento de onda de 540 nm, sendo classificadas como resistentes os isolados que cresceram na concentração ≥ 32 µg/mL de vancomicina e ≥ 16 µg/mL para tetraciclina (CLSI, 2011). Como controle foi utilizada a cepa *E. faecalis* ATCC 29212.

2.4 TRANSFERÊNCIA VIA PROCESSO CONJUGATIVO *IN VITRO*

2.4.1 Seleção dos Isolados e Preparo do Inoculo

Os isolados doadores e receptores do gene *vanA* foram selecionados com base nos perfis genotípico e fenotípico.

O pré-cultivo foi realizado transferindo 0.02 mL de células para tubo de ensaio contendo 3 mL de Mueller Hinton caldo (MH-HIMEDIA). Os tubos foram incubados a 37°C, a 180 rotações por minuto (rpm) por 18 horas. Posteriormente foi realizado o sincronismo celular transferindo 0.02 mL do pré-cultivo e incubando sob as mesmas condições. Após a incubação foi realizado o ajuste da concentração celular, em solução salina 0,85%, correspondente a concentração 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ células/mL).

2.4.2 Experimento de Conjugação em Meio Mueller-Hinton

Nos ensaios de conjugação foram adicionados 500µl de cultivo do isolado doador e 500µl do isolado receptor (razão de 1:1) em 3 mL de MH. A mistura foi homogeneizada e incubada a 37°C sob agitação de 80 rpm.

A cada 2 horas (por até 6 horas) uma alíquota de 0,1 mL do co-cultivo foi semeado pela técnica de *spread plate* na superfície do meio Mueller Hinton Seletivo (MHS) contendo tetraciclina (16 µg/mL) e vancomicina (32 µg/mL). As placas foram incubadas a 37°C por 18 horas. Posteriormente, foi realizada a contagem de Unidade Formadora de Colônia (UFC/mL). O experimento foi realizado em triplicata.

A frequência de ocorrência de transconjugantes foi estabelecida pela razão entre o número de transconjugantes pelo número de células doadoras adicionadas no co-cultivo (DARINI, 1996).

2.5 TÉCNICA DO DOADOR MORTO

Para a realização da técnica do doador morto as células doadoras foram submetidas a 100°C por 30 minutos previamente ao ensaio de conjugação, o qual foi realizado como descrito no item anterior. Para verificar a

viabilidade das células doadoras 100µL da cultura fervida foi semeada em ágar MH e incubada a 37°C por 18 horas.

2.6 ESTABILIDADE PLASMIDIAL E CONFIRMAÇÃO DOS TRANSCONJUGANTES

A fim de verificar a estabilidade do plasmídeo de resistência, 10 colônias transconjugantes foram selecionadas aleatoriamente e submetidas a repiques consecutivos (3 repiques em placas contendo meio MHS, 3 em placas contendo meio sem pressão seletiva e 3 em placas contendo MHS). As placas foram incubadas a 37° por 18 horas.

Para confirmação da transferência do plasmídeo contendo o gene *vanA*, colônias provenientes do último repique da estabilidade plasmidial foram selecionadas aleatoriamente, ou seja, que mantiveram o plasmídeo de resistência, e foram submetidas a extração do DNA genômico e plasmidial, seguido de PCR como descrito anteriormente. As colônias que apresentaram como genótipo resistência a vancomicina, resistência a tetraciclina e presença do gene *geE* foram denominadas transconjugantes.

3 RESULTADOS

O gene *vanA* foi detectado em 80% (24/30) dos isolados clínicos, o gene *tetL* em 23% (7/30), o gene *geE* em 46% (14/30), e o gene *cpd* em 16%(5/30). Baseado nos perfis genotípicos foram selecionados 5 isolados de *E. faecalis* e 8 isolados de *E. faecium* para serem utilizados nos ensaios de transferência do gene *vanA in vitro*, totalizando 30 pares conjugativos. Os isolados doadores (n=10) (Tabela 2) apresentam genótipo *vanA*⁺ (Figura 1), *tetL*⁻, *geE*⁻ e *cpd*⁻. Os isolados receptores (n=3) (Tabela 3) apresentam genótipo *vanA*⁻ (Figura 1), *tetL*⁺, *geE*⁺ (Figura 2A) e *cpd*⁺ (Figura 2B).

A verificação da localização dos genes *vanA* e *tetL* demonstrou que o gene *vanA* esta contido no DNA plasmidial, enquanto que os gene *tetL* é cromossomal, bem como o gene *geE*. A reação de PCR empregando DNA plasmidial resultou na presença de amplicons quando utilizado o

oligonucleotídeo iniciador para o gene *vanA* para os isolados doadores e a ausência de amplicons com o uso do oligonucleotídeo iniciador para o gene *tetL* e *geIE* para os isolados doadores e receptores.

No ensaio de CIM os isolados doadores do gene *vanA* apresentaram resistência a vancomicina e suscetibilidade a tetraciclina. Já os isolados receptores apresentaram suscetibilidade à vancomicina e resistência à tetraciclina. Com base nos dados de CIM para estes antimicrobianos foi estabelecida as concentrações a serem utilizadas no meio seletivo para seleção dos transconjugantes, sendo estas 16µg/mL e 32 µg/mL de tetraciclina e vancomicina, respectivamente.

No ensaio de transferência do gene *vanA* foi observada a ocorrência de conjugação tanto entre pares intraespecíficos como entre pares interespecíficos, sendo que colônias transconjugantes foram obtidas a partir de todos os pares conjugativos e tempos de co-cultivo avaliados (Figura 4, 5 e 6). A maior frequência de transconjugantes foi obtida no co-cultivo do par *E. faecalis* isolado 872 + *E. faecalis* isolado 802. Como observado na Figura 5, este par conjugativo resultou em $3,5 \times 10^{-5}$ transconjugantes após duas horas de co-cultivo e podemos destaca-lo como o melhor par conjugativo formado. A menor frequência de transconjugantes foi obtida no co-cultivo do par *E. faecalis* isolado 906+ *E. faecium* isolado 1115. Como observado na Figura 6, este par conjugativo resultou em $0,3 \times 10^{-5}$ transconjugantes após duas horas de co-cultivo.

A realização da técnica de doador morto resultou na ausência de crescimento de colônias doadoras e de colônias provenientes dos pares formados no ensaio de transferência do gene *vanA*.

Quanto a verificação da manutenção do plasmídeo em *Enterococcus* spp. transconjugantes após repiques consecutivos em meio seletivo e não seletivo, foi observado o crescimento de 100% das colônias transconjugantes selecionadas. Empregando-se a reação de PCR foi observado a presença de amplicons quando utilizado o oligonucleotídeo iniciador para o gene *vanA* e a presença de amplicons com o uso do oligonucleotídeo iniciador para o gene *tetL* e *geIE*, confirmando a transferência intraespecífica e interespecífica do gene *vanA* *in vitro* via processo conjugativo. O transconjugante apresentou como genótipo *vanA*⁺ *tetL*⁺ e *geIE*⁺.

4 DISCUSSÃO

Corroborando com nosso trabalho, diversos estudos tem demonstrado a prevalência de cepas de ERV isoladas de infecções nosocomiais nas quais foi detectada a presença do gene *van*, principalmente *vanA* que é um dos principais genes relacionados a altas taxas de resistência a vancomicina e também tem sido salientado como um dos principais fatores que propicia a emergência de enterococos como um importante agente etiológico de infecções nosocomiais dentre as bactérias Gram-positivas (ZARRILLI *et al.*, 2005; CAMARGO *et al.*, 2008; WERNER *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2012).

O gene *vanA* assim como o gene *tetL* podem ser genes cromossomais ou plasmidiais (revisado por CETINKAYA *et al.*, 2000; CHOPRA *et al.*, 2001; revisado por COURVALIN, 2006). Já o gene *geI* é cromossomal (KOCH *et al.*, 2004). A verificação da localização do gene *vanA* demonstrou que o gene *vanA* esta contido no DNA plasmidial dos isolados doadores, enquanto que os genes *tetL* e *geI* estão contidos no DNA cromossomal dos isolados receptores, desta forma o gene *vanA* é passível de ser transferido via processo conjugativo (WOZNIAK *et al.*, 2010; STECHER *et al.*, 2013) e os genes *tetL* e *geI* podem ser utilizados como marcadores seletivos.

O gene *cpd* codifica a expressão do feromônio sexual, sendo exteriorizado pelo receptor e propiciando a agregação de doador e receptor possibilitando o contato necessário para que ocorra a conjugação (CLEWELL *et al.*, 1985; 2000; DUNNY *et al.*, 2001; WARDAL *et al.*, 2010). Todos nossos isolados receptores possuem os genes *cpd*, podendo assim ter promovido a transferência do gene *vanA* pelo mecanismo de conjugação.

O teste de microdiluição em caldo estabeleceu a concentração inibitória mínima para os antimicrobianos vancomicina e a tetraciclina, sendo estes valores os utilizados na seleção e estabilidade plasmidial dos transconjugantes, corroborando com os trabalhos realizados por Lester *et al.* (2006) Niederh usern *et al.* (2011) e Lebreton *et al.* (2011).

A presença de transconjugantes em meio seletivo e a confirmação do gene *vanA* por PCR, somado a ausência do crescimento de

colônias pela técnica de doador morto, exclui a possibilidade de que a transferência tenha ocorrido via processo de transformação. Clewell (1990) em seus estudos salientou que enterococos é amplamente reconhecido pela sua capacidade de transferência de material genético por conjugação, onde os plasmídeos são eficientemente transferidos em taxas relativamente altas em cultivo líquido.

