

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL**

UDSON MIKALOUSKI

**POTENCIAL CITOTÓXICO E VIRULÊNCIA DE *Enterococcus* sp.
ISOLADOS DE AMBIENTE AQUÁTICO.**

Londrina, 2017

UDSON MIKALOUSKI

**POTENCIAL CITOTÓXICO E VIRULÊNCIA DE *Enterococcus* sp.
ISOLADOS DE AMBIENTE AQUÁTICO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental.

Orientadora: Prof^a Dr^a Luciana Furlaneto-Maia

Coorientadora: Prof^a Dr^a Marcia Cristina Furlaneto

Londrina, 2017

TERMO DE LICENCIAMENTO

Esta Dissertação está licenciada sob uma Licença Creative Commons *atribuição uso não-comercial/compartilhamento sob a mesma licença 4.0 Brasil*. Para ver uma cópia desta licença, visite o endereço <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/> ou envie uma carta para Creative Commons, 171 Second Street, Suite 300, San Francisco, Califórnia 94105, USA.



Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Biblioteca UTFPR - Câmpus Londrina

M634p Mikalouski, Udson
Potencial citotóxico e virulência de *Enterococcus* sp. isolados de ambiente aquático / Udson Mikalouski - Londrina: [s.n.], 2017.
38 f. ; il. ; 30 cm

Orientador: Prof.^ª Dr.^ª Luciana Furlaneto-Maia
Coorientadora: Prof.^ª Dr.^ª Marcia Cristina Furlaneto
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. Londrina, 2017.
Bibliografia: f. 35-38

1. Enterococcus. 2. Antibióticos. 3. Água - Microbiologia, I. Furlaneto-Maia, Luciana, orient. II. Furlaneto, Marcia Cristina, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. IV. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. V. Título.

CDD: 628



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Pró-reitora de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental
Campus Apucarana/Londrina



TERMO DE APROVAÇÃO

POTENCIAL CITOTÓXICO E VIRULÊNCIA DE *Enterococcus* sp. ISOLADOS DE AMBIENTE AQUÁTICO.

por

Udson Mikalouski

Dissertação de mestrado apresentada no dia 02 de março de 2017 como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA AMBIENTAL pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Campus Apucarana/Londrina, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. O Candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho **APROVADO**. (Aprovado ou Reprovado)

Prof.^a Dr.^a Luciana Furlaneto-Maia - Orientadora
(Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Londrina)

Prof.^a Dr.^a Marcia Cristina Furlaneto - Coorientadora
(Universidade Estadual de Londrina - UEL)

Prof. Dr Fernando Barcellos
(Universidade Estadual de Londrina - UEL)

Prof. Dr Alessandro Martins
(Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Apucarana)

Prof. Dr Edson Fontes de Oliveira
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental

“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa de Mestrado em Engenharia Ambiental”.

Dedico este trabalho ao meu filho, Arthur, e a
minha esposa, Flavianny.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por tudo em minha vida.

A minha esposa, Flavianny, por me apoiar e incentivar em todos os momentos e pela compreensão.

A Professora Dr^a Luciana Furlaneto-Maia, pela orientação, paciência e sabedoria ao me ensinar. A disponibilidade para discutir vários assuntos pertinentes a pesquisa.

A Dr^a Alane, que contribuiu grandemente na execução dos experimentos, com as correções do trabalho escrito, e pela amizade.

A todos os companheiros do grupo de pesquisa do Laboratório de Microbiologia Básica e Aplicada (LAMBA) da UTFPR de Londrina. Também aos colegas do laboratório de Microbiologia da UEL, sob supervisão da professora Dr^a Marcia Furlaneto.

A todos os professores do programa de pós-graduação, e todos aqueles que contribuíram ao longo da minha formação acadêmica.

A colegas e amigos do curso de Mestrado em Engenharia Ambiental.

