



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DEISE PALAZINI AMICHI

**ATIVIDADE ANTIBIÓTICA DE METABÓLITO
SECUNDÁRIO PRODUZIDO POR *Pseudomonas aeruginosa* EM
CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILME DE *Enterococcus
faecium***

Londrina
2015

DEISE PALAZINI AMICHI

**ATIVIDADE ANTIBIÓTICA DE METABÓLITO
SECUNDÁRIO PRODUZIDO POR *Pseudomonas aeruginosa* EM
CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILME DE *Enterococcus
faecium***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Galdino Andrade Filho

Londrina
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Amichi, Deise.

ATIVIDADE ANTIBIÓTICA DE METABÓLITO SECUNDÁRIO PRODUZIDO POR *Pseudomonas aeruginosa* EM CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILME DE *Enterococcus faecium* / Deise Amichi. - Londrina, 2015.
59 f.

Orientador: Galdino Andrade Filho.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Características de *Enterococcus* spp - Teses. 2. fatores de virulência - Teses. 3. biofilme - Teses. 4. produção de compostos antibioticos por bacterias - Teses. I. Andrade Filho, Galdino . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

DEISE PALAZINI AMICHI

**ATIVIDADE ANTIBIÓTICA DE METABÓLITO
SECUNDÁRIO PRODUZIDO POR *Pseudomonas aeruginosa* EM
CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILME DE *Enterococcus
faecium***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Galdino Andrade Filho
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr^a Gilselena Kerbauy Lopes
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Alexandre Tadachi Morey
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 28 de abril de 2015.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Israel e Vera Lucia, por toda dedicação, carinho e compreensão.

Ao orientador, prof. Dr. Galdino Andrade, pela oportunidade de trabalhar no

Laboratório de Ecologia Microbiana, pelo seu profissionalismo e por ter sido compreensivo e paciente.

Ao prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira, por todo ensinamento, incentivo e compreensão durante a realização deste trabalho.

À prof^a Dr^a Sueli Fumie Yamada Ogatta, pela sua contribuição e incentivo em todas as etapas deste trabalho.

Ao prof. Dr. Alexandre Tadachi Morey, por toda a sua disposição, paciência, auxílio e companheirismo durante a realização deste trabalho.

À Prof. Dr^a Gilselena Kerbauy Lopes, por toda contribuição, carinho e disposição. Às docentes do Laboratório de Microbiologia Clínica do Hospital Universitário de

Londrina, em especial às prof^{as} Dr^{as} Márcia Perugini e Dr^a Eliana Carolina Véspero pela atenção, ensinamentos durante o período de estágio.

Aos amigos do Laboratório de Ecologia Microbiana, Ane, Carol Polano, Bárbara, Miguel, Marta, Carol Martins, Glenda, Viviana, Flavia, Juliana, Luana, Renata, Maiara, Ana Paula, Caibe. Todos de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

À minha amiga e companheira de curso e laboratório Vanessa. Agradeço por todos os momentos que passamos juntas, pelo apoio, pela amizade!

A minha psicóloga Geila, por me acompanhar em um momento delicado durante o decorrer deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Microbiologia, pelo apoio e orientação.

À Coordenação da Pós Graduação em Microbiologia, por fornecer condições para a realização deste trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro, fundamental para o desenvolvimento desta pesquisa.

AMICHI, Deise Palazini. **Atividade antibiótica de metabólito secundário produzido por *pseudomonas aeruginosa* em células planctônicas e biofilme de *enterococcus faecium***. 2015. 59 f. dissertação (mestrado em microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

Os enterococos são uma das principais causas de infecções relacionadas à assistência à saúde, devido ao aumento da resistência a uma vasta gama de antibióticos. *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* são os isolados mais comuns. O desenvolvimento de resistência à vancomicina tem sido descrito a partir do final da década de 80 e desde então foi observado um aumento das infecções e colonizações por VRE. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antibiótica da substância bioativa produzida por *Pseudomonas aeruginosa*, cepa LV, sobre células planctônicas e biofilme de *E. faecium* resistente à vancomicina (VREfm). Avaliou-se a atividade antibiótica em células planctônicas por microdiluição, determinando a concentração inibitória mínima (CIM) e o efeito da ação desta substância sobre a viabilidade celular, adesão à superfície de poliestireno e formação de biofilme. A menor concentração capaz de inibir 100% do crescimento foi de $15,6 \mu\text{g mL}^{-1}$. Na curva de crescimento e tempo de morte observou-se uma redução das células viáveis entre 2-8 horas. A substância F3d provocou redução, de 60%, na inibição de adesão das amostras de VREfm em superfície de poliestireno nas concentrações de $15,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $7,8 \mu\text{g mL}^{-1}$. Houve uma diminuição de 80% de células viáveis durante a formação do biofilme, nas mesmas concentrações, e ainda uma redução acima de 50% do biofilme formado, na concentração de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$, com significativa redução da viabilidade celular. A atividade efetiva antibiótica e a baixa toxicidade para o hospedeiro sugerem um potencial agente antibacteriano. Entretanto, novos estudos farmacológicos serão necessários para confirmar esta hipótese.

Palavras Chave: *enterococcus* spp.; *enterococcus faecium* resistente à vancomicina (vrefm); *pseudomonas* sp.; biofilme.

AMICHI, Deise Palazini. **Antibiotic activity of secondary metabolite produced by *pseudomonas aeruginosa* in planktonic cells and *enterococcus faecium* biofilm.** 2015. 59 p. Thesis (master's degree in microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

Enterococci are one of the main causes of health care related infections due to increased resistance to a broad range of antibiotics. *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* are the most common isolates. The development of Vancomycin resistance has been described from the end of the 80's and since then an increase in infections and colonization by vancomycin resistance *Enterococcus* (VRE) has been observed. The aim of this study was to evaluate the antibiotic activity of the bioactive substance produced by *Pseudomonas aeruginosa* (LV strain) on planktonic cells and biofilms of Vancomycin Resistant *E. faecium* (VREfm). We evaluated the antibiotic activity planktonic cells in microdilution by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and the effect this substance's action on the cell viability, adhesion to polystyrene surface and biofilm formation. The lowest concentration able to inhibit 100% growth was $15.6 \mu\text{g mL}^{-1}$. Regarding the growth curve and death-time, a reduction of viable cell within 2-8 hours was observed. The F3D substance caused a significant reduction, above 60%, in inhibiting adhesion of VREfm samples to polystyrene surface in concentrations of $15.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $7.8 \text{ mg L}^{-1} \mu\text{g mL}^{-1}$. There was an 80% decrease of viable cells for biofilm formation at the same concentrations and also a reduction of over 50% of the formed biofilm at the concentration of $250 \mu\text{g mL}^{-1}$, with a significant reduction in cell viability. The effective antibiotic activity and low toxicity to the host suggest a potential antibacterial agent. However, new pharmacological studies are needed to confirm this hypothesis.

Key words: *enterococcus* spp.; vancomycin resistant *enterococcus faecium* (vrefm); *pseudomonas sp.*; biofilm.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	09
2	OBJETIVOS	10
2.1	OBJETIVO GERAL	10
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DE <i>ENTEROCOCCUS</i> SPP	11
3.2	FATORES DE VIRULÊNCIA	12
3.3	BIOFILME	14
3.4	FATORES DE RESISTÊNCIA	15
3.5	EPIDEMIOLOGIA	20
3.6	<i>PSEUDOMONAS</i> SPP PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ANTIBIÓTICOS POR BACTÉRIAS	21
3.7	PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ANTIBIÓTICOS POR BACTÉRIAS.....	22
	REFERÊNCIAS	24
	ARTIGO	37

1 INTRODUÇÃO

Enterococcus sp. resistente à vancomicina (VRE) vem sendo considerado, em diversos países, como um importante patógeno de infecções relacionadas à assistência à saúde. São bactérias Gram-positivas, cocos ovais anaeróbios facultativos que formam cadeias de vários comprimentos. Resistentes e versáteis, com uma habilidade especial para resistir a condições adversas, incluindo altas concentrações de sal e a uma vasta gama de temperaturas (10 °C a > 45 °C). Dessa forma, estão amplamente distribuídos na natureza com capacidade para sobreviver e se desenvolver em vários ambientes, principalmente no solo e na água (MURRAY, 1990).

A resistência aos antibióticos tornou-se um grande problema de saúde pública e clínica que afeta uma grande porcentagem da população. A intensa pressão seletiva, decorrente do uso indiscriminado ou errôneo de antimicrobianos de amplo espectro para controle das infecções, induz à evolução e disseminação de micro-organismos altamente resistentes denominados multirresistentes (MR) ou organismos resistentes a múltiplos antimicrobianos (*Multidrug-Resistant Organisms*- MDRO). Entretanto, não comumente, alguns estudos têm descrito micro-organismos completamente adaptados a este ambiente de pressão antimicrobiana, mostrando que eles não apenas crescem na presença de altas concentrações de antimicrobianos, como também utilizam estas substâncias como fator de crescimento, como por exemplo os VRE (BERT *et al*, 2009).

Mais de 70% das bactérias que causam infecções relacionadas à assistência à saúde são resistentes a pelo menos um dos medicamentos mais comumente utilizados no seu tratamento. Isso justifica a necessidade permanente de novos antibióticos, já considerando que a maioria dos medicamentos serão eficazes por pouco tempo e a resistência será inevitável (FISCHBACH e WALSH, 2009).

O gênero *Enterococcus* tem sido descrito formando biofilmes em vários aparelhos médicos como catéteres, lentes intraoculares e válvulas cardíacas sendo responsáveis por endoftalmites, infecções de feridas cirúrgicas e periodontais (GILMORE e KOBAYAKAWA, 2005; KOBAYAKAWA e GILMORE, 2005; MOHAMED e HUANG, 2007; TENDOLKAR *et al*, 2004)

Sabe-se que os metabólitos bacterianos são promissores para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. Por exemplo, a platensimicina, isolada de *Streptomyces*

platensi, apresentou atividade inibitória de amplo espectro contra bactérias Gram-positivas e encontra-se em fase de estudos pré-clínicos (GUIMARÃES, 2010).

A pesquisa por novos antibióticos é contínua, com o objetivo de combater patógenos, bactérias e fungos naturalmente resistentes e aqueles que possam desenvolver resistência. Adicionalmente, também, otimizar as propriedades farmacológicas dos antibióticos já existentes. Entre os micro-organismos produtores de antibióticos destacam-se bactérias do gênero *Pseudomonas*. (DEMAIN, 2000).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antibiótica do metabólito secundário fração 3d acetato de etila produzido por *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV sobre células planctônicas e biofilme de *Enterococcus faecium* resistentes a Vancomicina e formadores de biofilme (esp).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antibiótica *in vitro* por determinação da concentração inibitória mínima contra *E. faecium* VRE;
- Determinar a cinética do efeito da fração F3d na curva de tempo de morte de *E. faecium* VRE;
- Avaliar a ação antibiótica sobre a formação de biofilme e sobre biofilmes maduros de *E. faecium* VRE;
- Avaliar a ação da F3d sobre a adesão de *E. faecium* VRE em superfície de poliestireno.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Características gerais de *Enterococcus* spp.

Bactérias do gênero *Enterococcus* caracterizam-se como células Gram-positivas, ovóide e não-esporuladas, dispostas em células individuais, pares ou cadeias curtas, podendo ou não apresentar motilidade. São anaeróbios facultativos, com necessidades nutricionais complexas e um metabolismo que apresenta o ácido láctico como principal produto da fermentação da glicose. Apresentam-se como micro-organismos não produtores de catalase, mas algumas cepas produzem pseudo-catalase (HARDIE e WHILEY, 1997). Sua temperatura ótima de crescimento é 35°C, mas pode variar de 10 a 45°C (FACKLAM e COLLINS, 1989). Podem ser cultivados na presença de NaCl (6,5%) e pH 9,6. São capazes de hidrolisar esculina em presença de 40% de bilirrubina e produzir pirrolidonil arilamidase (PYR) (TEIXEIRA; FACKLAM, 2004).

Enterococos são tipicamente encontrados no trato intestinal e fezes do homem e outros animais (MURRAY, 1990). São organismos comensais que têm potencial de causar doença, podem ser isolados do trato geniturinário, corrente sanguínea, lesões intra-abdominais, feridas de queimaduras, endocárdio, trato biliar (HARDIE e WHILEY, 1997).

Em meados de 1930, os enterococos eram classificados como *Streptococcus*, sendo as espécies mais comuns *Streptococcus faecalis* seguida pela *Streptococcus faecium* (MURRAY, 2000). Em 1980, baseado nas diferenças genéticas, os enterococcus deixaram de pertencer ao gênero *Streptococcus* e foram designados *Enterococcus* (SCHLEIFER; KLIPPER-BLAZ, 1984).

O gênero *Enterococcus* compreende vinte e oito espécies diferentes: *E. avium*, *E. asini*, *E. canis*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. dispar*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. flavescens*, *E. gallinarum*, *E. glivus*, *E. haemoperoxidus*, *E. hirae*, *E. malodratius*, *E. moraviensis*, *E. mundtii*, *E. pallens*, *E. phoeniculicola*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus*, *E. ratti*, *E. saccharolyticus*, *E. sacharominimus*, *E. solitarius*, *E. sulfureus*, *E. villorum*. Sua filogenia baseia-se na análise das sequências nucleotídicas do gene que codifica para RNA ribossomal 16S e hibridação de DNA-DNA genômico (SCHLEIFER; KLIPPER-BLAZ, 1984; SCHABERG; ZERVOS, 1986; MURRAY, 1990; KONEMAN *et al*, 2001).