Nas condições testadas foi observada a transferência do gene *vanA* via processo conjugativo em todos os tempos de co-cultivo e pares formados, independente de serem intra ou interespecíficos. No entanto, os melhores resultados foram obtidos com o par intraespecífico formado pelo receptor *E. faecalis* isolado 872 e o doador *E. faecalis* isolado 802 e a menor frequência obtida foi com o par interespecífico formado pelo receptor *E. faecalis* isolado 906 e pelo doador *E. faecium* isolado 1115. Resultados similares foram obtidos por Paoletti *et al.* (2006), Bourgeois-Nicolaos *et al.* (2005) e Werner *et al.* (2011), com altas taxas de transconjugantes entre os pares intraespecíficos, e frequências menores entre os pares interespecíficos. Nossos estudos sugerem que a frequência dos transconjugantes são isolados dependentes, com variações de frequência durante o tempo de co-cultivo.

A manutenção do plasmídeo de resistência nas colônias transconjugantes em meio seletivo e não-seletivo foi demonstrado em nosso estudo. Werner *et al.* (2011), relatam que alguns requisitos são importantes para a manutenção de plasmídeos de resistência em novos receptores como a eficiência de transferência e a capacidade de replicação na célula receptora.

5 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou a ocorrência com êxito da transferência do gene *vanA* via processo conjugativo de isolados clínicos de *E. faecium* para isolados de *E. faecium* e *E. faecalis*. Foi observado o crescimento de transconjugantes em todos os tempos de co-cultivo e com todos os pares intra e interespecíficos. A frequência foi isolado dependente, onde os doadores e os receptores apresentaram variações nas frequências nos

diferentes tempos e pares formados. Cabe evidenciar, o par conjugativo formado pela espécie *E. faecalis* (872+802) como o que apresentou o maior número de transconjugantes independente do tempo de co-cultivo dentre todos os pares. O sucesso da transferência via conjugação pode ter sido propiciada pela presença do gene *cpd* que codifica a expressão do feromônio sexual nas bactérias receptoras. O teste de doador morto corroborou que a transferência do gene *vanA* ocorreu via processo conjugativo e não por transformação, pois ao empregar doadores submetidos a fervura não houve crescimento celular.

Há poucos estudos relacionados à importância da conjugação no processo de transferência do gene de resistência *vanA* e sua relação com a emergência de cepas de ERV. Desta forma, é necessário o desenvolvimento de novos estudos, como o presente trabalho, para averiguar a problemática da conjugação na transferência do gene *vanA* em *Enterococcus* spp.

AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa foi financiada pela Fundação Araucária e Márcia Regina Terra é bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS

- BELL IM, PATON JC, TURNIDGE J. Emergence of vancomycin-resistant enterococci in Australia: phenotypic and genotypic characteristics of isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p.2187–2190, 1998.
- CAMARGO I LBC; ZANELLA RC; GILMORE MS; DARINI ALC. Virulence factors in vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus faecalis* from Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.273-278, 2008.
- CETINKAYA Y, FALK P, MAYHAL CG. Vancomycin-Resistant Enterococci **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, n.4, p.686-707, 2000.
- CHOPRA I, ROBERTS MC. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, p. 232–260, 2001.
- CLEWELL DB and DUNNY GM. Conjugation and genetic exchange in enterococci. In M. S. Gilmore(Ed.), *The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*. American Society for Microbiology Press, Washington D.C., 2002. p.265-300
- CLEWELL DB , PONTIUS LT, AN FY, IKE Y, SUZUKI A, NAKAYAMA J . Nucleotide sequence of the sex pheromone inhibitor (iAD1) determinant of *Enterococcus faecalis* conjugative plasmid pAD1. **Plasmid**, v. 24, ed.2, p.156–161, 1990.
- CLEWELL DB, Y An F, WHITE B, GAWRON-BURKE C. *Streptococcus faecalis* sex pheromone (cAM373) also produced by *Staphylococcus aureus* and identification of a conjugative transposon (Tn918). **Journal of Bacteriology**, v.162, p.1212-1220, 1985.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI/NCCLS). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement**. CLSI/NCCLS document M100-S21, 2011.
- COURVALIN PM. Vancomycin resistance in Gram-positive cocci. **Clinical Infectious Diseases**, 42 Suppl, v.1, p. S25–34, 2006.
- COURVALIN PM, CARLIER C, CHABBERT YA. Plasmid-linked tetracycline and erythromycin resistance in group D 'streptococcus'. **Annales de l'Institut Pasteur** (Paris); v.123, p.755–759, 1972.
- DARINI, ALC. A genetic study of a *Staphylococcus aureus* plasmid involving cure and transference. **São Paulo Medical Journal**, v.14, n.1, p.1068-1072, 1996.

- EATON TJ, GASSON M. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n. 4, p.1628-1635, 2001.
- FISHER K, PHILLIPS C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, v.155, p. 1749–1757, 2009.
- FOULQUIÉ MORENO MR, SARANTINOPOULOS P, TSAKALIDOU E, DE VUYST L. The role and application of enterococci in food and health, **International Journal of Food Microbiology**, v, 106, p.1-24, 2006.
- GEVERS D, DANIELSEN M, HUYS G, SWINGS J. Molecular characterization of *tet(M)* genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry sausage. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.1270–1275, 2003.
- GIRAFFA G. Enterococci from foods. **FEMS Microbiology Reviews**, v.26, ed.2, p.163-171, 2002.
- HEGSTAD K, MIKALSEN T, COQUE TM, WERNER G, SUNDSFJORD A. Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. **Clinical Microbiology and Infectious**, v.16, n.6, p.541- 554, 2010.
- HUYCKE MM, SAHM DF, GILMORE MS. Multiply resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. **Emerging Infectious Diseases**, v.4, p.239–249, 1998.
- JACOB AE, HOBBS SJ. Conjugal transfer of plasmid-borne multiple antibiotic resistance in *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes*. **Journal of Bacteriology**, v.117, p. 360–372, 1974.
- KOCH S, HUFNAGEL M, THEILACKER C, HUEBNER J. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. **Vaccine**, v.22, p.822–830, 2004.
- LESTER CH, FRIMODT-MØLLER N, SØRENSEN TL, MONNET DL, HAMMERUM AM. *In vivo* transfer of the *vanA* resistance gene from an *Enterococcus faecium* isolate of animal origin to an *E. faecium* isolate of human origin in the intestines of human volunteers. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, p.596–599, 2006.
- LEBRETON F; DEPARDIEU F; BOURDON N; FINES-GUYON M; BERGER P; CAMIADE S; LECLERCQ R; COURVALIN P; CATTOIR V. d-Ala-d-Ser *vanN*-Type Transferable Vancomycin Resistance in *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n.10, p. 4606-4612, 2011.
- MANNU L, PABA A, DAGA E, COMUNIAN R, ZANETTI S, DUPRE I, SECHI LA. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic

resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. **International Journal of Food Microbiology**, v.88, p. 291– 304, 2003.

MARRA AR, CAMARGO L FA, PIGNATARI ACC, SUKIENNIK T, BEHAR PR, MEDEIROS EAS, RIBEIRO J, GIRÃO E, CORREA L, GUERRA C, BRITES C PEREIRA CAP, CARNEIRO I, REIS M, DE SOUZA M A, TRANCHESI R, BARATA CU, EDMOND MB AND THE BRAZILIAN SCOPE STUDY GROUP. Nosocomial bloodstream infections in brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Journal of Clinical Microbiology**, v.49, n.5, p. 1866-1871, 2011.

MARQUES EB, SUZART S. Occurrence of virulence-associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina. **Journal of Medical Microbiology**, v.53, p.1069-1073, 2004.

MATHUR S, SINGH R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.105, p. 281-295, 2005.

OGIER JC, SERROR P. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. **International Journal of Food Microbiology**, v.126, p.291–301, 2008.

OLIVEIRA AC; DAMASCENO QS; PISCOYA M; NICOLI JR. Epidemiologic characteristics of resistant microorganisms present in reserves from an intensive care unit. **American Journal of Infection Control**, v.40 186-187, 2012.

SILVA LPP; PITONDO-SILVA A; MARTINEZ R; DARINI ALC. Genetic features and molecular epidemiology of *Enterococcus faecium* isolated in two university hospitals in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.74, p. 267–271, 2012.

SOREK R, ZHU Y, CREEVEY CJ, FRANCINO MP, BORK P, RUBIN EM. Genome-wide experimental determination of barriers to horizontal gene transfer. **Science**, v.318, p. 1449–1452, 2007.

STECHER B; MAIER L; HARDT WD. ‘loo ming’ in the gut: how dysbiosis might contribute to pathogen evolution. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, p. 277-284, 2013.

THOMAS CM, NIELSEN KM. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, 2005.

WARDAL V; SADOWY E; HRYNIEWICZ. Complex nature of enterococcal pheromone-responsive plasmids. **Polish Journal of Microbiology**, v. 59, n.2, p.79-87, 2010.

WERNER G, FREITAS AR, COQUE TM, SOLLID JE, LESTER C, HAMMERUM AM, GARCIA-MIGURA L, JENSEN LB, FRANCIÀ MV, WITTE W, WILLEMS RJ, SUNDSFJORD A. Host range of enterococcal *vanA* plasmids

among Gram-positive intestinal bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.66, p.273-282, 2011.