A CAPES, pelo apoio financeiro da pesquisa.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitros
Abs	Absorbância
ace	Gene que codifica adesina de colágeno de <i>Enterococcus</i> .
agg	Gene que codifica a produção de substância de agregação
AMC	Amoxicilina
AMP	Ampicilina
asa1	Gene que codifica substância de agregação
ATCC	American Type Culture Collection (Coleção americana da cultura do tipo)
BHI	Brain heart infusion (Infusão de células de coração e cérebro)
BIF	Bactérias indicadoras de contaminação fecal
CFS	Sobrenadante livre de célula
CIP	Ciprofloxacina
Clas	Classificação
CLO	Cloranfenicol
CLSI	Clinical Laboratory Standards International
cpd	Gene que codifica feromônio sexual
cut-off	Valor de corte
cylA	Gene que codifica secreção de bacteriocina ativadora de citolisina
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
dNTP	Bases nitrogenadas

DO	Densidade óptica
ERI	Eritromicina
VER	Enterococcus resistente à vancomicina
esp	Gene que codifica proteínas de superfície de <i>Enterococcus</i> .
geIE	Gene que codifica a produção de gelatinase
GEN	Gentamicina
h	Hora
HeLa	Célula de câncer de cervical (útero).
Hly	Gene relacionado com a produção de hemolisina
LB	Luria Bertani
LDH	Lactato desidrogenase
m/v	Massa por volume
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimol
NAL	Ácido nalidíxico
ng	Nanograma
nm	Nanometros
NOR	Norfloxacina
NOR	Norfloxacina
PAI	Ilha de patogenicidade
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeira da Polimerase)

pmol	Picomol
PZ	Razão do halo da colônia sobre halo da colônia mais (+) halo de inibição
rpm	Rotação por minute
sprE	Gene que codifica serina endopeptidase
TEC	Teicoplanina
TET	Tetraciclina
UFC	Unidade formadora de colônia
v/v	Volume por volume
VAN	Vancomicina
vanA	Gene que codifica resistência à vancomicina
vanB	Gene que codifica resistência à vancomicina

Resumo

MIKALOUSKI, Udson. **Potencial citotóxico e virulência de *Enterococcus* sp. isolados de ambiente aquático.** 2017. 38 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2017.

Enterococcus spp. pertencem ao grupo das bactérias lácticas e estão presentes em solos, águas, plantas, microbiota autóctone de vários alimentos e como membros da microbiota intestinal de humanos e animais. Esses microrganismos foram considerados por muito tempo como comensais, mas o aumento da severidade das infecções nosocomiais causadas por enterococos multirresistentes a antimicrobianos e, a falta de conhecimento sobre seus fatores de virulência geram insegurança para saúde pública. Nosso estudo objetivou avaliar a capacidade citotóxica, resistência e virulência de *Enterococcus* sp. provenientes de ambientes aquáticos. Foram analisados a presença de genes de resistência à vancomicina (*vanA* e *vanB*) e de virulência como produção de gelatinase (*gelE*), adesina de colágeno de *Enterococcus* (*ace*), bacteriocinas ativadoras de citolisina (*cylA*), serina endopeptidase (*sprE*), ilha de patogenicidade (*PAI*), substância de agregação (*asa1*), feromônio sexual (*cpd*), substância de agregação (*agg*) e teste fenotípicos de resistência a antibióticos, citotoxicidade em células HeLa e formação de biofilme. Todos os isolados apresentaram capacidade de formar biofilme e potencial citotóxico com intensidades distintas, e 66,66% dos isolados apresentaram resistência à vancomicina e 58% à ampicilina. Um isolado de *E. casseliflavus* apresentou resistência a todos os antibióticos testados, além de capacidade de formar biofilme e apresentar potencial citotóxico. As espécies de *Enterococcus* sp. analisadas apresentaram características independentes, o que reforça a importância dos estudos nos mais variados ambientes.

Palavras-chave: *E. casseliflavus*, *E. mundtii*, células HeLa, genótipo, fenótipo, ambiental.