E. faecium são patógenos oportunistas que podem causar infecções severas em diferentes sistemas do corpo, particularmente em pacientes imunossuprimidos (BALDASSARI

et al., 2004).

E. faecium e *E. faecalis* são as espécies mais comuns para causar infecções. Durante as últimas décadas, *E. faecium* tornou-se um dos responsáveis pela maioria das infecções relacionadas à assistência à saúde, devido ao aumento da resistência aos antibióticos. (SIEVERT, *et al.*, 2013).

Uma das principais razões da constância destes micro-organismos em ambiente hospitalar é a resistência intrínseca a vários antibióticos comumente utilizados, como: β -lactâmicos, clindamicinas e fluorquinolonas. E ainda, por sua habilidade em adquirir resistência a outros antibióticos, como aminoglicosídeos e glicopeptídeos, através da aquisição de material genético por transferência de plasmídeos e transposons (CLEWELL, 1990; CHANG *et al.*, 2003).

3.2 Fatores de virulência

Os fatores de virulência de determinadas bactérias são codificados por sequências gênicas localizadas em regiões específicas do genoma, denominadas ilhas de patogenicidade (*Pathogenicity Islands* - PAI) (HACKER; KAPER, 2000).

Shankar *et al.* (2002) descreve a primeira PAI clássica em *Enterococcus* spp. em amostras de *E. faecalis* multirresistentes isolados de amostra clínica. Essa região do genoma codifica as transposases e sequências reguladoras os quais controlam a transcrição de genes que codificam proteínas com importantes funções na expressão dos fatores de virulência.

O fator de virulência associado à endocardite, denominado *efaA*, que apresenta propriedades de adesinas, foi obtido a partir do antígeno dominante de 37 kDa do soro de pacientes com endocardite infecciosa causada por *E. faecalis*. O gene que codifica este antígeno foi clonado, sequenciado e designado *efaA* (AITCHISON *et al.*, 1987). Apresenta uma sequência de aminoácidos homóloga a proteína de estreptococcus com propriedades de adesão (MURRAY, 2000).

A substância de agregação (AS/AGG) é uma proteína presente na superfície do micro-organismo, codificada por plasmídeos de conjugação, onde promove a formação de agregados celulares e intensificam a virulência do micro-organismo. Atuando para colonização do micro-organismo como adesina e invasina, capaz de promover a ligação do enterococcus à superfície da célula epitelial devido à sua capacidade de ligação a grande variedade celular nas proteínas β 2-integrinas de células epiteliais intestinais e da matriz extracelular (fibronectina,

colágeno tipo 1) (SARTINGEN *et al.*, 2000; ROZDZINSKI *et al.*, 2001).

A gelatinase, codificada pelo gene cromossomal *gelE*, é uma protease extracelular capaz de hidrolisar colágeno, caseína, hemoglobina, gelatina e pequenos peptídeos (SU *et al.*, 1991).

Citolisina é uma proteína capaz de lisar células animais (BOOTH, 1996). Expressa por linhagens de enterococcus, é uma toxina bacteriana encontrada tanto em plasmídeos quanto no cromossomo. Está relacionada à estreptolisina O, uma classe de bacteriocinas, exercendo atividade tanto citolítica quanto bactericida contra micro-organismos Gram-positivos (GILMORE *et al.*, 1994; HANCOCK e GILMORE, 2000). Codificada por um *operon* que consiste de 8 genes que podem estar localizados em um plasmídeo ou no cromossomo bacteriano. Os genes presentes no *operon* da citolisina são: *cytR1*, *cytR2*, *cytL_L*, *cytL_s*, *cytM*, *cytB*, *cytA* e *cytI*. Os genes *cytL_L* e *cytL_s* codificam a grande e a pequena subunidade da citolisina, respectivamente. Juntos constituem o componente lítico, e *cytA* codifica componente ativador. Citolisina aparece em até 60% de *E. faecalis* isolados de surtos (MURRAY, *et al.*, 2000).

A produção de citolisina parece contribuir significativamente para o aumento da severidade da endocardite (CHOW *et al.*, 1993)

A proteína de superfície de *Enterococcus (esp)* é uma molécula localizada na parede celular, codificada pelo gene cromossomal *esp*, atua como adesina contribuindo para colonização e persistência do patógeno no trato geniturinário, com atividade direta na ligação da matriz extracelular do hospedeiro humano, promovendo a colonização. Vários estudos têm reportado a presença do gene *esp* em isolados de *E. faecium* e *E. faecalis* (SHANKAR *et al.*, 1999; SHANKAR *et al.*, 2001; WOODFORD; SOLTANI; HARDY, 2001; WILLEMS *et al.*, 2001; RUZON *et al.*, 2009). É constituída por 1873 aminoácidos e possui características de outras proteínas de superfícies de bactérias Gram positivas. (GILMORE, *et al.*, 2002). Em *E. faecalis*, a presença do gene *esp* tem sido associada ao aumento de virulência (SHANKAR *et al.*, 1999), colonização e formação de biofilme (TOLEDO-ARANA *et al.*, 2001).

A proteína *esp* permite a colonização da bexiga em modelos experimentais de infecção do trato urinário e confere aos enterococos a capacidade de produção de biofilmes (SHANKAR, *et al.*, 2002).

O gene *esp* foi associado com capacidade de *Enterococcus* para formar biofilmes e aderir à superfície de poliestireno (TOLEDO-ARANA, *et al.*, 2001). A expressão do gene *esp* varia entre as linhagens, e depende das condições de crescimento sendo quantitativamente

correlacionada com a aderência inicial ao poliestireno e para a formação de biofilme (VAN WAMEL, *et al.*, 2007).

3.3 Biofilme

Biofilme é uma comunidade complexa e estruturada de micro-organismos, com um extraordinário grau de organização celular envolta por uma matriz extracelular de polissacarídeos aderidos entre si a uma superfície ou interface. Experimentos demonstram que, quando organizadas em biofilmes, as bactérias são capazes de sobreviver aos tratamentos de antibióticos em concentrações de até mil vezes mais alta do que aquelas utilizadas para matar células plactônicas (HOIBY, *et al.*, 2010; MUSK, *et al.*, 2006).

A formação do biofilme é muitas vezes regulada por mecanismos de *quorum-sensing*, formas de comunicação intra e interespecies microbianas, que permitem aos micro-organismos modular seu comportamento, alterando a expressão genética e sendo a base do processo as variações nas densidades populacionais (MOHAMED e HUANG, 2007).

Durante as várias fases de desenvolvimento e secções do biofilme, as células estão em diferentes estágios fisiológicos. As que se encontram na base podem estar mortas ou lesadas, enquanto que as mais próximas da superfície estão em crescimento ativo. Entretanto, mesmo com essa diversidade fisiológica, pode-se sugerir que, no biofilme, as células estão no “*status*” equivalente à fase estacionária de crescimento, mantendo baixa atividade metabólica, porém suficiente para provocar e manter a inflamação (CHAVES DE PAZ, 2007).

O crescimento bacteriano no biofilme é uma espécie de adaptação, na qual a comunidade de micro-organismos torna-se absorvida por uma superfície sólida e é embebida numa matriz. Muitos micro-organismos aderem-se a essa superfície formando uma fina película. Esta matriz constitui 85% do volume do biofilme (PORTENIER, *et al.*, 2003) e é constituída de substâncias poliméricas extracelulares produzidas pelas próprias células bacterianas. As mais profundas são expostas a condições ambientais como decréscimo de tensão de oxigênio, resultando em fenótipos alterados em termos de níveis de crescimento e transcrição de genes, o que pode facilitar certas características de sobrevivência e fatores de virulência (CATE, 2006).

A arquitetura definida do biofilme proporciona um ambiente ideal para a troca de material genético entre bactérias aumentando a resistência inata aos antibióticos (DONLAN, 2002).

A formação do biofilme ocorre por uma série de processos: inicia-se com a adesão inicial de células planctônicas à superfície seguida por proliferação e acúmulo de camada de células e formação da comunidade microbiana, embebida em matriz de exopolissacarídeo produzidas por si mesma. A adesão e a formação do biofilme são limitadas por características do micro-organismo, tais como expressão dos fatores de virulência e a produção de cápsula exopolimérica do material aderente e do meio envolvendo o micro-organismo, como pH, temperatura, tempo de agitação e uma variedade de outros fatores (FLACH; KARNOPP; CORÇÃO, 2005).

De acordo com Lewis (2011), três fatores podem ser considerados para explicar a resistência dos biofilmes aos antimicrobianos: a penetração restrita da droga no interior das comunidades microbianas, a características de crescimento lento apresentada por algumas células presentes no biofilme e ainda a expressão de alguns genes biofilme-específicos.

Um estudo demonstrou que o caldo de triptona de soja (TSB) com suplementação de glucose 1% aumenta a produção do biofilme de *E. faecalis* em comparação ao TSB sem glucose (BALDASSARI, *et al.*, 2001).

E. faecalis e *E. faecium* são capazes de formar biofilme na superfície de dispositivos relacionados aos procedimentos invasivos de assistência à saúde, como cateteres uretrais (KEANE *et al.*, 1994). Segundo Van Wamel, *et al.* (2011) a expressão de *esp* na superfície de *E. faecium* é necessária na aderência inicial do micro-organismo à superfície de poliestireno. A habilidade de formar biofilme em materiais médicos pode contribuir para o desenvolvimento de infecções relacionadas a cateter intravascular (JOYANES *et al.*, 1999; DAROUICHE, 2001; SANDOE *et al.*, 2003)

3.4 Fatores de resistência

A resistência de enterococcus aos antibióticos tem sido uma crescente preocupação nos últimos anos, resistência à penicilina-ampicilina, amicoglicosídeo e glicopeptídeos tem sido reportadas em um número crescente de linhagens, limitando as possibilidades terapêuticas (LENCRERCQ, 2009). Os principais genes relacionados a resistência *vanA* e *vanB* estão localizados em plasmídeos ou no cromossomo e foram descritos pela primeira vez em *E. faecalis* e *E. faecium*, sendo os mais relevantes clinicamente. Resultam da aquisição de elementos genéticos móveis, o transposon Tn1546 (*vanA*) e os transposons Tn1547 ou Tn1549 (*vanB*) (CETINKAYA *et al.*, 2000; CHAVERS *et al.*, 2003, TENDOLKAR *et al.*, 2003, TOP

et al., 2008).

Estudos relatam que a falha terapêutica aumenta em 20% e a mortalidade de 27% à 52%, quando comparadas as infecções causadas por enterococcus sensíveis aos VRE (BROW, *et al.*, 2006).

O isolamento de enterococos resistentes a múltiplos antibióticos tem se tornado cada vez mais comum no ambiente hospitalar (COURVALIN, 2006). A propagação clonal é o fator dominante na disseminação de enterococos multirresistentes na América do Norte e Europa. (DESHPANDE *et al.*, 2007).

A resistência a antibióticos em enterococcus pode ser dividida em duas classes, resistência intrínseca e adquirida. As resistências intrínsecas devem-se à ausência de locais alvo para um determinado antibiótico ou à incapacidade para atravessar a parede celular e atingir o seu alvo intracelular (MURRAY, 1990; MUNDY *et al.*, 2000; MAROTHI *et al.*, 2005, SOOD *et al.*, 2008; TOP *et al.*, 2008). As resistências adquiridas desempenham um papel mais importante na emergência das resistências a antimicrobianos e podem surgir de mutações cromossômicas ou troca genética de elementos móveis de DNA, como transposons ou plasmídeos (MAROTHI *et al.*, 2005; TOP *et al.*, 2008).

A resistência cromossomal de enterococos a vários antimicrobianos pode ser resultado da sua necessidade de sobreviver e persistir em ambientes altamente competitivos, como o trato gastrointestinal. Enterococos apresentam resistência intrínseca a diversas substâncias antimicrobianas utilizadas na clínica (SHEPARD e GILMORE, 2002). São intrinsecamente resistentes a penicilinas semi-sintéticas, cefalosporinas, baixos níveis de aminoglicosídeos e clindamicina, além disso, também possuem capacidade de aquisição de genes de resistência, o que pode ocorrer por conjugação ou mutação no DNA apresentando resistência a antibióticos como cloranfenicol, eritromicina, altos níveis de clindamicina e aminoglicosídeos, tetraciclinas, fluorquinolonas e vancomicina (MURRAY, 1990; KAYSER, 2003).

Os enterococos possuem resistência natural intrínseca a antimicrobianos β -lactâmicos devido à baixa afinidade de suas proteínas de ligação à penicilina para estes agentes. Este tipo de resistência difere entre os antibióticos desse grupo, sendo que as penicilinas exercem maior atividade frente a estes micro-organismos, seguidas por carbapenens e cefalosporinas, com menor atividade. Entre as penicilinas, a ampicilina é a mais efetiva. A resistência intrínseca às cefalosporinas é tão elevada que o mesmo não pode ser empregado no tratamento de pacientes infectados com enterococos. A concentração inibitória mínima (CIM)

para enterococos varia de 1 a 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$, entretanto para isolados clínicos de *E. faecium* normalmente a concentração inibitória mínima é superior, podendo chegar a 256 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Na maioria dos hospitais, mais de 90% dos isolados clínicos de *E. faecium* são resistentes à ampicilina com CIM $\geq 32 \mu\text{g mL}^{-1}$ (TORRES *et al.*, 1993; VALDES *et al.*, 1998; KAK e CHOW, 2002).