WOZNIAK RAF; WALDOR MK. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. **Nature Reviews Microbiology**, v.8, p. 552-563, 2010.

ZARRILLI R, TRIPODI MF, POPOLO AD, FORTUNATO R, BAGATTINI M, CRISPINO M, FLORIO A, TRIASSI M, UTILI R. Molecular epidemiology of high-level aminoglycoside-resistant enterococci isolated from patients in a university hospital in southern Italy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, p.827-835, 2005.

Lista de Figuras

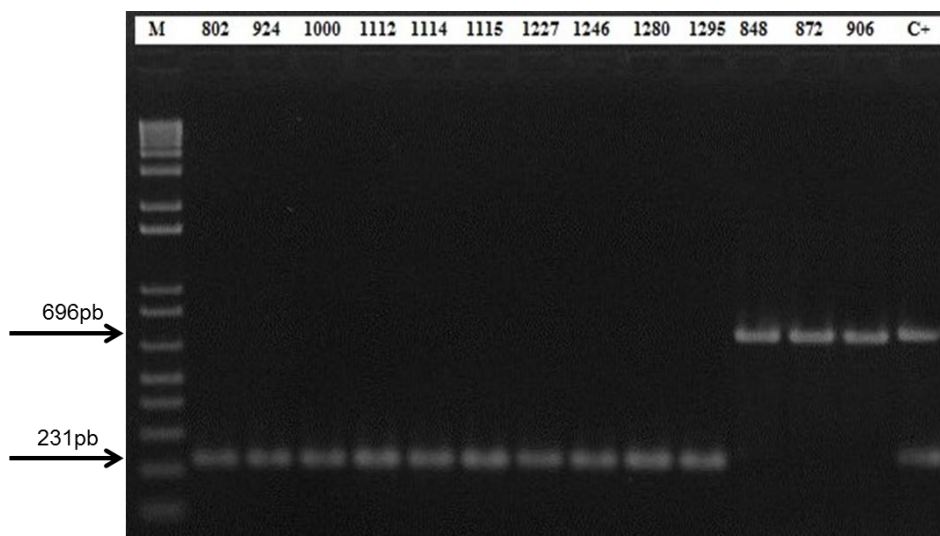


Figura 1: gel de eletroforese com produto da amplificação do gene *vanA* (231 pb *E. faecium*) e *tetL* (696 pb) utilizando DNA total de isolados doadores e receptores.

M= (marcador molecular de 1KB plus), C+ =(controle positivo *Staphylococcus aureus* ATCC 29213).

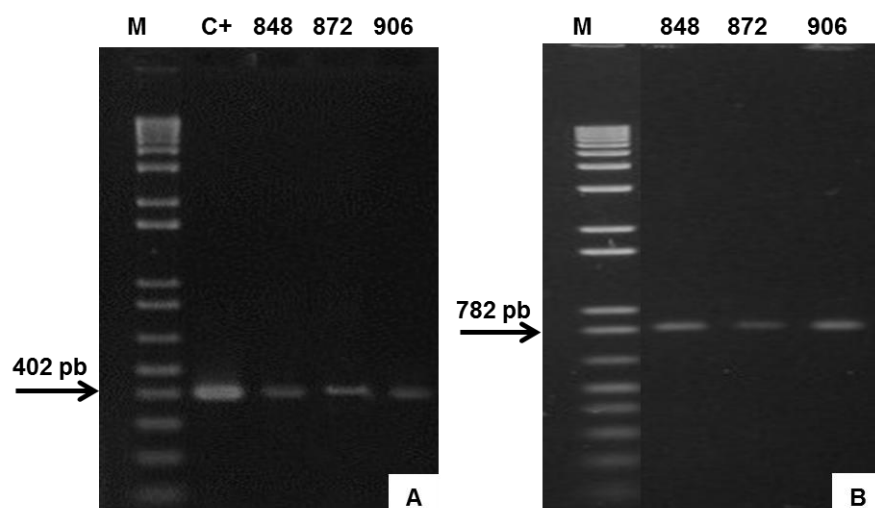


Figura 2: A) detecção da presença do gene *geE* (402 pb); em **B)** detecção da presença do gene *cpd* (782 pb), ambas nos isolados de *Enterococcus* spp. doadores.

M= (marcador molecular de 1KB plus), C+ =(controle positivo *Enterococcus faecalis* ATCC 29212).

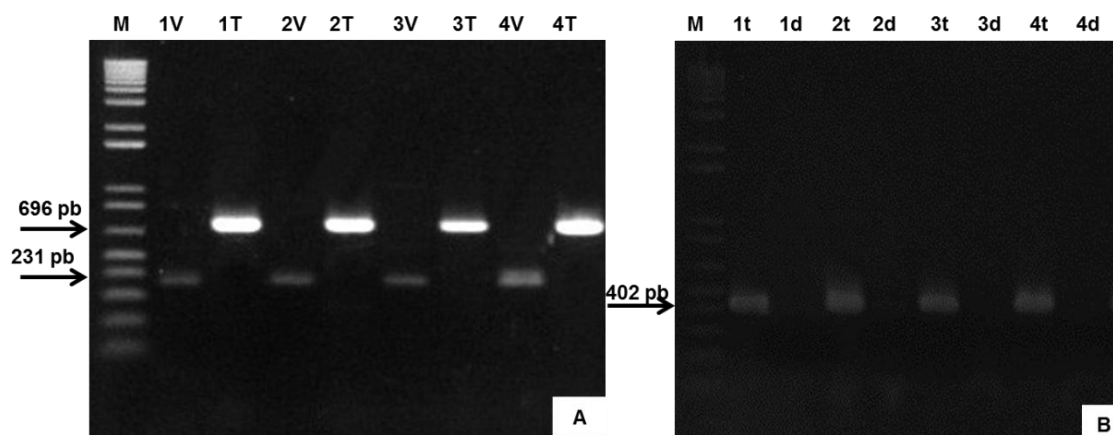


Figura 3: **A)** detecção por PCR do gene *tetL* (696 pb) e *vanA* (231 pb *E. faecium*) nos transconjugantes provenientes da conjugação do receptor 906 com doadores; em **B)** detecção do gene *geE* (402 pb) nos pares conjugativos formados pelo receptor 906 e demais doadores. M= (marcador molecular de 1KB plus); C+ =(controle positivo *E. faecalis* ATCC 29212); **A)** V (detecção do gene *vanA*); T (detecção do gene *tetL*); 1V (906+802), 1T (906+802), 2V (906+924), 2T (906+924), 3V (906+1000), 3T (906+1000), 4V (906+1112) e 4T (906+1112); em **B)** t (transconjugante); d (doador); 1t (906+802),1d(802), 2t (906+924), 2d (924),3t (906+1000z), 3d (1000), 4t (906+1112) e 4d (1112).

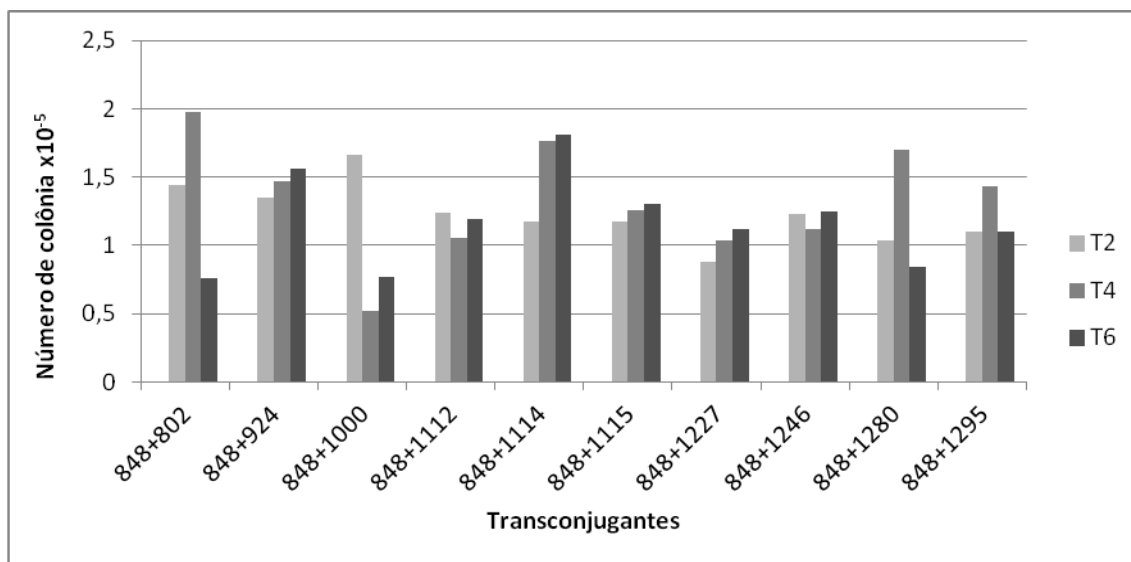


Figura 4: Frequência dos transconjugantes advindos do ensaio de transferência do gene *vanA* entre o isolado receptor 848 com os isolados doadores.