Abstract

MIKALOUSKI, Udson. **Cytotoxic potential and virulence of *Enterococcus* sp. isolated from aquatic environment.** 2017. 38 p. Master in Environmental Engineering - Graduate Program in Environmental Engineering, Federal Technological University of Paraná. Londrina, 2017.

Enterococcus spp. belong to the group of lactic bacteria and are present in soils, waters, plants, autochthonous microbiota of various foods and as members of the intestinal microbiota of animals and animals. These microorganisms have been observed as commensals for a long time, but the increased of severity nosocomial infections caused by multi-resistant antimicrobial enterococci and a lack of knowledge about their virulence factors generate insecurity for public health. Our study aimed to evaluate the cytotoxic capacity, resistance and virulence of *Enterococcus* sp. that comes from aquatic environments. It was studied resistance genes to AVancomycin (vanA and vanB) and virulence as gelatine production (gelE), collagen adhesin of *Enterococcus* (ace), bacteriocins cytolysin-activating (cylA), endopeptidase serine (sprE), and pathogenicity islands (PAI), aggregation substance (asa1), sexual pheromone (cpd), agglutination substance (agg) and phenotypic test of resistance to antibiotics, cytotoxicity in HeLa cells and biofilm formation. All the isolates presented biofilm capacity and cytotoxic potential with different intensities, and 66.66% of the isolates presented resistance to vancomycin and 58% to ampicillin. An *E. casseliflavus* isolate shows resistance to all antibiotics tested, as well as biofilm formation and cytotoxic potential. The species of *Enterococcus* sp. analyzed presented independent characteristics, which reinforce the importance of studies in the most varied environments.

Keywords: *E. casseliflavus*, *E. mundtii*, HeLa cells, genotype, phenotype, environmental.

SUMÁRIO

1	Introdução	11
1.1	Referencial Teórico	12
2	Referências Bibliográficas	16
3	Capítulo 1 - Artigo	20
3.1	INTRODUÇÃO	20
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	21
	Extração de DNA.....	21
	Detecção fenotípica dos fatores de virulência	23
	Teste de sensibilidade a antimicrobianos	24
	Detecção da atividade antagonista.....	24
	Citotoxicidade do Sobrenadante de Cultivo Livre de Células.....	25
	Quantificação da biomassa de biofilme.....	25
3.3	RESULTADOS	27
3.4	DISCUSSÃO	31
3.5	CONCLUSÃO	34
3.6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Enterococcus* compreende um grupo bastante complexo e importante de microrganismos, principalmente no que se refere ao seu relacionamento com os seres humanos. Estas bactérias constituem uma grande proporção das bactérias naturais da microbiota do trato gastrointestinal da maioria dos mamíferos, aves, répteis e insetos. São considerados microrganismos ubíquos, podendo ser encontrados amplamente distribuídos no meio ambiente, alimentos, plantas, solos e água.

Enterococcus spp. são bactérias Gram-positivos, anaeróbios facultativos e catalase negativos, que toleram uma grande variedade de condições de crescimento, como meios hiper ou hipotônicos, ambientes alcalinos e ácidos e fermentam a lactose produzindo ácido lático. Inicialmente eram descritos como microrganismos comensais, porém emergiram como potenciais patógenos, sendo responsáveis por diversas infecções nosocomiais, incluindo endocardite, infecções do trato urinário, infecções de feridas cirúrgicas, meningites e bacteremia.

A característica do gênero *Enterococcus* para torná-lo importante patógeno humano está em sua capacidade de resistir aos antimicrobianos como vancomicina, possuir determinantes de virulência, formação de biofilme e capacidade de danificar células de mamíferos. Assim, o estudo desses microrganismos é de grande importância para saúde humana, animal e para o meio ambiente.

As espécies mais bem estudadas são *E. faecium* e *E. faecalis*, porém outras espécies têm emergido como sendo relevantes em relação a saúde pública, principalmente em relação às resistências intrínsecas aos antimicrobianos.