O elevado nível de resistência a penicilinas é ocasionado principalmente pela superprodução de proteínas de ligação a penicilina (PBP) de baixa afinidade, ou ainda por mutações nas PBP, o que as torna menos suscetível a inibição pelas penicilinas. Já foram descritas linhagens de *E. faecalis* produtoras de β -lactamase codificadas pelo gene *blaZ* (FONTANA *et al.*, 1996).

A aquisição de resistência à vancomicina por enterococos afetou o tratamento e o controle de infecção destes organismos. VRE, particularmente cepas de *E. faecium*, são frequentemente resistentes a todos antibióticos que são eficazes ao tratamento de enterococos suscetíveis à vancomicina, limitando as opções terapêuticas para os médicos. Antibióticos mais recentes, como por exemplo: quinupristina-dalfopristina, linezolida, daptomicina e a tigeciclina apresentam atividade contra muitas das cepas de VRE e têm otimizado esta situação, mas a resistência a esses agentes já foram descritos. Uma mutação (G2576U) no domínio V do RNAr 23S é responsável pela resistência a linezolida (DESHPANDE *et al.*, 2007). Enquanto que a resistência à quinupristina-dalfopristina pode ser resultante de vários mecanismos: modificação de enzimas, efluxo ativo, e modificação alvo. Resistência de *E. faecium* e *E. faecalis*, para daptomicina, um antibiótico lipopeptídico cíclico mais recente, que atua sobre a membrana celular das bactérias, também tem sido relatado (LONG *et al.*, 2005).

Os primeiros isolados clínicos resistentes à vancomicina foram detectados na Europa em 1986. Desde então, os *E. faecium* VRE disseminaram rapidamente pelo mundo. Os isolados de VRE são classificadas em oito genótipos e fenótipos, sendo *vanA*, *vanB* e o *vanC* os de maior frequência. O fenótipo *vanA* é codificado pelo gene *vanA*, está associado a alto nível resistência induzível à vancomicina (CIM $\geq 64 \mu\text{g mL}^{-1}$) e à teicoplanina ($\geq 16 \mu\text{g mL}^{-1}$). O fenótipo *vanB*, codificado cromossomicamente pelo gene *vanB*, está associado a vários níveis de resistência induzível, apenas à vancomicina (CIM: 32-64 $\mu\text{g mL}^{-1}$). O fenótipo *vanC* é associado a baixos níveis de resistência à vancomicina (CIM: 2-4 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e sensibilidade à teicoplanina (CIM: 0,5-1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e codificado pelo gene *vanC*. O fenótipo *vanD*, codificado pelo genótipo *vanD*, confere resistência à vancomicina (CIM: 64-128 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e à teicoplanina (CIM: 4-64 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Já os fenótipos *vanE*, *vanG* e *vanL*, descritos no *E. faecalis*, apresentam

baixo nível de resistência à vancomicina (CIM: 8-16 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e sensibilidade à teicoplanina (CIM: 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Recentemente foi descrito outro gene de resistência, o *vanN* relacionado ao *E. faecium* (Tabela 1) (LEBRETON *et al.*, 2011).

O fenótipo *vanA* é caracterizado por linhagens que apresentam altos níveis de resistência à vancomicina e teicoplanina devido à expressão de genes contidos em um transposon não-conjugativo da família Tn3, Tn1546 (ARTHUR *et al.*, 1996).

O fenótipo *vanB* é composto por linhagens com variados níveis de resistência à vancomicina e sensibilidade à teicoplanina (ARTHUR *et al.*, 1996). Os genes responsáveis pela expressão deste fenótipo é geralmente carregado por um transposon de 64 Kb conhecido como Tn1547. Entretanto, outros transposons também têm sido descritos, como Tn1549 e Tn5382 (CARIAS *et al.*, 1998; GARNIER *et al.*, 2000).

Furtado *et al.* (2005) relatou a incidência de enterococcus resistentes à vancomicina em um Hospital Universitário de São Paulo, SP, Brasil, durante o período de 3 anos. Em 2000, a incidência de resistência à vancomicina foi de 9,5%, aumentando para 14,7% em 2001, e 15,8% em 2002.

Bender *et al.* (2010) demonstram elevadas prevalências de enterococcus resistentes à eritromicina (62,1%), tetraciclina (64,5%), e moderadas à rifampicina, cloranfenicol e ciprofloxacina em dois hospitais de Porto Alegre – RS, Brasil.

Tabela 1: Características dos fenótipos de resistência a vancomicina. Modificado de Sujatha e Praharaj (2012).

Fenótipo	Genótipo	Resistência			Produto	Referências
		Vancomicina	Teicoplanina	Tipo		
VanA *	<i>vanA</i>	Alto nível de resistência (CIM: 64 µg/mL ≥ 1000 µg/mL)	Alto nível de resistência (CIM: 16 µg/mL - 512 µg/mL)	Resistência induzível (alto nível)	D-Ala-D-Lac	Cetinka <i>et al.</i> , 2000
VanB *	<i>vanB</i>	Alto nível de resistência (CIM: 4 - 512 µg/mL)	Sensível (CIM ≤ 0,5 µg/mL)	Resistência induzível (alto nível)	D-Ala-D-Lac	Cetinka <i>et al.</i> , 2000
VanC **	<i>vanC1</i> , <i>vanC2</i> , <i>vanC3</i> .	Baixo nível de resistência (CIM: 2 µg/mL - 32 µg/mL)	Sensível (CIM ≤ 0,5 µg/mL)	Resistência constitutiva (baixo nível)	D-Ala-D-Ser	Cetinka <i>et al.</i> , 2000
VanD	<i>vanD</i>	Moderado - Alto nível de resistência (CIM: 64 µg/mL - 256 µg/mL)	Baixo nível de resistência (CIM - 4 µg/mL - 32 µg/mL)	Resistência induzível	D-Ala-D-Lac	Lebreton <i>et al.</i> , 2011
VanE	<i>vanE</i>	Baixo nível de resistência (CIM: 16 µg/mL)	Sensível (CIM ≤ 0,5 µg/mL)	Resistência induzível	D-Ala-D-Ser	Courvalin <i>et al.</i> , 2006
VanG	<i>vanG</i>	Baixo nível de resistência (CIM ≤ 16 µg/mL)	Sensível (CIM ≤ 0,5 µg/mL)	Resistência induzível	D-Ala-D-Ser	Courvalin <i>et al.</i> , 2006
VanL	<i>vanL</i>	Baixo nível de resistência (CIM 8 µg/mL)	Sensível	Resistência induzível	D-Ala-D-Ser	Boyd <i>et al.</i> , 2008
VanM	<i>vanM</i>	Alto nível de resistência (CIM > 256 µg/mL)	Alto nível de resistência	Resistência induzível	D-Ala-D-Lac	XU <i>et al.</i> , 2010
VanN	<i>vanN</i>	Baixo nível de resistência (MIC - 16 µg/mL)	Sensível (CIM ≤ 0,5 µg/mL)	Resistência constitutiva	D-Ala-D-Ser	Lebreton <i>et al.</i> , 2011

Detectado em * *E. faecalis* e *E. faecium*; ** *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. flavescens*. CIM: concentração inibitória mínima

3.5 Epidemiologia

O enterococco resistente à vancomicina foi isolado inicialmente em uma cultura em paciente com leucemia linfocítica aguda (LLA) em 1998, no Hospital da Universidade Federal de São Paulo, Brasil (CEREDA *et al.*, 2001).

Os primeiros relatos de VRE no Brasil ocorreram em Curitiba (1996), posteriormente em São Paulo e Rio de Janeiro (DALLA *et al.*, 1998).

No Brasil, foi realizado um estudo sobre a incidência de micro-organismos do gênero *Enterococcus* spp. em um hospital situado no estado de São Paulo, no qual foi relatado um aumento progressivo de isolados resistentes à vancomicina nas culturas clínicas positivas para *Enterococcus* spp. durante três anos de estudo. Em 2000, 9,5% das amostras eram resistentes à vancomicina, com aumento de 14,7% em 2001 e 15,8% em 2002. As unidades com maior números de isolados foram, respectivamente, pronto-socorro (19,5%) e UTI geral (15%). O maior número de isolados originaram-se de amostras de urina (36%) e sangue (20%) (FURTADO *et al.*, 2005).

Vários relatos de surtos de VRE no Brasil foram registrados, incluindo relatos de propagação de cepas intra e inter hospitalais (ROSSI, 2011). Em um estudo brasileiro, com 2.563 pacientes apresentando infecção de corrente sanguínea os enterococos foram à oitava causa, sendo que 25% eram VRE em 104 isolados, sendo 55,6% *E. faecium* e 17,6% *E. faecalis* (MARRA *et al.*, 2011).

Winston *et al* (2002), em estudo sobre a epidemiologia do VRE, encontrou que, dentre 181 pacientes com culturas positivas, 69% era proveniente de cultura de urina, e a espécie era *E. faecium* em 100% dos casos.

Em um estudo com 768 pacientes colonizados por VRE, 4,0% dos casos apresentou infecção de corrente sanguínea. A internação prolongada e a presença de outras infecções foram considerados como fatores de risco entre os pacientes colonizados (OLIVEIRA *et al*, 2010).

Perugini (2008) relata em seu trabalho, realizado no Hospital Universitário de Londrina, PR durante o período de maio de 2002 a dezembro de 2007, que a porcentagem de pacientes colonizados e infectados com VRE foi de 6%. Deste total, *E. faecium* representou 83% dos casos. O sítio de infecção mais frequente foi a corrente sanguínea (47%), seguido pelo trato urinário (36%).

Estudos revelaram algumas diferenças na epidemiologia do VRE no Brasil, EUA e Europa. O enterococo é o patógeno prevalente nos EUA, em contraste com a

América Latina. A resistência do enterococo à vancomicina no Brasil foi adquirida principalmente pelo *E. faecalis*, contrastando com a predominância de *E. faecium* nos Estados Unidos e Europa. (ROSSI, 2011).

De acordo com o *Centers for Disease Control and Prevention*, 66.000 casos de infecções relacionadas a assistência a saúde ocorrem nos Estados Unidos a cada ano. A proporção de infecções que ocorrem com VRE de diferentes espécies é de 20.000 casos entre pacientes hospitalizados a cada ano, com cerca de 1.300 mortes atribuídas a estas infecções. Do total de 20.000 casos 77% são *E. faecium* VRE. (CDC, 2013).

Sievert *et al.* (2013), relata os dados da Rede Nacional de Segurança à Saúde no Centro de Controle e Prevenção de Doenças no período de 2009 a 2010. De um total de 81.139 patógenos isolados a partir de 69.475 casos de IRAS (Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde), cerca de 13,9% eram *Enterococcus* spp.

O aumento da incidência de micro-organismos multirresistentes e a falta de opções terapêuticas a curto e médio prazo para tratamento das infecções causadas por essas bactérias reforçam a importância de medidas preventivas para controlar sua disseminação. Micro-organismos como *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Enterobacter* spp (que formam a sigla ESKAPE) são bactérias mais prevalentes causadoras da maioria das infecções relacionadas à assistência à saúde nos EUA e efetivamente “escapam” da ação dos antibacterianos (BOUCHER *et al.*, 2009).

3.6 *Pseudomonas* spp.

Pseudomonas aeruginosa é um importante patógeno humano que está frequentemente associado a infecções hospitalares, acometendo, principalmente, pacientes imunossuprimidos. Esta espécie bacteriana tem sido considerada um patógeno oportunista, uma vez que, raramente, está associada a infecções comunitárias em indivíduos imunocompetentes. (LYCZAK, *et al.*, 2000). *Pseudomonas aeruginosa* pertence à família Pseudomonadaceae e apresenta-se na forma de bastonetes de 0,5 a 0,8 µm de largura por 1,5 a 3,0 µm de comprimento. É um bacilo Gram-negativo, aeróbio, não-esporulado, não-fermentador de glicose e móvel devido à presença de um flagelo polar. As células de *P. aeruginosa* podem ser visualizadas ao microscópio como isoladas, aos pares ou em cadeias curtas, pode ser isolada de água, plantas, solo e tecidos animais e tem habilidade de utilizar vários substratos orgânicos como fontes de carboidrato. Esta

capacidade de sobreviver em diferentes ambientes a torna uma bactéria ubíqua. (POLLACK, *et al.*, 2000).

È um dos grupos mais diversos, com espécies distribuídas em ambientes terrestres ou aquáticos, em associação com plantas e animais (SPIERS, *et al.*, 2000).

As espécies de *Pseudomonas* mais estudadas quanto à produção de metabólitos secundário são *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. cichorii*, *P. syringae*. Os metabólitos secundários produzidos por estas espécies podem ser classificados em 6 tipos: lipídios e compostos relacionados, ácido pseudomônico, fenazinas, derivados de indóis, e pirolnitritinas, e peptídeos ou aminoácidos, metabólitos produzidos por espécies de *Pseudomonas* têm sido testado como controle de patógenos. (BATTU; REDY, 2009, NEIDIG, *et al.*, 2010).

3.7 Produção de Compostos Antibióticos por Bactérias

Os antimicrobianos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

Segundo Jack *et al.* (1995), a maioria das bactérias é capaz de produzir várias substâncias no curso de seu crescimento *in vitro*, que podem ser inibitórias tanto para si quanto para outras bactérias. Essas substâncias poderão exercer efeito bactericida ou bacteriostático. Tais substâncias incluem: toxinas, enzimas bacteriolíticas como lisotafina; fosfolipase A e hemolisinas; subprodutos de vias metabólicas primária como ácidos orgânicos, amônia e peróxido de hidrogênio e vários outros metabólitos secundários; substâncias antibióticas como garamicina e bacitracina, que são sintetizadas por complexos enzimáticos; e as bacteriocinas.