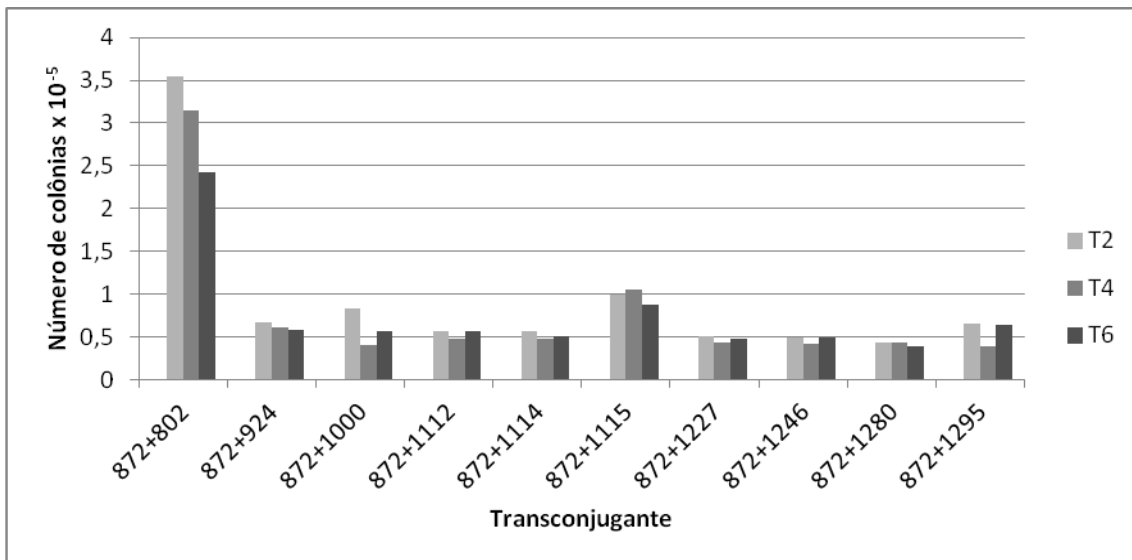


Figura 5: Frequência dos transconjugantes advindos do ensaio de transferência do gene *vanA* entre o isolado receptor 872 com os isolados doadores.

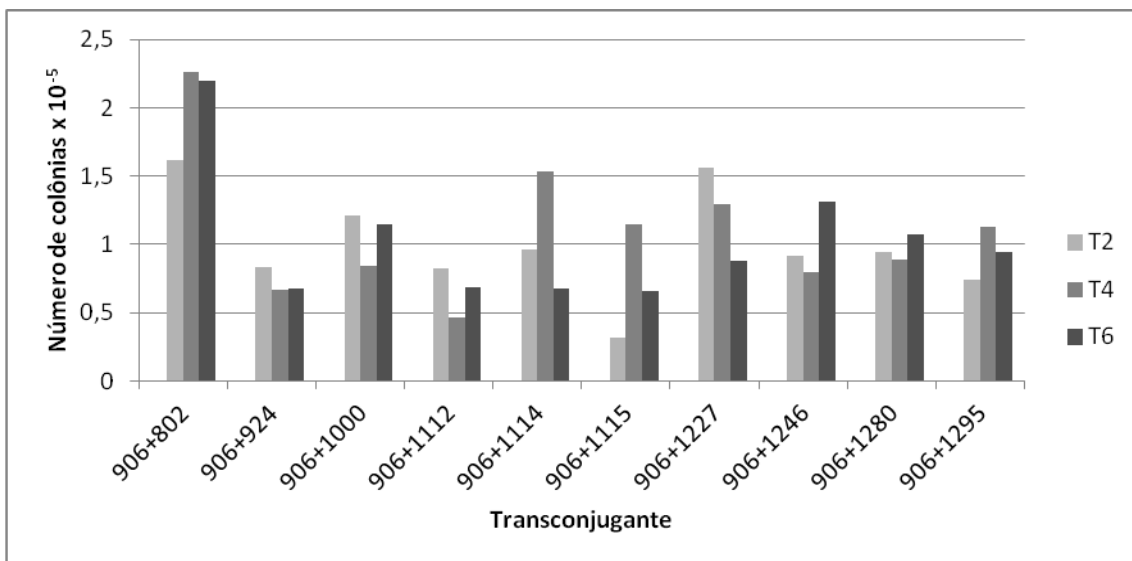


Figura 6: Frequência dos transconjugantes advindos do ensaio de transferência do gene *vanA* entre o isolado receptor 906 com os isolados doadores.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Oligonucleotídeos iniciadores e condições para amplificação dos genes utilizados nos experimentos de conjugação em *Enterococcus* spp.

Gene	Sequência nucleotídica (5'- 3')	Ta (°C)	Tamanho do produto (bp)	Referência
<i>cpd</i>	TGGTGGGTTATTTTTCAATTC TACGGCTCTGGCTTACTA	50	782	Eaton; Gasson, (2001)
<i>gelE</i>	AGTTCATGTCTATTTTCTTCAC CTTCATTATTTACACGTTTG	56	402	Mannu <i>et al.</i> , (2003)
<i>vanA</i>	GTAGGCTGCGATATTCAAAGC CGATTCAATTGCGTAGTCCAA	56	231 <i>E.faecium</i>	Bell <i>et al.</i> , (1998)
<i>tetL</i>	GTMGTTGCGCGCTATATTCC GTGAAMGRWAGCCACCTAA	56	696	Gevers <i>et al.</i> , (2003)

cpd (feromônio sexual) ; *gelE* (gelatinase); *vanA*(vancomicina A); *tetL* (tetraciclina L) ; Ta (°C) = temperatura de anelamento.

Tabela 2: Isolados de *Enterococcus* spp. denominados doadores e respectivas características genotípicas e fenotípicas.

Amostra	Fonte	Espécie	Fenótipo		Genótipo			
802	urina	<i>E. faecalis</i>	T ^S	V ^R	<i>tetL</i> -	<i>vanA</i> +	<i>gelE</i> -	<i>cpd</i> -
924	Swab retal	<i>E. faecium</i>	T ^S	V ^R	<i>tetL</i> -	<i>vanA</i> +	<i>gelE</i> -	<i>cpd</i> -
1000	urina	<i>E. faecium</i>	T ^S	V ^R	<i>tetL</i> -	<i>vanA</i> +	<i>gelE</i> -	<i>cpd</i> -
1112	Swab retal	<i>E. faecalis</i>	T ^S	V ^R	<i>tetL</i> -	<i>vanA</i> +	<i>gelE</i> -	<i>cpd</i> -
1114	Swab retal	<i>E. faecium</i>	T ^S	V ^R	<i>tetL</i> -	<i>vanA</i> +	<i>gelE</i> -	<i>cpd</i> -
1115	Swab retal	<i>E. faecium</i>	T ^S	V ^R	<i>tetL</i> -	<i>vanA</i> +	<i>gelE</i> -	<i>cpd</i> -
1227	urina	<i>E. faecium</i>	T ^S	V ^R	<i>tetL</i> -	<i>vanA</i> +	<i>gelE</i> -	<i>cpd</i> -
1246	urina	<i>E. faecium</i>	T ^S	V ^R	<i>tetL</i> -	<i>vanA</i> +	<i>gelE</i> -	<i>cpd</i> -
1280	Swab retal	<i>E. faecium</i>	T ^S	V ^R	<i>tetL</i> -	<i>vanA</i> +	<i>gelE</i> -	<i>cpd</i> -
1295	Swab retal	<i>E. faecium</i>	T ^S	V ^R	<i>tetL</i> -	<i>vanA</i> +	<i>gelE</i> -	<i>cpd</i> -

Tetraciclina (T); Vancomicina (V); S (Sensível) e R (resistente); + (presença do gene); - (ausência do gene); *tetL* (gene que codifica resistência a tetraciclina); *vanA* (gene que codifica resistência a vancomicina); *gelE* (gene que codifica a produção de gelatinase) e *cpd* (gene que codifica a expressão do feromônio sexual).

Tabela 3: Isolados de *Enterococcus* spp. denominados receptores e respectivas características genotípicas e fenotípicas.

Amostra	Fonte	Espécie	Fenótipo		Genótipo			
848	urina	<i>E. faecalis</i>	T ^R	V ^S	<i>tetL</i> +	<i>vanA</i> -	<i>gelE</i> +	<i>cpd</i> +
872	flúido orotraqueal	<i>E. faecalis</i>	T ^R	V ^S	<i>tetL</i> +	<i>vanA</i> -	<i>gelE</i> +	<i>cpd</i> +
906	urina	<i>E. faecalis</i>	T ^R	V ^S	<i>tetL</i> +	<i>vanA</i> -	<i>gelE</i> +	<i>cpd</i> +

Tetraciclina (T); Vancomicina (V); S (Sensível) e R (resistente); + (presença do gene); - (ausência do gene); *tetL* (gene que codifica resistência a tetraciclina); *vanA* (gene que codifica resistência a vancomicina); *gelE* (gene que codifica a produção de gelatinase) e *cpd* (gene que codifica a expressão do feromônio sexual).

PARTE 2
TRANSFERÊNCIA DO GENE DE RESISTÊNCIA *vanA* VIA PROCESSO
CONJUGATIVO ENTRE ISOLADOS DE *Enterococcus* spp. EM LEITE
RECONSTITUÍDO

Transferência do gene de resistência *vanA* via processo conjugativo entre isolados de *Enterococcus* spp. em leite reconstituído

Márcia Regina Terra ^{*.a}; Márcia Cristina Furlaneto ^a; Luciana Furlaneto-Maia ^b.

^a Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Microbiologia, Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445 Km 380, CEP 86.057-970, Londrina, PR.

^b Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Avenida dos Pioneiros, 3131, CEP 86036-370, Londrina, PR, Brasil.