Portanto, este trabalho objetivou avaliar a resistência à antibióticos, potencial de virulência e citotóxico de isolados de *Enterococcus* sp. provenientes de ambiente aquático.

1.1 Referencial Teórico

A água está presente em quase todo o globo terrestre, e é fundamental a todas as formas de vida e para o meio ambiente. A conservação, a qualidade e a saúde deste e de outros recursos é defendido pelo *One Health* (ZINSSTAG et al., 2015). O conceito de *One Health* trata de forma integrada a saúde humana, meio ambiente, saúde animal e políticas públicas, sendo todos responsáveis pela prevenção de doenças (ZINSSTAG et al., 2015).

Doenças de veiculação hídrica.

Dentre o meio ambiente, a água é de extrema importância no conceito *One Health*. Parte da água doce existente está poluída por diversas fontes, podendo ser químicas, físicas e biológicas (NAZEER; ALI; MALIK, 2016). A disposição de dejetos de origem humana em corpos d'água resulta em grave problema sanitário. A qualidade microbiológica da água é tão importante quanto a qualidade química, devida à transmissão de diversas doenças (VESILIND; MORGAN, 2013). Embora várias doenças infecciosas possam ser controladas atualmente, os microrganismos ainda podem ser uma grande ameaça à vida, mesmo em países desenvolvidos (MADIGAN et al., 2016). E a grande maioria das doenças infecciosas emergentes nas últimas décadas são de origem zoonóticas, incluindo animais silvestres (WORMSER; ASHOUR, 2014).

Muitas das doenças bacterianas são disseminadas por meio de veiculação hídrica, como *Campylobacter* (ESTEVES; FERREIRA; SICILIANO, 2011), *Leptospira* (RODRIGUES, 2015) *Mycobacterium* spp., *Streptococcus iniae*, *Clostridium botulinum*, *Vibrio vulnificus* (GAUTHIER, 2015), *E. coli* (STALEY et al., 2012), *Enterococcus* sp. (MOORE et al., 2010), a maioria destas podem ser originadas de seres humanos ou em animais. Ainda, o agravamento no uso de antibióticos na prática veterinária, aumentou a resistência em bactérias zoonóticas patogênicas e na flora fecal, como as bactérias do gênero *Enterococcus* (CANTAS; SUER, 2014).

Muitos patógenos zoonóticos endêmicos e emergentes, possuem a capacidade de penetrar em corpos d'água através de águas pluviais e de escoamento agrícola, assim como através do transporte subterrâneo (STALEY et al., 2012). Dentre estes, as bactérias indicadoras de contaminação fecal (BIF), tem sido apoiada por estudos epidemiológicos para prever riscos à saúde humana. *Enterococcus* vem sendo utilizado como indicador de contaminação fecal, ainda que encontrado na natureza em um número pouco expressivo (BOEHM; SASSOUBRE, 2014). Quando alterado, o recurso hídrico, um número elevado de *Enterococcus* pode ser

encontrado, e é considerado um bioindicador de qualidade seguro para água, pois a sua população diminui mais uniformemente do que as de coliformes tanto em água doce, quanto em água marinha (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

***Enterococcus* no ambiente.**

A maioria das pesquisas sobre *Enterococcus* tem sido em relação à infecção humana, e há pouco conhecimento de sua disseminação na natureza (VAN TYNE; GILMORE, 2014). O gênero *Enterococcus* evoluiu ao longo do tempo em associações com eucariontes (GILMORE et al., 2014; VAN TYNE; GILMORE, 2014), e atualmente são encontrados naturalmente em produtos alimentícios, comensais intestinais de humanos e animais saudáveis (ARAUJO et al., 2015; SHARIFI-RAD et al., 2016; VAN HAL et al., 2016), em plantas (SEDLÁČEK et al., 2013), no solo e na água (HAMMAD; SHIMAMOTO; SHIMAMOTO, 2014), sendo considerados como microrganismos onipresentes (SANTIAGO-RODRIGUEZ et al., 2013).