Cepas de *P. aeruginosa* produzem piocinas, que também são bacteriocinas que provocam a despolarização da membrana citoplasmática com a formação de poros, estas cepas destacam-se por produzirem inúmeros compostos metabólicos que apresentam atividade antibiótica (MICHEL-BRIAND e BAYSSE, 2002). Outro composto com ação antibiótica é a pioluteorina, isolada pela primeira vez em 1950 de uma cultura de *P. aeruginosa* (TAKEDA, 1958).

Oliveira *et al.* (2011) descreveram a produção de metabólitos por *Pseudomonas* spp., para fins de biocontrole contra *Xanthomonas citri* pv. *citri*, causadora do cancro cítrico. O interesse crescente por bactérias produtoras de antibióticos está relacionado à necessidade de descobrir novos fármacos, mais eficientes do que os

existentes no mercado, além do interesse na utilização como biocontrole.

Pseudomonas sp. produz as cepafunginas I, II, III, que são classificados como acilpeptídeos neutros, solúveis em soluções alcoólicas e em dimetil sulfóxido. Esses possuem atividade inibitória contra fungos e leveduras como *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Microsporium canis*, *Trichophyton rubrum* e etc (SHOJI *et al.*, 1989). E cepacidines que são glicopeptídeos da *Burkholderia cepacia* são ativas contra *Candida sp*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* e *Criptococcus neoformans* (LEE *et al.*, 1994).

Morales *et al.* (2015) observou a atividade antimicrobiana de duas fenazinas produzidas por *P. aeruginosa*, a piocianina e seu precursor biossintético 5-metilphenazinium-1-carboxilato frente a *C. albicans*. As fenazinas compõem uma grande família que apresenta atividade antibiótica e antiparasitária, além de atividade antitumoral (GROSS; LOPER, 2009).

REFERÊNCIAS

AITCHISON, E.J.; LAMBERT, P.A.; SMITH, E.G.; FARRELL, I.D. Serodiagnosis of *Streptococcus faecalis* endocarditis by immunoblotting of surface protein antigens. **Journal Clinical Microbiology**, v. 25, p. 211-215, 1987.

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

BALDASSARI, L. *et al.* Variant *esp* gene in a vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium*. **Lancet**, v. 357, p. 1802, 2001.

BALDASSARI, L.; CECCHINI, R.; BERTUCCINI, L.; AMMENDOLIA, M.G., IOSI, F.; ARCIOLA, C.R.; MONTANARO, L.; DI ROSA, R.; GHERARDI, G. *et al.* *Enterococcus spp.* produces slime and survives in rat peritoneal macrophages. **Med Microbiol Immunol**, v.190, p.113-120, 2004.

BENDER, E.A.; FREITAS, A.L.P.; BARTH, L.A. Avaliação do perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *Enterococcus spp.* Isolados em dois hospitais de Porto Alegre – RS, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira Análises Clínicas**, v.42, n.1, p. 15-19, 2010.

BERT, F.; LEFOLON-GUIBOUT, V.; LE GRAND, J.; BOURDON, N.; NICOLAS-CHANOINE, M.H. Emergence d'enterocoque dependant de la vancomycine à la suite d'un traitement par glycopeptide: cas clinique et revue Emergence of vancomycin-dependent enterococci following glycopeptide therapy : Case report and review. **Phatologie Biologie**, v.57, p.56-60, 2009.

BOOTH, M.C.; BOGIE, C.P.; SAHL, H.G.; SIEZEN, R.J.; HATTER, K.L.; GILMORE, M.S. Structural analysis and proteolytic activation of *Enterococcus faecalis* cytolysin, a novel lantibiotic. **Molecular Microbiology**, v. 21, p. 1175-1184, 1996.

BOUCHER, H.W.; TALBOT, G.H.; BRADLEY, J.S.; EDWARDS, J.E.; JR GILBERT, D.; RICE, L.B.; SCHELD, M.; SPELLBERG, B.; BARTLETT, J. Bad bugs, no drugs : no ESKAPE! Na update from the infectious diseases society of American. **Clin Infect Dis**, v. 48, p. 1-12, 2009.

CARIAS, L.L.; RUDIN, S.D.; DONSKEY, C.J.; RICE, L.B. Genetic linkage and cotransfer of a novel, *vanB*-Containing transposon (Tn5382) and low-affinity penicillin-binding protein 5 Gene in a Clinical Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* isolate. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 4426-4434, 1998.

CATE, J.M. Biofilms, a new approach to the Microbiology of dental plaque. **Odontology**, n. 94, p. 1-9, 2006.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Antibiotic Resistance Threats in the United States**, Atlanta: CDC; 2013

CENTINKAYA, Y.; FALK, P.; MAYHALL, C.G. Vancomycin-resistant enterococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, p. 686-707, 2000.

CEREDA, R.; SADER, H., SEJAS, L.; MACHADO, A.; ZANATTA, Y.; REGO, S., *et al.* *Enterococcus faecalis* resistente to vancomycin and teicoplanin (VanA phenotype) isolated from a bone marrow transplanted patient in Brazil. **Braz J Infect Dis**, v.5, p. 40-6, 2001.

CHANG, S.; SIEVERT, D.M.; HAGEMAN, J.C.; BOULTON, M.; TENOVER, F.; POUCH DOWNES, F.; SHAH, S.; RUDRIK, J.; PUPP, G.; BROWN, W.; CARDO, D.; FRIDKINS, S. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. **New England Journal of Medicine**, v.348, p.342-347, 2003.

CHIVERS, L.S.; MOSER, S.A.; BENJAMIN, W.H.; BANKS, S.E.; STEINHAUER, J.R.; SMITH, A.M.; JOHNSON, C.N.; FUNKHOUSER, E.; CHIVERS, L.P.; STAM, A.M.; WAITES, K.B. Vancomycin-resistant enterococci: 15 years and counting. **Journal of Hospital Infection**, v.53, p. 159-171, 2003.

CHAVES DE PAZ, L.C. Redefining the persistente infection in root canal: possible role of biofilm communities. **J Endod**, v. 33, p.652-662, 2007.

CHOW, J.W.; THAL, L.A.; PERRI, M.B.; VAZQUEZ, J.A.; DONABEDIANM, S.M.; CLEWELL, D.B & ZERVOS, M.J. Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 37 (11), p. 2474-2477, 1993.

CLEWELL, D.B. Movable genetic elements and antibiotic resistance in enterococci. **European Journal of Clinical Microbiology Infection Diseases**, v.9, p. 90-102, 1990.

COURVALIN, P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. **Clin Infect Dis.**, v.1, p. 25-34, 2006.

DAROUICHE, R. O. Device-associated infections: a macroproblem that starts with microadherence. **Clinical Infection Diseases**, v. 33, p. 1567–1572, 2001

DALLA, L.M.C.; SOUZA, D.C.; MARTINS, L.T.; ZANELLA, R.C.; BRANDILONE, M.C.; BOKERMANN, S. *et al.* Vancomycin-resistant enterococcus faecium: first case in Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 2(3), p. 160-3, 1998.

DEMAIN, A.L. Microbial biotechnology. **Elsevier**, v.18, p. 26-31, 2000.

DEMAIN, A.L.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **The Journal of Antibiotics**, v. 62, p. 5-16, 2009.

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

FLACH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 291-296, 2005.

FACKLAM, R. R.; COLLINS, M. D. identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. **J Clin Microbiol**, v. 27, p. 731-734, 1989.

FISCHBACH, M.A.; WALSH, C.T. Antibiotics for emerging pathogens. **Science**, v. 325(5944), p. 1089-1093, 2009.

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

FONTANA, R.; LIGOZZI, M.; PITTALUGA, F.& SATTA, G. Intrinsic penicillin resistance in enterococci. **Microbial Drug Resistance**, v.2, p. 209-213, 1996.

FURTADO, G.H.C.; MARTINS,S.; COUTINHO, A.P.; SOARES, G.M.M.; WHEY, S.B.; MEDEIROS, E.A.S. Incidence of vancomycin-resistant *Enterococcus* at a university hospital in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v.39, p. 41-6, 2005.

GARNIER, F.; TAOURIT, S.; GLASER, P.; COURVALIN, P.; GALIMAND, M. Characterization of transposon Tn1549, conferring VanB-type resistance in *Enterococcus* spp. **Microbiology**, v. 146, p. 1481-1489, 2000.

KOBAYAKAWA, S.; JETT, BD.; GILMORE, M.S. Biofilm formation by *Enterococcus faecalis* on intraocular lens material. **Curr Eye Res.**, v. 30(9); p. 741-5, 2005.

GAMA, B.A. Análise da resistência antimicrobiana e de genes de virulência e de *Enterococcus* spp. Dissertação (Mestrado em Ciências) Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. RS, Brasil, 2008.

GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, 2010.

GROSS, H.; LOPER, J.E. Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. **Natural Product Reports**, v. 26, p. 1408-1446, 2009.

HACKER, J.; KAPER, J.B.; Pathogenicity islands and the evolution of microbes. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, p. 641-679, 2000.

HANCOCK, L.E. e GILMORE, M.S. Pathogenicity of enterococci. In: Fischetti, V.A.; Novick, R.P.; Ferretti, J.J.; Portnoy, D.A.; Rood, J.L. (Eds.). **Gram-positive pathogens**, Washington, D.C.; ASM Press, pp.251-258, 2000.

HARDIE, J. M.; WHILEY, R.A. Classification and overview of genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, v. 83, p.1-11, 1997.

HOIBY, N.; BJARNSHOLT, T.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S.; CIOFU, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v.35, p.322-332, 2010.

JACK, R.W; TAGG, J.R; RAY, B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Microbiol. Rev**, v.39, n.2, p. 171-200, 1995.

JOYANES, P.; JOYANES, P.; PASCUAL, A.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; HEVIA, A., PEREA, E.J. *In vitro* adherence of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* to plastic biomaterials. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 5, n. 6, p. 382–386, 1999.

KAYSER, F.H. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 255-256, 2003.

KAK, V. & CHOW, J.W. Acquired antibiotic resistances in *Enterococci*. In: Gilmore, M.S., Clewell, D.B., Courvalin, P., Dunny, G.M., Murray, B.E & Rice, L.B. The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance. **Washington, AMS Press**, p.355-363, 2002.

KEANE, P.F.; BONNER, M.C.; JOHNSTON, S.R.; ZAFAR, A.; GORMAN, S.P. Characterization of biofilm and encrustation on ureteric stents in vivo. **Brazilian Journal of Urology**, v. 73, p. 687–691, 1994.

LEBRETON, F.; DEPARDIEU, F.; BOURDON, N.; FINES-GUYON, M.; BERGER, P.; CAMIADES, S.; LECLERQ, 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.

KONEMAM, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; JR. W.; WASHINGTON, C. **Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas colorido**. 5ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.

KOBAYAKAWA, S.; JETT, B.D.; e GILMORE, M.S. Biofilm formation by enterococcus faecalis on Intraocular lens material. **Current eye research**, v. 30(9), p. 741-745, 2005.

LEE, C.H. *et al.* Cepacidine A, a novel antifungal antibiotic produced by *Pseudomonas cepacia*. **J. Antibiotics**. v. 47, p.1402-1405, 1994

LEE, D.K.; KIM, Y.; PARK, K.S.; YANG, J.W.; KIM, K.; HA NJ Antimicrobial activity of mupirocin, daptomycin, linezolid, quinupristin/dalfopristin and tigecycline against vancomycin-resistant enterococci (VRE) from clinical isolates in Korea (1998 and 2005). **J Biochem Mol Biol**, v. 40(6), p. 881-887, 2007.

LECRERCQ, R. Epidemiological and resistance issues in multidrug-resistant staphylococci. **Clinical Microbiology and Infections**, v. 15, n.3, 2009.

LONG, J.K.; CHOUERI, T.K.; HALL, G.S.; AVERY, R.K.; SEKERES, M.A. Daptomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a patient with acute myeloid leukemia. **Mayo Clin Proc**, v. 80(9), p.1215-6, 2005.

LIGON, J.M *et al.* Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. **Pest Management Science.**, v. 56, p. 688- 695,

2000.

LYCZAK, J.B.; CANNON, C.L.; PIER, G.B. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. **Microbes and Infection**, v. 2, p.1051-1060, 2000.

MARRA, A.L; CAMARGO, L.F; PIGNATARI, A.C.C; SUKIENNIK, T; BEHAR, P.R.P; MEDEIROS, E.A.S; RIBEIRO, J; GIRÃO, E; CORREA, L; GUERRA, C; BRITES, C; PEREIRA, C.A.P; CARNEIRO, I, REIS, M.A; SOUZA, M.A; TRANCHESI, R; BARATA, C.U; EDMOND, M.B. Brazilian SCOPE Study Group. Nosocomial Bloodstream Infections in Brazilian Hospitals: Analysis of 2,563 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. **J Clin Microbiol**, v. 49 p. 1866– 871, 2011.

MAROTHI, Y.A.; AGNIHOTRI, H. & DUBEY, D. Enterococcal resistance – na overview. **Indian. J. Med. Microbiol**, v.23, p. 214-219, 2005.

MICHEL-BRIAND, Y. BAYSSE, C. The piocins of *Pseudomonas aeruginosa*. **Biochimie**, v. 84, p. 499-510, 2002.