RESUMO

Enterococcus spp. é considerado um contaminante de alimentos e vem emergindo como patógeno de infecções nosocomiais o que estaria correlacionado a sua habilidade de adquirir plasmídeos de resistência a antimicrobianos. O presente estudo teve como objetivo avaliar a transferência do gene *vanA*, via processo conjugativo *in vitro* em leite reconstituído, entre isolados de *E. faecium* e *E. faecalis*. Foi traçado o perfil genotípico e fenotípico de 30 isolados de *Enterococcus* spp. por meio de Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) usando como oligonucleotídeo iniciadores *vanA* e outros marcadores moleculares, e pela técnica de Concentração Inibitória Mínima (CIM), respectivamente. A transferência do gene *vanA*, via processo conjugativo *in vitro* foi realizado em leite reconstituído, com cultivo na razão de 1:1(doador: receptor), sob 80 rpm a 37°C por 6 horas. Foi semeada a cada 2 horas, uma alíquota do co-cultivo em meio MHA seletivo (tetraciclina (16µg/mL) e vancomicina (32µg/mL)). As placas foram incubadas a 37°C por 18 h. Os transconjugantes foram considerados como sendo aqueles que apresentaram perfil

de resistência a vancomicina, resistência à tetraciclina e gelatinase positivo. A estabilidade plasmidial foi verificada e a confirmação da transferência do gene *vanA* foi determinado pela técnica de PCR. Um total de 30 pares foram formados a partir de 10 isolados doadores e 3 receptores. Os transconjugantes foram confirmados pela presença dos genes *vanA*, *tetL* e *gelE*. A análise do perfil genotípico e fenotípico nos proporcionou formar 30 pares, sendo 10 isolados doadores e 3 isolados receptores. Foram obtidos transconjugantes do gene *vanA* em todos os pares e tempos testados. Não obtivemos transconjugantes com a técnica doador morto, excluindo assim o processo de transformação como método de transferência do gene. Foi observado 100% de estabilidade com todos os pares. A disseminação de genes de resistência leva ao aumento da frequência de *Enterococcus* spp. resistente à vancomicina e outros antimicrobianos, dificultando cada vez mais a terapêutica e obrigando-nos a buscar novas alternativas de tratamento.

Palavra-chave: *Enterococcus* spp., conjugação, resistência, vancomicina, transconjugante.

1 INTRODUÇÃO

Enterococcus faz parte do grupo de Bactérias Ácido Lácticas (BAL) e possui como características a resistência a condições extremas de temperatura (60°C/ 30 minutos), pH extremos (4,4 a 9,6) e alta concentração de NaCl (6,5%) e de sais biliares (40% de bile). Tais características propiciam a ubiquidade deste gênero, podendo ser encontrados na água, no solo, em vegetais, em alimentos, especialmente em alimentos de origem animal, leite e seus derivados (revisado por GIRAFFA, 2002; 2003).

Enterococcus faz parte da microbiota tanto do leite cru quanto do pasteurizado, podendo aumentar em número durante a refrigeração do leite e sobreviver após a pasteurização devido à sua natureza psicotrófica e a sua adaptabilidade a diferentes substratos e condições de crescimento. São encontrados em produtos lácteos diferentes espécies de *Enterococcus*, sendo *E. faecalis* e *E.*

faecium as espécies de maior importância (FRANZ *et al.*, 1999; GELSOMINO *et al.*, 2001; GIRAFFA *et al.*, 2003). No entanto, a presença de *Enterococcus* no leite e em queijo pode indicar condições higiênico-sanitárias inadequadas durante a produção e processamento do leite, onde sua presença tem sido indiretamente relacionada com fontes de água contaminadas, equipamento de ordenha e tanques de armazenamentos e com a contaminação direta por fezes humanas e de animais (revisado por FOULQUIÉ MORENO *et al.*, 2006).

Diversos estudos como os realizados por Eaton e Gasson (2001), Franz *et al.* (2001), Gelsomino *et al.*, 2001 e Valenzuela *et al.* (2009) tem demonstrado que além de possuir caracteres de virulência que medeiam à colonização e a infecção no hospedeiro, cepas de *Enterococcus* spp. isoladas de alimentos podem possuir genes de resistência a antimicrobianos como a vancomicina. Um indicativo de que o enterococos resistente à vancomicina (ERV) foi adquirido pelo consumo de alimento é a presença de ERV em indivíduo que não foi hospitalizado ou submetido à antibioticoterapia (revisado por FISHER; PHILIPS, 2009).

O gene *vanA* é o mais comumente detectado em cepas de enterococos resistente a vancomicina (ERV) (FISHER; PHILLIPS, 2009; WERNER *et al.*, 2008a,b) e pode estar contido no DNA cromossomal ou no DNA plasmidial (CETINKAYA *et al.*, 2000; COURVALIN *et al.*, 2006) que esta frequentemente localizado em plasmídeos conjugativos (NOBLE *et al.*, 1992). A conjugação parece ser o mecanismo mais eficaz dentre os mecanismos de transferência horizontal de genes (MAZODIER *et al.*, 1991) e a notável capacidade de *Enterococcus* spp. adquirir informação genética por conjugação pode estar relacionada em parte com sua emergência como importante patógeno de doenças nosocomiais (CLEWELL, 1990) e disseminação da resistência a antimicrobianos.

Haja visto que ensaios de transferência via processo conjugativo *in vitro* podem propiciar elementos para o esclarecimento da disseminação do gene de resistência *vanA* no contexto ambiental o presente estudo teve como objetivo avaliar a transferência do gene *vanA*, via processo conjugativo *in vitro* em leite reconstituído, entre isolados de *E. faecium* e *E. faecalis*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram incluídos neste estudo 30 isolados de origem clínicos, sendo 7 *E. faecalis* e 23 *E. faecium*, provenientes de pacientes do Hospital Universitário de Maringá-PR, no período de 2008-2010. Os isolados estavam acondicionados a -20°C em tubos contendo meio Brain Heart Infusion acrescido de 20% de glicerol.

Para a detecção do gene *vanA*, dos marcadores seletivos empregados nos testes de conjugação (*tetL* e *gelE*) e do gene *cpd* foi realizada a extração de DNA genômico conforme estabelecido por Marques e Suzart (2004). Para a verificação da localização dos genes *vanA* e *tetL* foi realizada a extração do DNA plasmidial (pDNA) utilizando o kit comercial innuPREP Plasmid Kit (analytikjena-Biometra). As reações de PCR foram realizadas empregando os oligonucleotídeos iniciadores listados na Tabela 2.

As reações foram realizadas para um volume final de 20 µL contendo: 10 ng de DNA, 1,0U Taq DNA polimerase (Invitrogen), 10X Tampão da Taq, 2,5mM de MgCl₂, 0,17mM de cada dNTP, 1 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador. As condições da PCR foram: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguido por 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, a temperatura de anelamento ideal para cada oligonucleotídeo (Tabela 1) por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, e extensão final a 72°C por 10 minutos. Como controle negativo foi utilizado todos os reagentes sem a amostra de DNA. A amplificação foi realizada em termociclador (Techne-TC3000). Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose a 1,0%, corados em brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados com sistema computadorizado L-PIX ST (LOCCUS). O tamanho do produto amplificado foi comparado com o marcador de DNA ladder de 1Kb plus (Amersham Pharmacia Biotech).

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os antimicrobianos vancomicina (SIGMA) e tetraciclina (SIGMA) foi estabelecida segundo a metodologia de microdiluição em caldo preconizada pelo CLSI (2011). Foi realizada a leitura espectrofotométrica em comprimento de onda de 540 nm, sendo classificadas como resistentes os isolados que cresceram na concentração ≥ 32 µg/mL de vancomicina e ≥ 16 µg/mL para tetraciclina (CLSI, 2011). Como controle foi utilizada a cepa *E. faecalis* ATCC 29212.

Os isolados doadores e receptores do gene *vanA* foram selecionados com base nos perfis genotípico e fenotípico. O pre-cultivo foi realizado transferindo 0.02 mL de células para tubo de ensaio contendo 3 mL de Mueller Hinton caldo (MH- HIMEDIA). Os tubos foram incubados a 37°C, a 180 rotações por minuto (rpm) por 18 horas. Posteriormente foi realizado o sincronismo celular transferindo 0.02 mL do pré-cultivo e incubando sob as mesmas condições. Após a incubação foi realizado o ajuste da concentração celular, em salina 0,85%, correspondente a concentração 0.5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ células/mL).

Para os ensaios de conjugação foram adicionados 500µl de cultivo do isolado doador e 500µl do isolado receptor (razão de 1:1) em 3 mL de leite. A mistura foi homogeneizada e incubada a 37°C sob agitação de 80 rpm. A cada 2 horas (por até 6 horas) uma alíquota de 0,1 mL do co-cultivo foi semeado pela técnica de *spread plate* na superfície do meio Mueller Hinton Seletivo (MHS) contendo tetraciclina (16 µg/mL) e vancomicina (32 µg/mL). As placas foram incubadas a 37°C por 18 horas. Posteriormente, foi realizada a contagem de Unidade Formadora de Colônia (UFC/mL). O experimento foi realizado em triplicata.

Para a realização da técnica do doador morto as células doadoras foram submetidas a 100°C por 30 minutos previamente ao ensaio de conjugação, o qual foi realizado como descrito anteriormente. A viabilidade das células doadoras foi verificada semeando 100µL da cultura fervida em ágar MH e incubada a 37°C por 18 horas.