A identificação da espécie pode contribuir para determinar a origem da contaminação fecal, pois a diversidade de espécies de enterococos está relacionada aos ambientes onde estas podem ser encontradas; a tabela 1 mostra alguns exemplos de nichos ecológicos dos quais já foram isoladas diferentes espécies do gênero enterococos.

Tabela 1– Espécies de *Enterococcus* e seus habitats conhecidos

Grupo	Espécie	Habitat (s) conhecido	Referência
<i>E.faecalis</i>	<i>E.faecalis</i>	Humano, animal (diversos), planta, inseto	SCHLEIFER, et al (1984); LAYTON, et al (2010)
<i>E.faecium</i>	<i>E.faecium</i>	Humano, animal (diversos), planta, inseto	SCHLEIFER, et al (1984); KLEIN, (2003)
	<i>E.durans</i>	Humano, animal (diversos), inseto	COLLINS, et al (1984)
	<i>E.hirae</i>	Animal (diversos), planta	FARROW; COLLINS (1985)
	<i>E.munditi</i>	Solo, planta	COLLINS, et al (1986)
<i>E.gallinarum</i>	<i>E.gallinarum</i>	Humano, animal (diversos), inseto	COLLINS, et al (1984)
	<i>E.casseliflavus</i>	Planta, solo, humano, animal (diversos)	COLLINS, et al (1984)
<i>E.avium</i>	<i>E.avium</i>	Humano, animal (diversos)	COLLINS, et al (1984); GHOSH, et al (2012).
<i>E.cecorum</i>	<i>E.cecorum</i>	Animal (galinhas)	DEVRIESE, et al (1983); WILLIAMS, et al (1989)
	<i>E.columbae</i>	Animal (pombo)	DEVRIESE, et al (1990).
Desagrupados	<i>E.italicus</i>	Animal (gado)	FORTINA, et al (2004).
	<i>E.seriolicida</i>	Animal (peixes infectados)	KUSUDA, et al (1991).

Características gerais dos *Enterococcus*.

Sua ampla distribuição se deve a sua capacidade de suportar grandes variações de pH e temperatura, além de condições hipotônicas e hipertônicas (GILMORE et al., 2014), e resistir a alguns detergentes (PADILLA; LOBOS, 2013). São microrganismos Gram negativos, anaeróbios facultativos e catalase negativos. Possui um grande número de espécies.

São conhecidas cerca de 54 espécies de enterococos, e 2 subespécies citadas em periódicos: *E. alcedinis*, *E. aquimarinus*, *E. asini*, *E. avium*, *E. caccae*, *E. camalliae*, *E. canintestini*, *E. canis*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. devriesei*, *E. diestrammenae*, *E. dispar*, *E. durans*, *E. eurekensis*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. flavescens*, *E. gallinarum*, *E. gilvus*, *E. haemoperoxidus*, *E. hermannienseis*, *E. hiraе*, *E. italicus*, *E. lactis*, *E. lemanii*, *E. malodoratus*, *E. moraviensis*, *E. munditi*, *E. olivae*, *E. pallens*, *E. phoeniculicola*, *E. plantarum*, *E. porcinus*, *E. pseudoavium*, *E. quebecensis*, *E. raffinosus*, *E. ratti*, *E. rivorum*, *E. rotai*, *E. saccharolyticus*, *E. saccharolyticus* sub sp. *saccharolyticus*, *E. saccharolyticus* sub sp. *taiwanensis*, *E. saccharominimus*, *E. seriolicida*, *E. silesiacus*, *E. solitarius*, *E. sulfureus*, *E. termitis*, *E. thailandicus*, *E. ureasiticus*, *E. ureilyticus*, *E. viikkiensis*, *E. villorum*, *E. xiangfangensis* (EUZEBY, 1997).