MOHAMED, J.A & HUANG, D.B. Biofilm formation by enterococci. **Journal os medical mrobiology**, v.56, p. 1581-1588, 2007.

MORALES, D.K. *et al.* **Control of *Candida albicans* Metabolism and Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa* Phenazines**. 2013. Disponivel em: <HTTP://mbio.asms.org>. Acesso em: 10 de fevereiro 2015.

MUNDY, L.M.; SHAM, D.F.; GILMORE, M. Relationships between enterococcal virulence and microbiol resistance. **Clinical Microbiology Rewviews**,v. 13, n. 6, p. 513-522, 2000.

MURRAY, B.E. The Life and time of the *Enterococcus*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.3, n.1, p. 46-65, 1990.

MURRAY, B.E. Vancomycin – Resistent Enterococcal Infections. **The New England Journal of Medicine**, v. 342, p. 710-721, 2000.

MUSK, D.J.JR.; HERGENROTHER, P.J. Chemical countermeasures for the control of bacterial biofilms: effective compounds and promising targets. **Curr. Med. Chem.**, v. 13, p. 2163-2177, 2006.

NEIDIG, N.; PAUL, R.; SCHEUS, S.; JOUSSET, A. Secondary metabolites of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 drive complex non-trophic interaction with bacterivoides nematodes. **Microbiology: Ecology**, in press: DOI/10.1007/s00248-011-9821-2.

OLIVEIRA, A.C.; BTTCHER, L. Aspectos epidemiológicos da ocorrência do *Enterococcus* resistente a Vancomicina. **Ver Esc Enferm USP**, v. 44(3), p. 725-731, 2010.

OLIVEIRA, A.G.; MURATE, L.S.; SPAGO, F.R.; LOPES, L.P.; BERANGER, J.P.O.; SAN MARTIN, J.A.B.; NOGUEIRA, M.A.; MELLO, J.C.P.; ANDRADE, C.G.T.J.; ANDRADE, G. Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain. **Biological Control**, v. 56, p. 125–131, 2011.

PERUGINI, M.R.E. Avaliação do impacto de medidas de intervenção no Controle de *Enterococcus spp* resistente à Vancomicina em Unidade de terapia Intensiva. São Paulo [Dissertação de Doutorado em Ciências – USP], 2008.

PORTENIER, I.; WALTIMO, T.M.T.; HAAPASALO, M. *Enterococcus faecalis* – The rot canal survivor and “Star” in Post-Treatment Disease. **Endodontic Topics**, v.6, p.135-139, 2003.

POLLACK, M. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell D. Benneths J e Dolin R. Principles and Praticce of Infectious Diseases. Churchill Livingstone, New York, 2310, 2000.

ROSSI, F.; ANDREAZI, D.B. **Resistência Bacteriana: interpretando o antibiograma**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

ROSSI, F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. **Clin Infect Dis**, v. 52(9), p. 1138-1143, 2011.

ROZDZINSKI, E.; MARRE, R.; SUSA, M.; WIRTH, R. & MUSCHOLL-SILBERHORN, A. Aggregation substance-mediated adherence of *Enterococcus faecalis* to immobilized extracellular matrix proteins. **Microb. Pathog.** V. 30, p. 211-220, 2001.

RUZON, F.I. et al. Virulence determinants in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* *vanA* isolated from different sources at University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil. **The Journal Microbiology**, v.48, n.6, p. 814-821, 2010.

SANDOE, J.A.T.; WITHERDEN I.R.; COVE J.H.; HERITAGE, J.; WILCOX, M.H. Correlation between enterococcal biofilm formation in vitro and medical-device-related infection potential in vivo. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, p. 547-550, 2003.

SARTINGEN, S.; ROZDZINSKI, E.; MUSCHOLL-SILBERHORN, A. & MARRE, R. Aggregation substance increases adherence and internalization, but not translocation, of *Enterococcus faecalis* through different intestinal epithelial cells in vitro. **Infect. Immun**, v. 68, p. 6044-6047, 2000.

SIEVERT, D.M; RICKS, P.; EDWARDS, JR.; SCHNEIDER, A.; PATEL, J.; SRINIVASEN, A.; KALLEN, A.; LIMBAGO, B.; FRIDKUN, S. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: Summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centres for Disease Control and Prevention, 2009-2010, **Infect Control Hosp. Epidemiol**, v.34(1), p.1-14, 2013.

SCHABERG, D.R.; ZERVOS, M.J. Intergeneric and interspecies gene exchange in gram-positive cocci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 30, n. 6, p. 817-822, 1986.

SCHLEIFER, K.H; KLIPPER-BALZ, R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. ver. As *Enterococcus faecalis*

comb. Nov. and *Enterococcus faecium* comb. Nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, y 34, p.31-34, 1984.

SCHLIEVERT, P.M.; GAHAR, P.J.; ASSMACOPOULUOS, A.P.; DINGES, M.M.; STOEHR, J.A.; HARMALA, J.M; HIRT, H.; DUNNY, G.M. Aggregation and binding substances enhance pathogenicity in rabbit models of *Enterococcus faecalis* endocarditis. **Infection and immunity**, v. 66, n. 1, p. 218-223, 1998.

SHANKAR, V.; BAGHDAYAN, A.S.; HUYCKE, M.M.; LINDHL, G. & GILMORE, M.S. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. **Infect. Immun**, v. 67, p. 193-200, 1999.

SHANKAR, N.; LOCKATELL, C.V.; BAGHDAYAN, A.S.; DRACHENBERG, C.; GILMORE, M.S. & JHONSON, D.E. Role of *Enterococcus faecium* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. **Infect. Immun**, v. 69(7), p.4366-72, 2001.

SHANKAR, N.; BAGHDAYAN, A.S.; GILMORE, M.S. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. **Nature**. v.417, p. 746-750, 2002.

SHEPARD, B.D.; GILMORE, M.S. Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. **Microbes infect**, v.4, p.215-224, 2002.

SHOJI, J. *et al.* **Isolation of cepafunginas I, II, and III from Pseudomonas species. The Journal of Antibiotics**. v. 43, p. 784-787. 1989

SOOD,S., MALHOTRA, M., DAS, B.K. E KAPRIL, A. Enterococcal infections & antimicrobial resistance. **The Indian Journal of Medical Research**, v.128, p. 111-112, 2008.

SPIERS, A.J.; BUCKLING, A.; RAINEY, P.B. The causes of *Pseudomonas* diversity. **Microbiology**, v. 146, p. 2345-2350, 2000.

SU, Y.A.; SULAVIK, M.C.; HE, P.; MAKINEN, K.K.; MAKINEN, P.L.; FIEDLER, S.; WIRTH, R.; CLEWELL, D.B. Nucleotide sequence of the gelatinase gene (*gelE*) from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. **Infection and Immunity**, v. 59, p. 415-420, 1991.

SUJATHA, S.; PAHARAJ, I. Glycopeptides Resistance in Gram-Positive Cocci: A Review. **Indisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2012, p. 1-10, 2012.

TAKEDA, R. Structure of a new antibiotic, pyoluteorin. **Journal of American Chemotherapy Society**, v. 80, p. 4749-4750, 1958

TEIXEIRA, L & FACKLAM, R in MURRAY, P.B.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A. and YOLKEN R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. 8^a ed, Washington, DC: MAS Press, p.422, 2004.

TENDOLKAR, P.M., BAGHDAYAN, A.S., SHANKAR, N. Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 60, p. 2622-2636, 2003.

TENDOLKAR, P.M., BAGHDAYAN, A.S.; GILMORE, M.S & SHANKAR, N. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. **Infect Immun**, v. 72, p.6032-6039, 2004.

TOLEDO-ARANA, A.; VALLE, J.; SOLANO, C.; ARRIZUBIETA, M.L.; CACARELLA, C.; LAMATA, M.; AMORENA, B.; LEIVA, J.; PENADE'S, J.R. & LASA, I. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. **Appl. Environ. Microbiol**, v.67, p. 4538-4545, 2001.

TORRES, C.; TENORIO, C.; LANTERO, M.; GASTAÑARES, M.J. & BAQUERO, F. High-level penicillin persistence and penicillin-gentamicin synergy in *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.37, p. 2427-2431, 1993.

TOP, J., WILLEMS, R.; BONTEN, M. Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.52, p. 297-308, 2008.

VALDÉS, D.L.; MUGUERCA, H.L.; TORRES, M.L.H.; ARIAS, E.R.; MARÍN, R.Z. & PRADERES, L.J. Penicilinas. **Acta Médica**, v.8, p. 28-39, 1998.

VAN WAMEL, W.J.; HENDRICKX, A.P.; BONTEN, M.J.; TOP, J.; POSTHUMA, G.; WILLEMS, R.J.; Growth condition-dependent Esp expression by *Enterococcus faecium* affects initial adherence and biofilm formation. **Infection and Immunity** 75: 924-931, 2007

WERNER, G.; COQUE, T.M.; HAMMERUM, A.M, HOPE, R, HRYNIEWICZ, W. ; JOHNSON A.; KLARE, I.; KRISTINSSON, K.G, LECLERCQ, R.; LESTER, C.H, LILLIE M.; NOVAIS, C.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PEIXE, L. V, SADOWY, E.; SIMONSEN, G.S.; TOP, J. VUOPIO-VARKILA, J.; WILLEMS, R.J.; WITTE, W.; WOODFORD, N. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. **Eurosurveillance**. v. 13, n. 47, 2008. Disponível em: www.eurosurveillance.org

WERNER G 2012. **Current Trends of Emergence and Spread of Vancomycin-Resistant Enterococci**. In Marina Pana, editor. Antibiotic resistant bacteria - a continuous challenge in the new millennium Croatia Intech free online at www.intechopen.com

WILLEMS, R.J.; HOMAN, W.; TOP, J.; VAN SANTEN-VERHEUVEL, M.; TRIBE, D.; MANZIOROS, X.; GAILLARD, C.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M.; MASCINI, E.M.; VAN KREGTEN, E.; VAN EMBDEN, J.D.; BONTEN, M.J. Variant *esp* gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. **Lancet**, v. 357, p. 853-855, 2001

WILLEMS, R. J. L.; BONTEN, M. J. M. Glycopeptide-resistant enterococci: deciphering virulence, resistance and epidemicity. **Curr Opin Infect Dis**, v.20, p. 384-390, 2007.

WINSTON, L.G.; BANGSBERG, D.R.; CHAMBERS, H.F.; FELT, S.C.; ROSEN, J.L.; CHARLEBOIS, E.D *et al.* Epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* under a selective isolation policy at an urban country hospital. **Am J Infect Control**, v. 30, p. 400-6, 2002.

WOODFORD, N.; SOLTANI, M.; HARDY, K. J. Frequency of *esp* in *Enterococcus faecium* isolates. **Lancet**, v. 358, p. 584, 2001.

Artigo

Atividade antibiótica de metabólito secundário produzido por *Pseudomonas aeruginosa* em células planctônicas e biofilme de *Enterococcus faecium*.

Deise Palazini Amichi¹, Alexandre Tadachi Morey², Vanessa Fogaça de Freitas ¹, Ane Stefano Simionato¹, Miguel Pèrez Navarro¹, Ana Carolina Polano Vivan¹, Admilton Gonçalves de Oliveira¹, Sueli Fumie Yamada Ogatta², Galdino Andrade^{1a}

¹Departamento de Microbiologia, Laboratório de Ecologia Microbiana, CCB, Universidade Estadual de Londrina, CEP 86051-990, Brasil

²Departamento de Microbiologia, Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, CEP 86051-990, Brasil

^aCorresponding author: Galdino Andrade, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Ecologia Microbiana, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Caixa Postal 6001, CEP 86051-990, Brazil

Phone/Fax: +554333714791; E-mail: andradeg@uel.br

AMICHI, DEISE PALAZINI. **ATIVIDADE ANTIBIÓTICA DE METABÓLITO SECUNDÁRIO PRODUZIDO POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* EM CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILME DE *ENTEROCOCCUS FAECIUM***. 2015. 59f. DISSERTAÇÃO (MESTRADO EM MICROBIOLOGIA) – UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA, LONDRINA, 2015.

RESUMO

Os enterococos são uma das principais causas de infecções relacionadas à assistência à saúde, devido ao aumento da resistência a uma vasta gama de antibióticos. *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* são os isolados mais comuns. O desenvolvimento de resistência à vancomicina tem sido descrito a partir do final da década de 80 e desde então foi observado um aumento das infecções e colonizações por VRE. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antibiótica da substância bioativa produzida por *Pseudomonas aeruginosa*, cepa LV, sobre células planctônicas e biofilme de *E. faecium* resistente à vancomicina (VREfm). Avaliou-se a atividade antibiótica em células planctônicas por microdiluição, determinando a concentração inibitória mínima (CIM) e o efeito da ação desta substância sobre a viabilidade celular, à adesão à superfície de poliestireno e formação de biofilme. A menor concentração capaz de inibir 100% do crescimento foi de $15,6 \mu\text{g mL}^{-1}$. Na curva de crescimento e tempo de morte observou-se uma redução das células viáveis entre (2-8h). A substância F3d provocou uma importante redução, acima de 60%, na inibição de adesão das amostras de VREfm em superfície de poliestireno nas concentrações de $15,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $7,8 \mu\text{g mL}^{-1}$. Houve uma diminuição de 80% de células viáveis sobre a formação do biofilme, nas mesmas concentrações, e ainda uma redução acima de 50% do biofilme formado, na concentração de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$, com significativa redução da viabilidade celular. A atividade efetiva antibiótica e a baixa toxicidade para o hospedeiro sugerem um potencial agente antibacteriano. Entretanto, novos estudos farmacológicos serão necessários para confirmar esta hipótese.