A estabilidade do plasmídeo de resistência foi verificada submetendo 10 colônias transconjugantes que foram selecionadas aleatoriamente a repiques consecutivos em meio com e sem antimicrobianos (3 em placas contendo meio MHS, 3 em placas contendo meio sem pressão seletiva e 3 em placas contendo MHS). As placas foram incubadas a 37° por 18 horas.

Colônias provenientes do último repique da estabilidade plasmidial foram selecionadas aleatoriamente para confirmação da transferência do plasmídeo contendo o gene *vanA*, e foram submetidas a extração do DNA genômico e plasmidial, seguido de PCR como descrito anteriormente. As colônias que apresentaram como genótipo resistência a vancomicina, resistência a tetraciclina e presença do gene *gelE* foram denominadas transconjugantes.

3 RESULTADOS

A PCR resultado na detecção do gene *vanA* em 80% (24/30) dos isolados clínicos, a detecção do gene *tetL* em 23% (7/30), do gene *geIE* em 46 % (14/30) e o gene *cpd* em 16% (5/30). Foram selecionados baseado nos perfis genotípicos para serem utilizados nos ensaios de transferência do gene *vanA* em leite 5 isolados de *E. faecalis* e 8 isolados de *E. faecium*, totalizando 30 pares conjugativos. Os isolados doadores (n=10) (Tabela 2) apresentam genótipo *vanA*⁺ (Figura 1), *tetL*⁻, *geIE*⁻ e *cpd*⁻. Os isolados receptores (n=3) (Tabela 2) apresentam genótipo *vanA*⁻ (Figura 1), *tetL*⁺, *geIE*⁺ (Figura 2A) e *cpd*⁺ (Figura 2B).

A verificação da localização dos genes *vanA* e *tetL* empregando a reação de PCR com DNA plasmidial resultou na presença de amplicons quando utilizado o oligonucleotídeo iniciador para o gene *vanA* para os isolados doadores e a ausência de amplicons com o uso do oligonucleotídeo iniciador para o gene *tetL* (Figura 3A) e *geIE* (Figura 3B) para os isolados doadores e receptores, demonstrando que o gene *vanA* está contido no DNA plasmidial, enquanto que o gene *tetL* é cromossomal, bem como o gene *geIE*.

No teste de CIM os isolados doadores do gene *vanA* apresentaram resistência a vancomicina e suscetibilidade a tetraciclina. Já os isolados receptores apresentaram suscetibilidade a vancomicina e resistência a tetraciclina. Com base nos dados de CIM para estes antimicrobianos foi estabelecida as concentrações a serem utilizadas no meio seletivo para seleção dos transconjugantes, sendo estas 16µg/mL e 32 µg/mL de tetraciclina e vancomicina, respectivamente.

No ensaio de transferência do gene *vanA* via processo conjugativo em leite foi observado o crescimento de colônias transconjugantes com todos os pares conjugativos e todos os tempos de co-cultivo entre doador e receptor da mesma espécie (*E. faecalis*) e também quando o doador pertencia a espécies diferentes (*E. faecium* + *E. faecalis*). A realização da técnica de doador morto resultou na ausência de crescimento de colônias doadoras e de colônias provenientes dos pares formados no ensaio de transferência do gene *vanA*.

O teste de estabilidade plasmidial dos transconjugantes foi demonstrada em 100% das colônias testadas. Como resultado da reação de PCR observamos a presença de amplicons quando utilizado o oligonucleotídeo iniciador

para o gene *vanA* e a presença de amplicons com o uso do oligonucleotídeo iniciador para o gene *tetL* e *geE*, confirmando a transferência intraespecífica e interespecífica do gene *vanA* em leite via processo conjugativo. O transconjugante apresentou como genótipo *vanA*⁺ *tetL*⁺ e *geE*⁺.

4 DISCUSSÃO

Estudos realizados por Zarrilli *et al* (2005), Camargo *et al* (2008), Werner *et al* (2011), Oliveira *et al* (2012) e Silva *et al* (2012), assim como o presente trabalho detectaram a presença do gene *vanA* em cepas de ERV isoladas de infecções nosocomiais, o que também tem sido demonstrado em cepas isoladas de alimentos, inclusive em derivados do leite como nos trabalhos de Franz *et al* (2001), Novais *et al* (2005) e Valenzuela *et al* (2009). A presença do gene *vanA* associado a resistência a outros antimicrobianos, tem sido relatada como um dos principais fatores que propicia a emergência de enterococos como um dos mais importantes agentes etiológicos de infecções nosocomiais.

Os genes *vanA* e *tetL* localizam-se no DNA cromossomal ou no DNA plasmidial (revisado por CETINKAYA *et al.*, 2000; CHOPRA *et al.*, 2001; revisado por COURVALIN, 2006) e o gene *geE* está alocado no DNA cromossomal (KOCH *et al.*, 2004). Segundo Wozniak *et al.* (2010); Stecher *et al.* (2013), para que ocorra a transferência de um gene via processo conjugativo este deve estar alocado no DNA plasmidial. A presença de amplicons para o gene *vanA* e a ausência de amplicons para o gene *tetL* e *geE* na PCR com o DNA plasmidial demonstrou que o gene *vanA* está contido no DNA plasmidial, enquanto que os genes *tetL* e *geE* estão contidos no DNA cromossomal. Logo, o gene *vanA* é passível de ser transferido via processo conjugativo e os genes *tetL* e *geE* podem ser utilizados como marcadores seletivos.

A presença do gene *cpd* em todos os nossos isolados pode ter promovido a transferência do gene *vanA* via processo conjugativo entre doadora e receptora, pois segundo Clewell *et al.* (1985; 2000); Dunny *et al.* (2001); Wardal *et al.* (2010) o gene *cpd* codifica a expressão de feromônio sexual que quando liberado pelo receptor causa como resposta a expressão de proteínas de membrana no

doador, favorecendo a agregação do par conjugativo o que é necessário para que ocorra a conjugação.

Com o estabelecimento da concentração inibitória mínima dos antimicrobianos vancomicina e tetraciclina utilizamos essas concentrações para selecionar os transconjugantes e realizar o teste de estabilidade plasmidial dos transconjugantes, assim como nos estudos sobre a transferência do gene *van* realizados por Lester *et al.*(2006) Niederh usern *et al.*(2011) e Lebreton *et al.*(2011).

A presença de transconjugantes em meio seletivo e a confirmação do gene *vanA* por PCR, somado a ausência do crescimento de colônias pela técnica de doador morto, exclui a possibilidade de que a transferência tenha ocorrido via processo de transformação. Clewell (1990) em seus estudos salientou que enterococos é amplamente reconhecido pela sua capacidade de transferência de material genético por conjugação, onde os plasmídeos são eficientemente transferidos em taxas relativamente altas em cultivo líquido.

No presente estudo foi observado colônias transconjugantes em todos os tempos e pares estabelecidos, o que também pode ser observado no estudo realizado por Cocconcelli *et al.* (2003) utilizando queijo, isto evidência que a transferência do gene *vanA* do doador para o receptor pode ocorrer em alimento e segundo Kurenbach *et al* (2003), a conjugação é uma das métodos de recombinação mais eficientes em proporcionar a transferência horizontal de genes, sendo considerado o mecanismo mais relevante para o aumento do número de bactérias multirresistentes a antimicrobianos.

Nos estudos realizados por Huycke *et al* (1992), Bourgeois-Nicolaos *et al.* (2005), Mater *et al.* (2005) e Dahl *et al.*(2007) utilizando camundongos e no estudo de Lester *et al* (2006) com humanos, foi demonstrado que os processos de troca de plasmídeos de resistência podem ocorrer no trato gastrointestinal. O trato gastrointestinal é reconhecido como um importante reservatório de bactérias com potencial de aquisição e de transferência de genes de resistência à antimicrobianos (RONCONI; MERINO, 2000) e cepas de *Enterococcus* spp. isolados de alimentos de origem animal podem transferir seus genes de resistência a antimicrobianos para enterococos da microbiota de humanos (LESTER *et al.*, 2006; HAYES *et al.*, 2004; HUYS *et al.*, 2004), bem como para as bactérias transientes do TGI, o que inclui

bactérias patogênicas (LECLERQ, 2009; LESTER *et al.*, 2006). Além disso, a utilização de antimicrobianos de largo espectro contribui para o desenvolvimento de uma pressão seletiva sobre a microbiota intestinal, proporcionando o aumento do surgimento de bactérias multirresistentes (RONCONI; MERINO, 2000).

Os transconjugante provenientes do ensaio de transferência mantiveram seus plasmídeos na ausência e na presença de vancomicina e para Werner *et al.* (2011) fatores como a eficiência da transferência e a capacidade de replicação na nova hospedeira são pré-requisitos importantes para a manutenção de plasmídeos resistência em novos receptores.

5 CONCLUSÃO

No presente estudo foi constatada a transferência do gene de resistência *vanA* via processo conjugativo entre todos os isolados de *Enterococcus* spp. em leite reconstituído em todos os tempos de co-cultivo, tanto nos pares intra como nos interespecíficos, disseminando o gene *vanA* para isolados que não possuíam este gene de resistência. A presença do gene *cpd* em todos os isolados receptores pode estar associado ao sucesso da transferência. A ausência de transconjugantes quando utilizados doadores submetidos à fervura exclui o mecanismo de transformação e confirma que a transferência se deu via processo conjugativo. Ensaio de transferência de genes de resistência em alimentos se fazem necessários visto o diminuto volume de estudos, a importância de enterococos na medicina humana e o alto potencial de enterococos na disseminação de genes por meio de conjugação.

AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa foi financiada pela Fundação Araucária e Márcia Regina Terra é bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS

- BELL, I.M., PATON, J.C., TURNIDGE, J., 1998. Emergence of vancomycin-resistant enterococci in Australia: phenotypic and genotypic characteristics of isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 36, 2187–2190.
- BOURGEOIS-NICOLAOS, N., MOUBARECK, C., MANGENEY, N *et al.*, 2005. Comparative study of *vanA* gene transfer from *Enterococcus faecium* to *Enterococcus faecalis* and to *Enterococcus faecium* in the intestine of mice. *FEMS Microbiology Letters* 254, 27–33.
- CAMARGO, I.L.B.C., ZANELLA, R.C., GILMORE, M.S., DARINI, A.L.C., 2008. Virulence factors in vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus faecalis* from Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 39, 273-278.
- CETINKAYA, Y., FALK, P., MAYHAL, C.G., 2000. Vancomycin-Resistant Enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*, v.13, n.4, p.686-707, 2000.
- CHOPRA I, ROBERTS M.C., 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65, 232–260.
- CLEWELL, D.B., FLORENCE Y.AN., FLANNAGAN, S.E *et al.*, 2000. Enterococcal sex pheromone precursors are part of signal sequences for surface lipoproteins. *Molecular Microbiology* 35, 246-247.
- CLEWELL, D.B., PONTIUS, L.T., FLORENCE Y.AN *et al.*, 1990. Nucleotide sequence of the sex pheromone inhibitor (iAD1) determinant of *Enterococcus faecalis* conjugative plasmid pAD1. *Plasmid* 24, 156–161.
- CLEWELL, D.B., FLORENCE Y.AN., WHITE, B *et al.*, 1985. *Streptococcus faecalis* sex pheromone (cAM373) also produced by *Staphylococcus aureus* and identification of a conjugative transposon (Tn918). *Journal of Bacteriology* 162, 1212-1220.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI/NCCLS), 2011. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. CLSI/NCCLS document M100-S21.
- COCCONCELLI, P.S., CATTIVELLIA, D., GAZZOLA S., 2003. Gene transfer of vancomycin and tetracycline resistances among *Enterococcus faecalis* during cheese and sausage fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 88, 315– 323.
- COURVALIN, P., 2006. Vancomycin resistance in Gram-positive cocci. *Clinical Infectious Diseases* 1, 42 Suppl, S25–34.

- DAHL, K.H., MATER, D.D.G., FLORES, M.J *et al.*, 2007. Transfer of plasmid and chromosomal glycopeptide resistance determinants occurs more readily in the digestive tract of mice than *in vitro* and exconjugants can persist stably *in vivo* in the absence of glycopeptide selection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.59, 478–486.
- DUNNY, G.M., ANTIPOORTA, M.H., HIRT, H.,2001. Peptide pheromone-induced and transfer of plasmid pCF10 in *Enterococcus faecalis*: probing the genetic and molecular basis for specificity of the probe response. *Peptides* 22, 1529-1539.
- EATON, T.J., GASSON, M.,2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 67,1628-1635.
- FISHER, K., PHILLIPS, C.,2009. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* 155, 1749–1757.
- FOULQUIÉ-MORENO, M.R., SARANTINOPOULOS, P., TSAKALIDOU E *et al.*, 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 1-24.
- FRANZ C.M.A.P., MUSCHOLL-SILBERHORN A.B., YOUSIF N.M.K *et al.*, 2001. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 4385–4389.
- FRANZ, C.M.A.P., HOLZAPFEL W.H., STILES M.E., 1999. Enterococci at the crossroads of food science? *International Journal of Food Microbiology* 47, 1–24.
- GELSOMINO, R., VANCANNEYT, M., COGAN, T.M., SWINGS, J *et al.*, 2003. Effect of raw-milk cheese consumption on the enterococcal flora of human feces. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 312–319.
- GELSOMINO, R., VANCANNEYT, M., CONDON, S *et al.*, 2001. Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar-type cheesemaking factory. *International Journal of Food Microbiology* 71, 177-188.
- GIRAFFA, G., 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 88, 215-222.
- GIRAFFA, G., 2002. Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews* 26, 163-171.
- HAYES, J., ENGLISH, L., CARR, L *et al.*, 2004. Multiple-antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. isolated from commercial poultry production environments. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 6005–6011.
- HUYCKE, M., GILMORE, M., JETT, B *et al.*, 1992. Transfer of pheromone-inducible plasmids between *Enterococcus faecalis* in the Syrian hamster gastro-intestinal tract. *Journal of Infectious Diseases* 166, 1188–1191.

- HUY , G., D'HAENE, ., COLLARD, J.M *et al.*, 2004. Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from food. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 555–562.
- JETT B.D., HUYCKE, M.M., GILMORE, M.S.,1994. Virulence of Enterococci. *Clinical Microbiology Reviews* 7, 462-478.
- KOCH, S., HUFNAGEL, M., THEILACKER, C *et al.*, 2004. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine* 22, 822–830.
- KURENBACH, B., BOHN, C., PRABHU, J *et al.*,2003. Intergeneric transfer of the *Enterococcus faecalis* plasmid pIP501 to *Escherichia coli* and *Streptomyces lividans* and sequence analysis of its tra region. *Plasmid* 50, 86–93.
- LEBRETON, F., DEPARDIEU, F., BOURDON, N *et al.*, 2011. d-Ala-d-Ser *vanN*-Type Transferable Vancomycin Resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55, 4606-4612.
- LECLERCQ, R., 2009. Epidemiological and resistance issues in multidrug-resistant staphylococci and enterococci. *Clinical Microbiology Infectious* 15, 224–231.
- LESTER, C.H., FRIMODT-MØLLER, N., SØRENSEN, T.L *et al.*, 2006. *In vivo* transfer of the *vanA* resistance gene from an *Enterococcus faecium* isolate of animal origin to an *E. faecium* isolate of human origin in the intestines of human volunteers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50, 596–599.
- MANNU, L., PABA, A., DAGA, E *et al.*, 2003. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *International Journal of Food Microbiology* 88, 291– 304.
- MARQUES, E.B., SUZART, S., 2004. Occurrence of virulence-associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina. *Journal of Medical Microbiology* 53, 1069-1073.
- MATER, D.D.G., LANGELLA, P., CORTHIER, G *et al.*,2005. Evidence of vancomycin resistance gene transfer between enterococci of human origin in the gut of mice harboring human microbiota. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56, 975–978.
- N EDERH U E RN, S., BONDI, M., MESSI P *et al.*,2011. Transferability from *vanA* Enterococci to *Staphylococcus aureus*. *Current Microbiology* 62, 1363–1367.
- NOBLE, W.C., VIRANI, Z., CREE, R.G.A., 1992. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters* 93, 195–198.
- NOVAIS, C., COQUE, T.M., BOERLIN, P *et al.*,2005. High occurrence and persistence of antibiotic-resistant enterococci in poultry food samples in Portugal . *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56, 1139–1143.

OLIVEIRA, A.C., DAMASCENO, Q.S., PISCOYA, M *et al.*,2012. Epidemiologic characteristics of resistant microorganisms present in reserves from an intensive care unit. *American Journal of Infection Control* 40, 186-187.

RONCONI, M.C., MERINO, L.A., 2000. Prevalencia de *Enterococcus faecalis* y *E. faecium* con resistencia de alto nivel a aminoglucósidos en las ciudades de Resistencia y Corrientes, Republic of Argentina. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 18, 71–73.

SILVA L.P.P., PITONDO-SILVA, A., MARTINEZ, R *et al.*,2012. Genetic features and molecular epidemiology of *Enterococcus faecium* isolated in two university hospitals in Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 74,267–271.

STECHER, B., MAIER L., HARDT, WD., 2013. ‘loo ming’ in the gut: how dysbiosis might contribute to pathogen evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 11, 277-284.

VALENZUELA, A.S., BEN OMAR, N., ABRIOUEL, H *et al.*, 2009. Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in enterococci from artisan foods of animal origin. *Food Control* 20, 381–385.

WARDAL, E., SADOWY, E., HRYNIEWICZ, W., 2010. Complex nature of enterococcal pheromone-responsive plasmids. *Polish Journal of Microbiology* 59, 79-87.

WERNER, G., FREITAS, A.R., COQUE, T.M *et al.*,2011. Host range of enterococcal *vanA* plasmids among Gram-positive intestinal bacteria. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy* 66, 273-282.

WERNER, G., COQUE, TM., HAMMERUM, A.M *et al.*, 2008a. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro Surveillance* 13, 1-11.

WERNER, G., STROMMENGER, B., WITTE, W., 2008b. Acquired vancomycin resistance in clinically relevant pathogens. *Future Microbiology* 3, 547–362.

WOZNIAK, R.A.F., WALDOR, M.K., 2010. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nature Reviews Microbiology* 8, 552-563.

ZARRILLI, R., TRIPODI, M.F., POPOLO, A.D *et al.*, 2005. Molecular epidemiology of high-level aminoglycoside-resistant enterococci isolated from patients in a university hospital in southern Italy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56, 827-835.