Palavras Chave: *Enterococcus* spp.; *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina (VREfm); *Pseudomonas* sp.; Biofilme.

AMICHI, DEISE PALAZINI. ANTIBIOTIC ACTIVITY OF SECONDARY METABOLITE PRODUCED BY *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* IN PLANKTONIC CELLS AND *ENTEROCOCCUS FAECIUM* BIOFILM. 2015. 59P. THESIS (MASTER'S DEGREE IN MICROBIOLOGY) – UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA, LONDRINA, 2015.

ABSTRACT

Enterococci are one of the main causes of health care related infections due to increased resistance to a broad range of antibiotics. *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* are the most common isolates. The development of Vancomycin resistance has been described from the end of the 80's and since then an increase in infections and colonization by vancomycin resistance *Enterococcus* (VRE) has been observed. The aim of this study was to evaluate the antibiotic activity of the bioactive substance produced by *Pseudomonas aeruginosa* (LV strain) on planktonic cells and biofilms of Vancomycin Resistant *E. faecium* (VREfm). We evaluated the antibiotic activity planktonic cells in microdilution by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and the effect this substance's action on the cell viability, adhesion to polystyrene surface and biofilm formation. The lowest concentration able to inhibit 100% growth was $15.6 \mu\text{g mL}^{-1}$. Regarding the growth curve and death-time, a reduction of viable cell within 2-8 hours was observed. The F3D substance caused a significant reduction, above 60%, in inhibiting adhesion of VREfm samples to polystyrene surface in concentrations of $15.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $7.8 \text{ mg L}^{-1} \mu\text{g mL}^{-1}$. There was an 80% decrease of viable cells on biofilm formation at the same concentrations and also a reduction of over 50% of the formed biofilm at the concentration of $250 \mu\text{g mL}^{-1}$, with a significant reduction in cell viability. The effective antibiotic activity and low toxicity to the host suggest a potential antibacterial agent. However, new pharmacological studies are needed to confirm this hypothesis.

Key words: *Enterococcus* spp.; Vancomycin Resistant *Enterococcus faecium* (VREfm); *Pseudomonas* sp.; Biofilm.

1 INTRODUÇÃO

Os enterococos são considerados habitantes normais do trato gastrointestinal de seres humanos e animais. (MURRAY, 2000). *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* são as espécies mais comuns para causar infecções e durante as últimas décadas *E. faecium* tornou-se um dos responsáveis pela maioria das infecções relacionadas à assistência à saúde, devido ao aumento da resistência aos antibióticos. (SIEVERT, *et al.*, 2013).

Outros fatores de risco nos processos infecciosos por *Enterococcus* sp resistente à vancomicina (VRE) são: doença grave; cirurgia abdominal ou cardiotorácica; sondagem vesical ou cateterismo venoso central; presença de ferida aberta ou uso de múltiplos antibióticos, incluindo vancomicina (CENTINKAYA, *et al.*, 2000; CLSI, 2012), além dos fatores extrínsecos como a contaminação ambiental e transmissão cruzada pelas mãos dos profissionais de saúde (CENTINKAYA, *et al.*, 2000).

Os enterococos foram associados com biofilmes em endocardites, infecções do trato urinário, infecções do canal radicular, e infecções oculares, e a uma variedade de infecções relacionadas a dispositivos em que o biofilme foi encontrado, como: próteses de quadril, dispositivo intrauterino, próteses cardíacas e catéteres (DISTEL, 2002; DAUTLE, 2002; DONLAN, 2002; MAHAMED, 2004; ZEGANS, 2002; LEUNG, 2002; SABBUBA, 2002).

Em alguns casos, a concentração de antimicrobiano necessária para exercer atividade bactericida frente a filmes biológicos pode ser mais de três a quatro vezes a maior comparada à quantidade necessária para ter ação sobre organismos planctônicos (CERI, *et al.*, 1999; SCHIERHOLZ, *et al.*, 1999).

A expansão e um aumento nos incentivos econômicos na área de pesquisa de produtos naturais é fundamental para pesquisas acadêmicas, atraindo o investimento de indústrias farmacêuticas (MOSSIALOS *et al.* 2010).

Neste sentido, extratos do metabólito secundário de *Pseudomonas aeruginosa* vem sendo aplicados em estudos no controle de *Xanthomonas citri* (OLIVEIRA *et al.*, 2011) e *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (CARDOZO *et al.*, 2013).

Neste estudo, o objetivo foi avaliar a atividade antibiótica da fração semi-purificada F3d (diclorometano/acetato de etila) produzida pela cepa LV (*P. aeruginosa*)

em células planctônicas e biofilme de *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina (VREfm).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Micro-organismos

2.1.1 Enterococcus faecium

Dez isolados clínicos de VREfm, previamente identificados e caracterizados (RUZON, *et al.*, 2010, GOMES, L.V.P, 2013) (Tabela 2) e *E. faecium* ATCC 6569, foram cultivados em caldo BHI (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.) a 37° C por 24 horas. Os isolados foram estocados em caldo BHI contendo glicerol 20% a -20° C.

Tabela 2: Caracterização dos 10 isolados de *Enterococcus faecium* selecionados

Isolado	Sexo	Idade	Setor	Data da coleta	Origem	PFGE^a
17	M	82	UT2	22-07-2005	Urina	E
170	F	4	Ambulatório	27-04-2007	Urina	N
5	M	71	UT2	26-07-2005	Secreção de bolsa escrotal	B
167	M	43	UT2	11-04-2007	Urina	P
172	M	92	PS	14-08-2007	Urina	B
15	M	33	UT2	15-12-2005	Urina	B2
35	F	71	UD	30-10-2006	Sangue	B
176	M	68	UTI	16-07-2007	Sangue	B4
37	F	84	UTI	04-12-2006	Urina	B7
47	M	71	UTI2	26-03-2007	Swab retal	B7

^aFonte Ruzon et al., 2010.

Tabela 3: Características do *Enterococcus faecium* isolados a partir de diferentes fontes no Hospital Universitário de Londrina, Paraná. Adaptado Ruzon, *et al.*, 2010.

Amostras ^a	Resistência ^b	Fatores de Virulência ^C						
		<i>cylA</i>	Hemolisina	<i>efaA</i>	Adesina	<i>esp</i>	<i>gel/E</i>	Gelatinase
5 (I)	Amp, cip, eri, tei, tet, van	+	+	+	-	+	+	+
15 (C)	Amp, cip, eri, tei, tet, van	+	+	+	-	+	+	-
17 (I)	Amp, cip, eri, tei, van	+	+	-	-	+	+	+
35 (I)	Amp, cip, eri, tei, tet, van	+	+	+	-	+	-	-
37 (I)	Amp, cip, eri, tei, tet, van	+	+	+	-	+	+	-
47 (I)	Amp, cip, eri, tei, tet, van	-	-	+	-	+	-	+
167 (I)	Amp, cip, eri, tei, tet, van	-	-	+	-	+	+	-
170 (I)	Amp, cip, eri, str, tei, tet, van	-	-	+	-	+	+	+
172 (I)	Amp, cip, eri, tei, tet, van	-	-	+	-	+	+	+
176 (C)	Amp,cip,eri,tei,tet,van	+	+	+	-	+	-	-

^a Fonte do isolado: C, colonização e I, infecção.-

^b Grupo de perfil de resistência antimicrobiana.

^c Símbolos: +, presença/ expressão de fator de virulência; -, ausência de fator de virulência.

Tabela 4: Alelo (ST) de cada gene analisado pelo banco de dados mlst.net, associado aos fatores de virulência *esp* e *hyl* dos 10 isolados

Isolado	<i>esp</i>	<i>hyl</i>	ST
17	+	-	412
170	+	-	658
5	+	-	730
167	+	-	412
172	+	-	412
15	+	-	412
35	+	-	203
176	+	-	412
37	+	-	742
47	+	-	596

Ruzon, et al., 2010.

2.1.2 Bactéria antagonista *Pseudomonas aeruginosa*

A bactéria antagonista utilizada neste estudo foi *P. aeruginosa* (cepa LV), isolada a partir de lesões de cancro cítrico em fruto de laranja coletadas em pomar no Município de Astorga, PR (RAMPAZO, 2004). A cepa foi armazenada com 20% de glicerol em caldo nutriente -20 °C.

2.2 Obtenção de substâncias antibiótica

O método de isolamento e purificação da substância com ação antibiótica (F3d) foi patenteado (INPI PI0803350-1; Oliveira et al. 2011) e obtido a partir do sobrenadante da cepa *P. aeruginosa* LV cultivados por 10 dias a 28 °C em caldo nutriente suplementado com 100 mg L⁻¹ Cu₂Cl₂.2H₂O.

2.3 Citotoxicidade

A linhagem celular LLC-MK₂ foi cultivada em uma placa de cultura de 96 poços a uma densidade de $2,5 \times 10^5$ células/poços e incubada durante 24 horas. Posteriormente, as células não aderentes foram removidas por lavagem com 0,01 M de fosfato estéril tamponado salino (PBS). O meio contendo diferentes concentrações de F3d (1 a 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foi adicionado a cada poço contendo as células, e as placas foram incubadas durante 72 horas. Para os controles, as células foram cultivadas em meio de crescimento na presença de 1% de DMSO. A viabilidade celular foi determinada pelo método de dimethylthiazol diphenyl tetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich, USA), de acordo com a recomendação do fabricante. A concentração do composto necessária para inibir a viabilidade das células em 50% (IC₅₀) foi determinada por análise de regressão. A concentração citotóxica de 50% (CC_{50/72h}) e o índice de seletividade (SI) foram calculados usando a equação: $SI = CC_{50} / IC_{50}$.

2.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A CIM foi determinada pelo método de microdiluição em caldo em microplacas com 96 poços, de acordo com o proposto pelo CLSI (2012) com modificações. O inóculo foi preparado a partir da cultura dos 10 isolados de VREfm e *E. faecium* ATCC 6569 cultivados em BHI por 24 horas a 37 °C. Foram adicionados 100 μL de cada inóculo na concentração de 0,5 MacFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC mL^{-1}) nos seus respectivos poços na placa, contendo a substância antimicrobiana F3d na concentração que variou de 125 a 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Foram realizados controle de esterilidade do meio de cultivo, de crescimento do inóculo e esterilidade da substância F3d com 0,5% (v/v) do diluente (dimetilsulfóxido-DMSO). As microplacas foram incubadas por 24 horas a 37 °C e observado o crescimento celular. Este foi revelado com a adição de 10 μL de uma solução de cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (TTC) 1% e incubado por 20 minutos à 37 °C, utilizando leitura visual. Todos os testes foram realizados em triplicata, com três repetições.

2.5 Atividade antibiótica da substância F3d em biofilme formado de *E. faecium*

Os isolados de VREfm da (Tabela 2) e *E. faecium* ATCC 6569 foram cultivados em caldo BHI suplementado com 1% de glicose (RUZON, *et al.*, 2010) a 37 °C por 24 horas. Após o período de incubação ajustou-se a densidade celular a $1,5 \times 10^8$ UFC mL^{-1} . Uma alíquota de 200 μL de cada suspensão celular foi adicionada a cada poço da placa. Os poços de controle negativo contendo apenas caldo BHI foram incluídos. A placa foi incubada estaticamente a 37

°C durante 24 horas, sob condições aeróbicas estaticamente. Após o período de incubação o meio foi aspirado e as células não aderentes foram cuidadosamente removido por 3 processos de lavagem com água destilada estéril. Adicionou-se 200 µL da substância F3d diluída em BHI na concentração que variou de 250 a 1,9 µg mL⁻¹, em seguida a placa foi incubada a 37 °C por 24 horas. O método de XTT foi realizado em microplacas de 96 poços, uma alíquota de 200 µL de XTT-menadiona [0,5 µg mL⁻¹ de XTT, 1 mM de menadiona (Sigma Chemical Co., EUA)] foi adicionada a cada poço, e as placas foram incubadas no escuro a 37 °C durante 90 minutos, a densidade óptica foi medida a 490 nm com um leitor de placas de microtitulação (Synergy™ HT, Biotek®). Foi considerado controle positivo uma suspensão de células sem substância F3d. Todos os testes foram realizados em triplicata, com três repetições.

Microscopia de fluorescência para análise da viabilidade do biofilme foi realizada em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares. O inóculo e o preparo do biofilme seguiram os métodos da técnica XTT. Uma alíquota da substância F3d na concentração de 250 µg mL⁻¹ foi adicionada em duplicata ao biofilme formado e tratado. Os procedimentos utilizados para a coloração das lamínulas por fluorescência foram seguidos de acordo com as recomendações do fabricante (Molecular Probes, Invitrogen).

A atividade antibiótica da substância F3d e a viabilidade celular do biofilme foi analisada através do método de XTT (2,3- Bis- (2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide) e de microscopia por fluorescência utilizando o Kit LIVE/DEAD® BacLight (Molecular Probes, Invitrogen), conforme recomendações do fabricante.

2.6 Atividade da substância F3d sobre a formação do biofilme de *E. faecium*

Os isolados de VREfm da (Tabela 2) e *E. faecium* ATCC 6569 foram cultivados em caldo BHI a 37 °C por 24 horas. Após o período de incubação, ajustou-se a densidade celular a 1,5 x 10⁸ UFC mL⁻¹ em PBS (*phosphate buffered saline*). Uma alíquota de 200 µL de cada suspensão celular foi adicionada a cada poço da placa. Os poços de controle negativo contendo apenas PBS foram incluídos. A placa foi incubada a 37 °C durante 90 minutos a 75 rpm. Após o período de incubação o cultivo foi aspirado e adicionou-se 200 µL da substância F3d diluída em BHI nas concentrações de 15,6 µg mL⁻¹ e 7,8 µg mL⁻¹, partindo do resultado da Concentração Inibitória Mínima de 15,6 µg mL⁻¹, em seguida a placa foi incubada a 37 °C por 24 horas. O método de XTT foi realizado em microplacas de 96 poços, uma alíquota de 200 µL de XTT-menadiona [0,5 µg mL⁻¹ de XTT, 1 mM de menadiona (Sigma Chemical Co., EUA)]

foi adicionada a cada poço, e as placas foram incubadas no escuro a 37 °C durante 90 minutos, a densidade óptica foi medida a 490 nm com um leitor de placas de microtitulação (Synergy™ HT, Biotek®). Foi considerado controle positivo uma suspensão de células sem substância F3d. Todos os testes foram realizados em triplicata, com três repetições.

2.7 Atividade da substância F3d sobre a adesão de E. faecium em superfície de poliestireno

Os isolados de VREfm da (Tabela 2) e *E. faecium* ATCC 6569 foram cultivados em caldo BHI a 37 °C por 24 horas, após o período de incubação ajustou-se a densidade celular a $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ e adicionou-se 20 µL do cultivo e 180 µL da substância F3d diluída em BHI nas concentrações de 15,6 µg mL⁻¹ e 7,8 µg mL⁻¹, em seguida a placa foi incubada a 37 °C por 90 minutos. O método de XTT foi realizado em microplacas de 96 poços, uma alíquota de 200 µL de XTT-menadiona [0,5 µg mL⁻¹ de XTT, 1 mM de menadiona (Sigma Chemical Co., EUA)] foi adicionada a cada poço, e as placas foram incubadas no escuro a 37°C durante 90 minutos, a densidade óptica foi medida a 490 nm com um leitor de placas de microtitulação (Synergy™ HT, Biotek®). Foi considerado controle positivo uma suspensão de células sem substância F3d. Todos os testes foram realizados em triplicata, com três repetições.

2.8 Curva de tempo de morte do E. faecium tratados com F3d

Suspensões celulares de VREfm cepa 170 e ATCC 6569, foram cultivadas em BHI por 24 horas a 37° C em agitação constante a 200 rpm. Em seguida o inóculo foi ajustado a 0,5 MacFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹) em 10 mL caldo BHI. Cada cultura celular dos isolados recebeu o composto F3d na concentração de 15,6 µg mL⁻¹, e o outro apenas solvente DMSO (0,5%) como controle. As culturas bacterianas foram incubadas a 37 °C com agitação constante a 200 rpm. Em tempos diferentes (0, 1, 2 ,4 ,8 ,16 e 24 h) as alíquotas foram assepticamente transferidas e diluídas seriadamente em solução salina e semeado em meio Ágar Mueller – Hinton (Becton, Dickinson and Company, USA) incubados por 24 horas a 37° C para determinar a UFC de cada cultura. Alíquotas do cultivo de cada tempo foram analisadas por microscopia de fluorescência após coloração usando o Kit LIVE/DEAD® BacLight (Molecular Probes, Invitrogen), conforme recomendações do fabricante.

2.9 Análise estatística

Os resultados foram avaliados por ANOVA de uma via utilizando o software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). $p < 0,05$ foi considerado significativo.

3 RESULTADOS

3.1 Atividade antibiótica da F3d em células planctônicas de *E. faecium*

A atividade antibiótica da F3d em células planctônicas inibiu o crescimento de todas as amostras de VREfm com uma concentração inibitória mínima para amostra VREfm15 de $31,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ e as demais amostras de VREfm obtiveram uma CIM de $15,6 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Na curva de morte dos isolados *E. faecium* ATCC 6569 e VREfm 170, (Figura 1 e 2) se observa uma redução significativa dentro de (2-8h) do número de células na concentração de $15,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ de F3d.

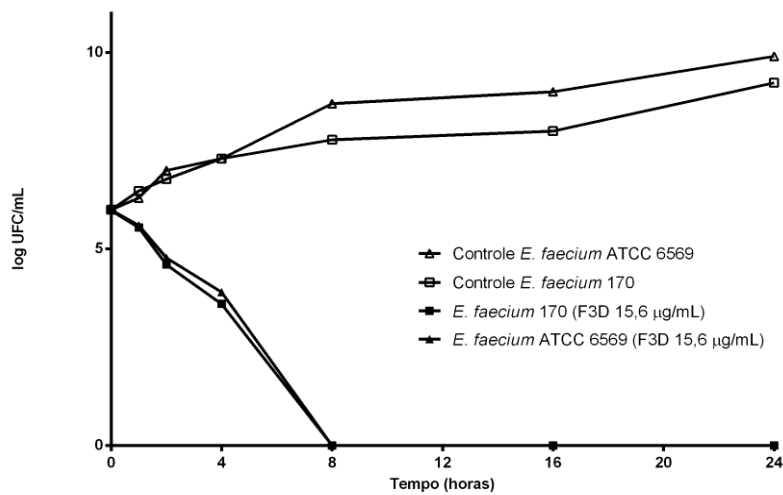


Figura 1: Curva de crescimento e tempo de morte de *E. faecium cepa* 170 e *E. faecium* ATCC 6569, exposta a fração F3d na concentração inibitória mínima de $15,6 \mu\text{g mL}^{-1}$.

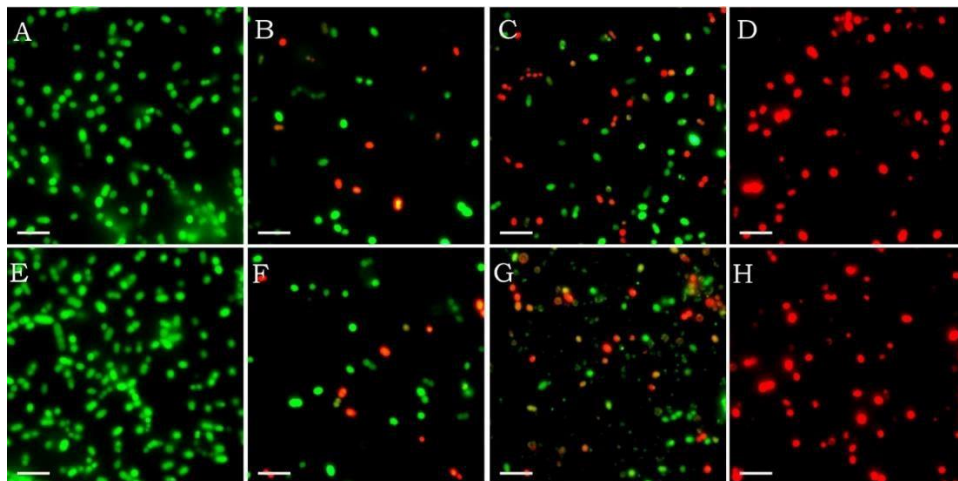


Figura 2: Microscopia de fluorescência: ensaio de viabilidade com o Kit LIVE/DEAD® BacLight dos isolados clínicos: *E. faecium* ATCC 6569 (A a D) e VREfm 170 (E e H). Tratamentos realizados nos tempos de 2 h (B e F); 4 h (C e G); 8 h (D e H); Controle (A e E). A viabilidade das células foi determinada com a coloração de LIVE/DEAD® BacLight, onde as células com membranas integras apresentam coloração verde-fluorescente enquanto que as células tratadas com F3d na concentração inibitória mínima de $15,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ apresentam membranas danificadas na coloração vermelho-fluorescente. Barra = $1\mu\text{m}$.

Houve uma importante redução de 70% de inibição da adesão das amostras de VREfm em superfície de poliestireno na presença da F3d nas concentrações de $15,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $7,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 3).

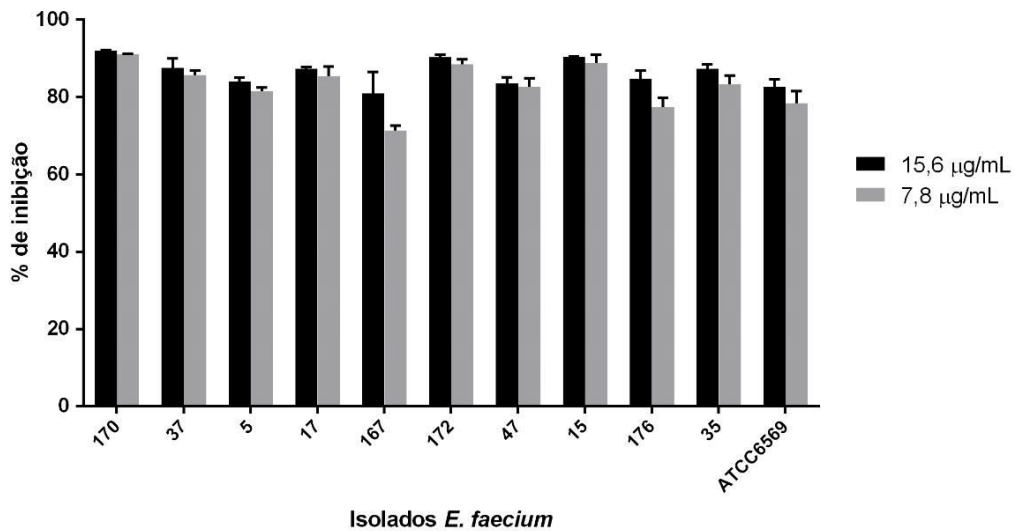


Figura 3: Inibição da adesão das amostras de VREfm em superfície de poliestireno, na presença da F3d nas concentrações $15,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $7,8 \mu\text{g mL}^{-1}$, pelo método XTT.

3.2 Atividade antibiótica da F3d na formação e biofilme formado de *E. faecium*

A avaliação da F3d sobre a formação do biofilme apresenta uma redução de 80% de células viáveis dos isolados VREfm (Figura 4).

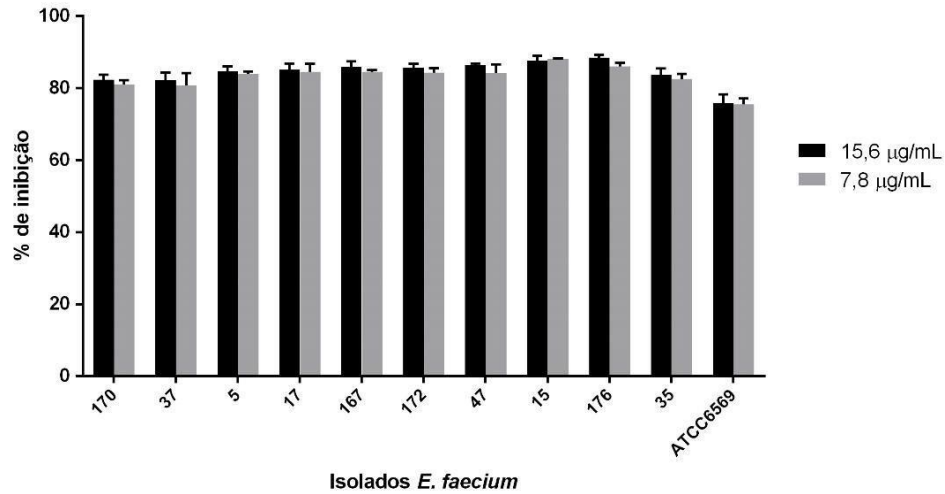


Figura 4: Atividade antibiótica da F3d sobre a formação do biofilme pelo método de XTT nas concentrações 15,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 7,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos isolados de VREfm e *E. faecium* ATCC 6569.

Em relação à avaliação da atividade da F3d sobre o biofilme formado dos isolados de VREfm e *E. faecium* ATCC 6569, houve uma redução de acima de 50% do biofilme na concentração de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 5) e significativa redução da viabilidade celular (Figura 6).

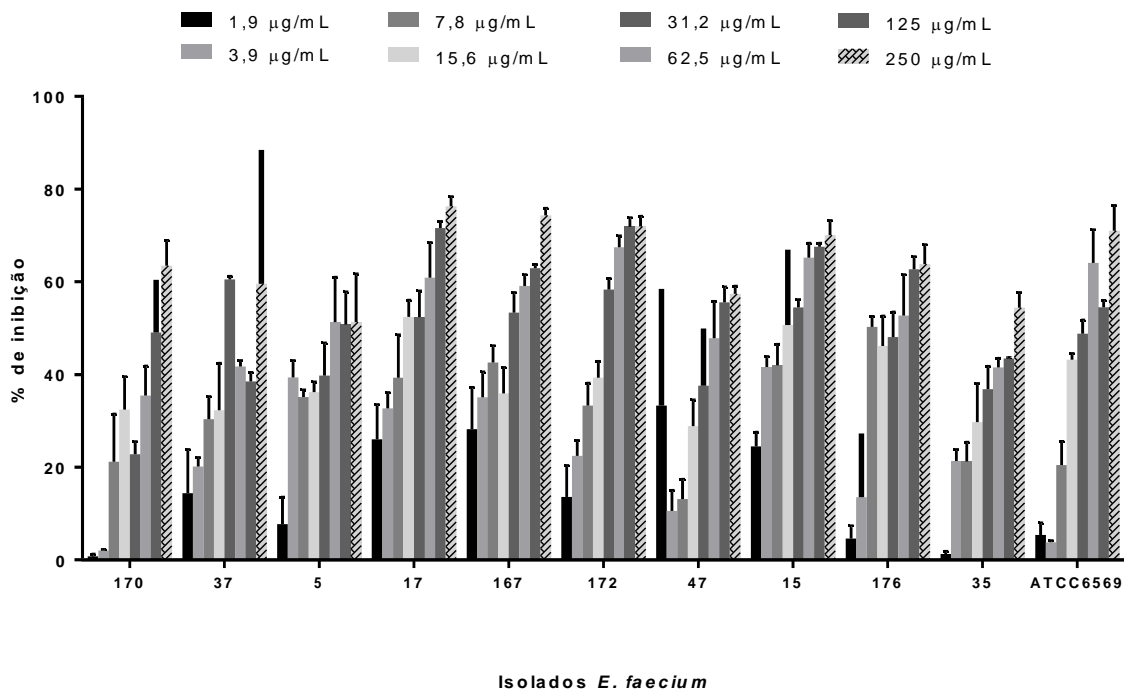


Figura 5: Atividade antibiótica da F3d nas concentrações de (250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 1,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$) sobre biofilme formado, avaliado pelo método de XTT dos isolados de VREfm e *E. faecium* ATCC 6569.