Lista de Figuras

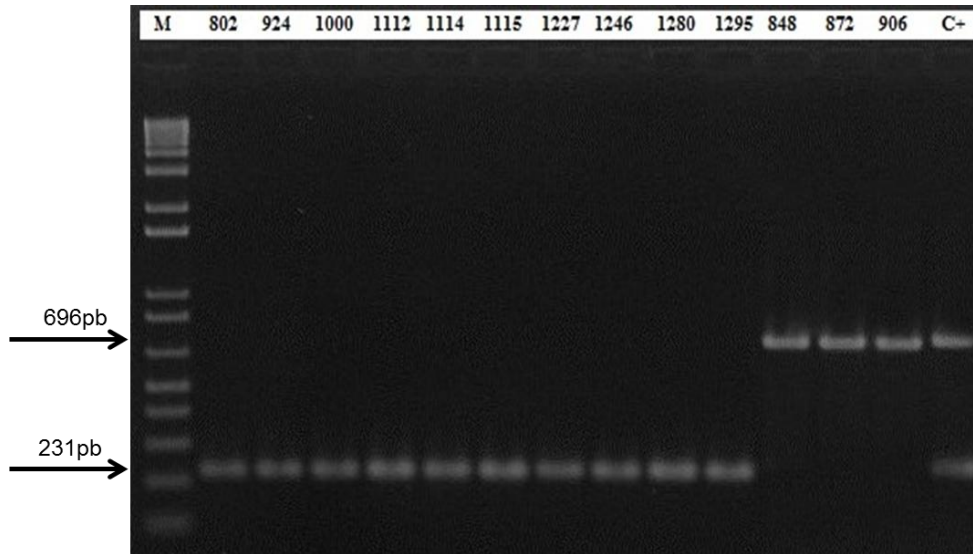


Figura 1: gel de eletroforese com produto da amplificação do gene *vanA* (231 pb *E. faecium*) e *tetL* (696 pb) utilizando DNA genômico de isolados doadores e receptores.

M= (marcador molecular de 1KB plus), C+ =(controle positivo *Staphylococcus aureus* ATCC 29213).

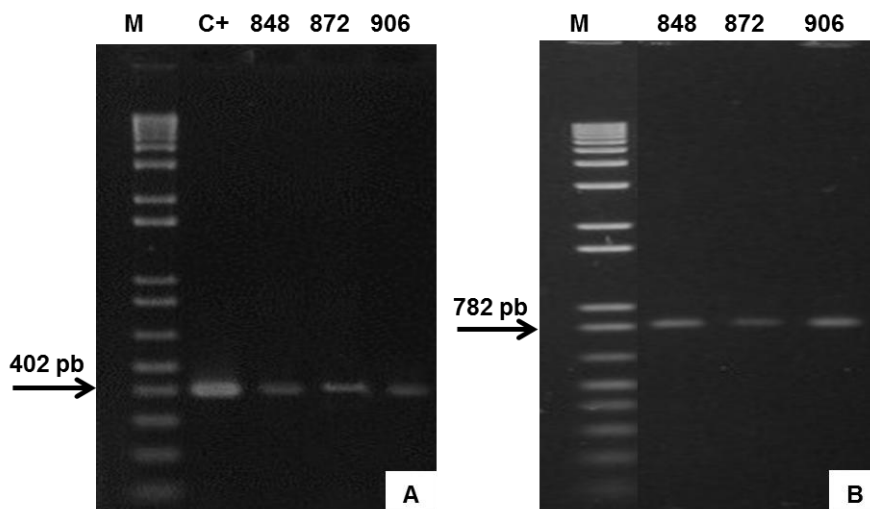


Figura 2: **A)** detecção da presença do gene *gel E* (402 pb); em **B)** detecção da presença do gene *cpd* (782 pb), ambas nos isolados de *Enterococcus* spp. doadores.

M= (marcador molecular de 1KB plus), C+ =(controle positivo *Staphylococcus aureus* ATCC 29213).

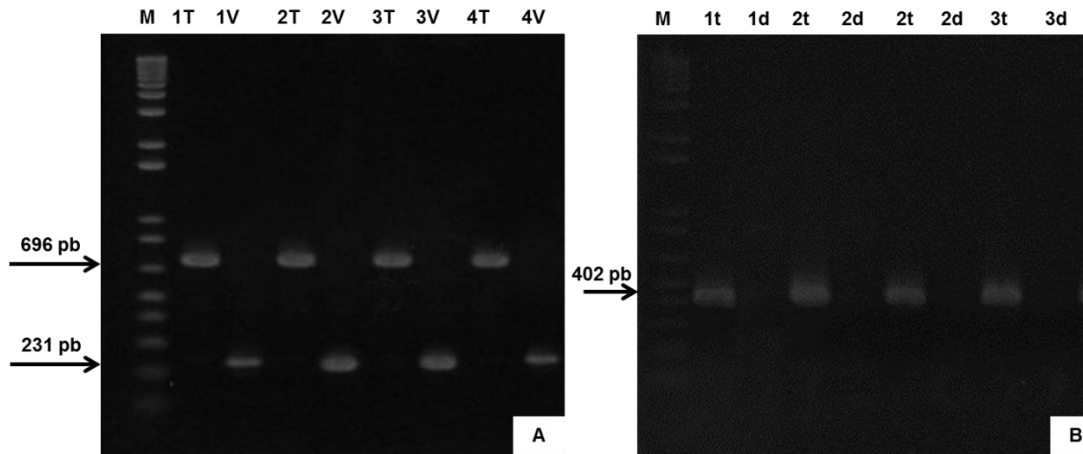


Figura 3: **A)** detecção por PCR do gene *tetL* (696 pb) e *vanA* (231 pb) em *E. faecium* nos transconjugantes provenientes da conjugação do receptor 848 com doadores; em **B)** detecção do gene *geIE* (402 pb) nos pares conjugativos formados pelo receptor 848 e demais doadores. M= (marcador molecular de 1KB plus). **A)** V (detecção do gene *vanA*); T (detecção do gene *tetL*); 1V (848+802), 1T (848+802), 2V (848+924), 2T (848+924), 3V (848+1000), 3T (848+1000), 4V (848+1112) e 4T (848+1112); em **B)** t (transconjugante); d (doador); 1t (848+802), 1d(802), 2t (848+924), 2d (924), 3t (848+1000), 3d (1000), 4t (848+1112) e 4d (1112).

Lista de Tabelas

Tabela 1: Oligonucleotídeos iniciadores e condições para amplificação dos genes em *Enterococcus* spp. por PCR.

Gene	Sequência nucleotídica (5'- 3')	Ta (°C)	Tamanho do produto (bp)	Referência
<i>Cpd</i>	TGGTGGGTTATTTTTCAATTC TACGGCTCTGGCTTACTA	50	782	Eaton; Gasson, (2001)
<i>gelE</i>	AGTTCATGTCTATTTTCTTCAC CTTCATTATTTACACGTTTG	56	402	Mannu <i>et al.</i> , (2003)
<i>vanA</i>	GTAGGCTGCGATATTCAAAGC CGATTCAATTGCGTAGTCCAA	56	231 <i>E.faecium</i>	Bell <i>et al.</i> , (1998)
<i>tetL</i>	GTMGTTGCGCGCTATATTCC GTGAAMGRWAGCCACCTAA	56	696	Gevers <i>et al.</i> , (2003)

cpd (feromônio sexual) ; *gelE* (gelatinase); *vanA*(vancomicina A); *tetL* (tetraciclina L) ; Ta (°C) = temperatura de anelamento.

Tabela 2: Isolados de *Enterococcus* spp. denominados doadores e receptores e suas respectivas características genotípicas e fenotípicas.

Amostras Doadoras	Espécie	Fenótipo		Genótipo			
802	<i>E. faecalis</i>	T ^S	V ^R	tetL-	vanA+	gelE-	cpd-
924	<i>E. faecium</i>	T ^S	V ^R	tetL-	vanA+	gelE-	cpd-
1000	<i>E. faecium</i>	T ^S	V ^R	tetL-	vanA+	gelE-	cpd-
1112	<i>E. faecalis</i>	T ^S	V ^R	tetL-	vanA+	gelE-	cpd-
1114	<i>E. faecium</i>	T ^S	V ^R	tetL-	vanA+	gelE-	cpd-
1115	<i>E. faecium</i>	T ^S	V ^R	tetL-	vanA+	gelE-	cpd-
1227	<i>E. faecium</i>	T ^S	V ^R	tetL-	vanA+	gelE-	cpd-
1246	<i>E. faecium</i>	T ^S	V ^R	tetL-	vanA+	gelE-	cpd-
1280	<i>E. faecium</i>	T ^S	V ^R	tetL-	vanA+	gelE-	cpd-
1295	<i>E. faecium</i>	T ^S	V ^R	tetL-	vanA+	gelE-	cpd-
Amostras Receptoras	Espécie	Fenótipo		Genótipo			
848	<i>E. faecalis</i>	T ^R	V ^S	tetL+	vanA-	gelE+	cpd+
872	<i>E. faecalis</i>	T ^R	V ^S	tetL+	vanA-	gelE+	cpd+
906	<i>E. faecalis</i>	T ^R	V ^S	tetL+	vanA-	gelE+	cpd+

Tetraciclina (T); Vancomicina (V); S (Sensível) e R (resistente); + (presença do gene); - (ausência do gene); tetL (gene que codifica resistência a tetraciclina); vanA (gene que codifica resistência a vancomicina); gelE (gene que codifica a produção de gelatinase) e cpd (gene que codifica a expressão do feromônio sexual).