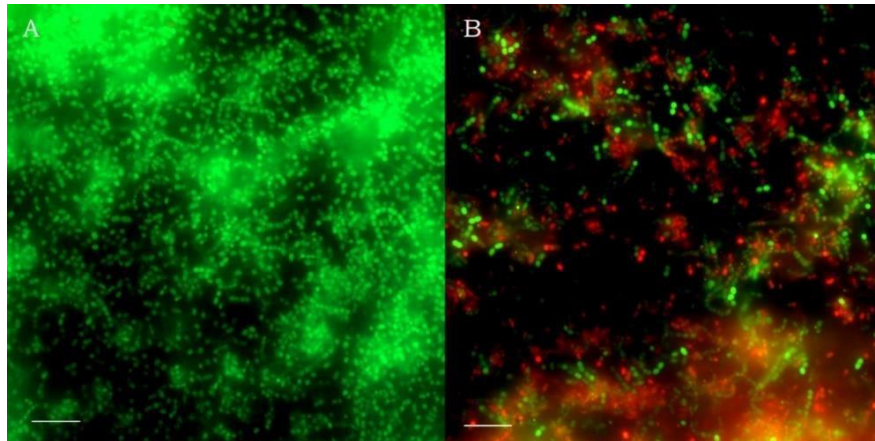


Figura 6: Microscopia de fluorescência: ensaio de viabilidade com o Kit LIVE/DEAD® BacLight sobre biofilme de VREfm 170 na presença da F3d. (A) Controle e (B) Biofilme tratado com $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ de F3d (8h). Barra = $2 \mu\text{m}$.

Os resultados do ensaio de citotoxicidade demonstraram que F3d mesmo com a concentração testada mais elevada ($2000 \mu\text{g mL}^{-1}$), 84% das células eram viáveis de acordo com o ensaio MTT.

4 DISCUSSÃO

Este estudo mostra a atividade antibiótica da F3d sobre células planctônicas e controle do biofilme de VREfm. As amostras utilizadas neste estudo apresentam múltipla resistência a antimicrobianos utilizados na clínica e genes de virulência associados a adesão. (Tabela 2). Foram isolados de infecção e colonização de pacientes do Hospital Universitário de Londrina, Paraná, Brasil. Estes isolados de VREfm, apresentaram pelo menos um marcador de virulência e fenótipo para a formação de biofilme em poliestireno. (RUZON, *et al.*, 2010).

A F3d inibiu o crescimento de todas as amostras de VREfm com uma concentração inibitória mínima para amostra VREfm 15, de $31,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ e as demais amostras de VREfm obtiveram uma CIM de $15,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 3). Oliveira *et al.* (2011) relata que a F3d é efetiva contra a *Xanthomonas citri* pv. Citri, agente causal do cancro cítrico, apresentando um CIM de $6,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ de F3d.

Na curva de morte dos isolados VREfm 170 e *E. faecium* ATCC 6569 se observa uma redução significativa do número de células viáveis na concentração de $15,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ de F3d (Figura 1 e 2).

Cardozo *et al.* (2013) também mostrou que, a atividade antibiótica da F3d contra *Staphylococcus aureus* MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*), apresentou CIM de 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e redução das UFCs a partir das primeiras 2 horas, matando na concentração de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de F3d.

Na curva de morte dos isolados VREfm 170 e *E. faecium* ATCC 6569 se observa uma redução significativa do número de células viáveis na concentração de 15,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de F3d (Figura 1 e 2).

Ruzon *et al.* (2010) observou uma correlação significativa entre a adesão celular e formação de biofilme. No teste realizado para avaliar a atividade da F3d na adesão de VREfm em superfície de poliestireno, houve uma importante redução, de 70% de inibição da adesão das amostras na presença da F3d nas concentrações de 15,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 7,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 3).

Fonseca, (2011) e Percival e Cutting, (2009) descreve alguns agentes antibiofilmes como a lactoferrina, uma proteína presente nos fluídos gengivais e na saliva, que tem propriedades de ligação do ferro, bloqueando a fixação de bactérias planctônicas a uma superfície e inibindo o primeiro passo na formação de biofilme, xylitol que interfere com a formação do biofilme e o mel que possui atividade antibacteriana.

E ainda, os resultados do ensaio de citotoxicidade demonstraram que, F3d mesmo com a concentração testada mais elevada (2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$), 84% das células eram viáveis de acordo com o ensaio MTT, não sendo citotóxica para as células LLC-MK₂, sugerindo baixa toxicidade para o hospedeiro (CARDOZO *et al.*, 2013).

Van Wamel *et al.* (2007) correlaciona em seu estudo, a expressão de *esp* em VREfm na adesão inicial e formação de biofilme na superfície de poliestireno.

Na avaliação da atividade da F3d sobre a formação de biofilme dos isolados de VREfm e *E. faecium* ATCC 6569, observou uma redução de 80% de células viáveis (Figura 4) e 50% em relação ao biofilme formado (Figura 5 e 6).

Oliveira, *et al.* (2016) descreve a purificação, cristalização e caracterização dos dois principais compostos metabolitos foram isolados a partir da fracção F3D, e os cristais foram analisados depois de completa evaporação. O primeiro composto puro (F3d.3.4.2) mostrou um único pico em UV de absorção de 271 nm e alta atividade antibiótica. F3d.3.4.2 apresentou baixa qualidade e a estrutura molecular ainda não foi completamente determinada. Na base dos dados espectrais, o composto bioativo foi determinada como sendo um composto antibiótico organocobre natural (OAC). O segundo (F3d.3.4.4) apresentou alta qualidade com finos cristais amarelos, a fenazina-1-carboxamida, com a fórmula molecular C₁₃H₉N₃O.

Nesse sentido, uma variedade de evidências suporta a aplicação da F3d na área de saúde humana.

5 CONCLUSÃO

A resistência aos antibióticos tornou-se um grande problema de saúde pública e clínica que afeta uma grande porcentagem da população. Enterococos são uma das principais causas de infecções relacionadas à assistência à saúde, apresentando resistência a uma vasta gama de antibióticos. É fundamental para as pesquisas acadêmicas incentivos econômicos na área de pesquisa de produtos naturais.

Neste intuito, este estudo avaliou a atividade antibiótica da substância F3d obtida da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, cepa LV em células planctônicas e biofilme de VREfm, indicando que este composto extracelular bacteriano pode ser uma das alternativas para controle de infecções bacterianas, para VREfm, não apresentando efeito citotóxico.

REFERÊNCIAS

CARDOZO, V.F. et.al. Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strains against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, p. 12, 2013.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), “Clinical and Laboratory Standards Institute: performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twentieth informational supplement”, Document M100-S22, **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA, USA, 2012.

CERI, H. *et al.* The Calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.1771-1776, 1999.

CETINKAYA, Y.; FALK, P.; MAYHALL, C.G. Vancomycin-resistant enterococci. **Clin Microbiol Rev**, v.13, p. 686-707, 2000.

DAUTLE, M.O; URICH, R.L and HUGHES, T.A. typing and subtyping of 83 clinical isolates purified from surgically implanted silicon feeding tubes by random amplified polymorphic DNA amplification. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, p.414-421, 2002.

DISTEL, J.W; HTTON, J.F; GILLESPIE, M.J. Biofilm formation in medicated root canals. **J. Endod.**, v.28, p. 689-693, 2002.

DONLAN, R.M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerg. Infect. Dis.**, v.8, p.881-890, 2002.

FONSECA, A. P. Biofilms in wound: an unsolved problem? European wound management Association Journal, v. 11, n. 2, 2011.

LEE, D.K; KIM, Y.; PARK, K.S.; YANG, J.W.; KIM, K.; HA NJ Antimicrobial activity of mupirocin, daptomycin, linezolid, quinupristin/dalfopristin and tigecycline against

vancomycin-resistant enterococci (VRE) from clinical isolates in Korea (1998 and 2005). **J Biochem Mol Biol**, v.40 (6), p. 881-887, 2007.

LEUNG, J.W.; LIU, Y.L.; DESTA, T.D.; LIBBY, E.D.; INCIARDI, J.F., and LAM, K. In vitro evaluation of antibiotic prophylaxis in the prevention of biliary stent blockage. **Gastrointest. Endosc.**, v.51, p. 296-303, 2000.

LEWIS, K. Riddle of biofilm resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v45, n.4, p.999-1007, 2001.

GOMES, L.V.P. *Enterococcus faecium* resistentes a Vancomicina isolados no Hospital Universitário de Londrina-PR: perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, virulência e genotipagem. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Universidade estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, 2013.

MOHAMED, J.A.; HUANG, W.; NALLAPAREDDY, S.R.; TENG, F. and MURRAY, B.E. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. **Infect. Immun.**, v. 72, p.3658-3663, 2004.

MOSSIALOS, E. *et al.* Policies and incentives for promoting innovation in antibiotic research. **European Observatory on Health Systems and Policies**, 2010. Disponível em <<http://www.euro.who.int>>, acesso em 17 de fevereiro de 2015.

MURRAY, B.E. Vancomycin-resistant enterococcal infections. **N. Engl. J. Med.**, v. 342, p. 710-721, 2000.

OLIVEIRA, A.G.; MURATE, L.S.; SPAGO, F.R.; LOPES, L.P.; BERANGER, J.P.O.; SAN MARTIN, J.A.B.; NOGUEIRA, M.A.; MELLO, J.C.P.; ANDRADE, C.G.T.J.; ANDRADE, G. Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain. **Biological Control**, v. 56, p. 125–131, 2011.

OLIVEIRA JUNIOR, Admilton Gonçalves de. **Produção e purificação de metabólitos secundários com atividade produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* cepa LV contra**

bactérias Gram negativas: agente causal do cancro cítrico (*Xanthomonas citri* pv. *citri*) e isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase. 2011. 110f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

OLIVEIRA, *et al.* Bioactive organocopper compound from *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the growth of *Xanthomonas citri* subsp. *Citri*. **Front Microbiol.** 10.3389/fmicb.2016.00113.

PATENTE (2008). Processo de produção, purificação e obtenção de substâncias com atividades antibióticas para o controle de doenças causadas por bactérias em plantas, #PI0803350-1 A2; setembro de 2008, <http://www.inpi.gov.br>.

PERCIVAL, S.L.; CUTTING, K.F. Biofilms: possible strategies for suppression in chronic wounds. **Nursing Standart**, v. 23, p. 32, 2009.

RAMPAZO, L.G.L., 2004. **Avaliação de agentes biológicos e seus produtos na incidência de lesões foliares do cancro cítrico.** Dissertação MS. Universidade Estadual de Londrina. Londrina PR.

RUZON, F.I. *et al.* Virulence Determinants in Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* *vanA* Isolated from Different Sources at University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil. **The Journal of Microbiological**, v.48, p. 814-821, 2010.

SABBUBA, N.G.; HUGES, G. and STICKLER, D.J. The migration of *Proteus mirabilis* and other urinary tract pathogens over Foley catheters. **BJU Int.**, v.89, p.55-60, 2002.

SIEVERT, D.M; RICKS, P.; EDWARDS, JR.; SCHNEIDER, A.; PATEL, J.; SRINIVASEN, A.; KALLEN, A.; LIMBAGO, B.; FRIDKUN, S. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: Summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centres for Disease Control and Prevention, 2009-2010, **Infect Control Hosp. Epidemiol**, v.34(1), p.1-14, 2013.

SCHIERHOLZ, J.M. *et al.* antimicrobial substances and effects on sessile bacteria. **Zentrable Bakteriolog Mikrobiol HYG**, v.289, p.165-177, 1999.

TACCONELLI, E.; CATALDO, M.A. Vancomycin-resistant enterococci (VRE): transmission and control. **Int J Antimicrob Agents**, v.31; p. 99-106, 2008.

TOLEDO-ARANA, A.J.; VALLE, C.; SOLANO *et al.* The enterococcal surface protein Esp is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.67, p.4538-4545, 2001.

VAN WAMEL, W.J. *et al.* Growth condition-dependent Esp expression by *Enterococcus faecium* affects initial adherence and biofilm formation. **Infect. Immun.**, v.75, p.924-931, 2007.

ZEGANS, M.E.; BECKER, H.I.; BUDZIK, J. and TOOLE, G.O. The role of bacterial biofilms in ocular infections. **DNA Cell Biol.**, v.21, p. 415-420, 2002.