As espécies *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* são mais conhecidas pela sua importância médica (VAN HAL et al., 2016; WANG et al., 2015). Isso se deve a sua difusão generalizada e alta capacidade de adquirir resistência aos antibióticos, principalmente à vancomicina, sendo chamados de *Enterococcus* sp. resistente à vancomicina ou ERV (TUHINA; ANUPURBA; KARUNA, 2016; VESILIND; MORGAN, 2013). ERVs devem ser considerados agentes patogênicos perigosos, pois podem acometer pessoas com o sistema imunológico comprometido (IWERIEBOR; OBI; OKOH, 2015). Estes estão entre os patógenos mais comuns encontrados em infecções nosocomiais (BRITT; POTTER, 2016), a maioria das infecções são endógenas, mas ocorrendo também infecção cruzada principalmente em ambientes hospitalares (PADILLA; LOBOS, 2013).

Fatores de virulência e resistência em *Enterococcus*.

As demais espécies de *Enterococcus*, estão sendo cada vez mais reconhecidas como uma causa de preocupação mundial (AYENI et al., 2016; TUHINA et al., 2016). Na última década esse gênero foi reportado como a terceira causa mais comum de bacteremia (PAOSINHO et al., 2016). As bactérias possuem muitos fatores de virulência, que estão

associados a genes específicos, os quais são de grande importância na patogênese e na ocorrência de doenças (MULIK; PATIL; KULKARNI, 2016).

Entre os fatores de virulência e respectivo gene já descritos para espécies do gênero *Enterococcus*, podemos citar a produção de hemolisina (*Hly*), a produção de gelatinase (*gelE*) e produção de substâncias de agregação (*agg*). Além desses fatores, podemos citar as proteínas de superfície de *Enterococcus* (*esp*), a secreção de bacteriocinas ativadoras de citolisina (*cylA*), substância de agregação (*asa1*) e adesina de colágeno de *Enterococcus* (*ace*), que parecem ser codificadas em uma grande ilha de patogenicidade (*PAI*) (AL-TALIB et al., 2015; FURUMURA et al., 2006; WOJNICZ et al., 2016). As diferentes espécies do gênero *Enterococcus* podem apresentar diferenças em relação à incidência de determinados fatores de virulência (NIU et al., 2016).

Outra característica importante deste gênero, corresponde a capacidade de sintetizar peptídeos antibacterianos heterogêneos, também chamados de enterocinas, o que pode lhes conferir uma persistência maior em ambientes colonizados por outros microrganismos concorrentes, afim de removê-los e assumir esses locais (PADILLA; LOBOS, 2013).

A capacidade de formar biofilme também é considerada um importante fator de virulência para *Enterococcus* spp. O biofilme é um ecossistema vivo composto de milhões de células bacterianas aderentes, embutidas dentro de uma matriz autoproduzida de substância polimérica extracelular de sacarídeos (MULIK et al., 2016).

Por possuírem um alto potencial de virulência, apresentando variações intra e interespecies desse potencial e estar entre as espécies microbianas patogênicas da atualidade, os estudos dos *Enterococcus* não pertencentes às espécies *E. faecium* e *E. faecalis* faz se necessário, principalmente os de veiculação hídrica, por apresentarem maior potencial de disseminação para a população de forma direta e indireta.

O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial de virulência, resistência à antibióticos e citotoxicidade de isolados de *Enterococcus* não pertencentes às espécies *E. faecium* e *E. faecalis* provenientes de ambiente aquático.

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-TALIB, H. et al. Genotypic variations of virulent genes in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from three hospitals in Malaysia. **Adv Clin Exp Med**, v. 24, n. 1, p. 121-7, Jan-Feb 2015.
- ARAUJO, C. et al. Evaluation of *Enterococcus* spp. from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum), feed, and rearing environment against fish pathogens. **Foodborne Pathog Disease**, v. 12, n. 4, p. 311-22, Apr 2015.
- AYENI, F. A. et al. Identification and prevalence of tetracycline resistance in enterococci isolated from poultry in Ilishan, Ogun State, Nigeria. **J Pharm Bioallied Sci**, v. 8, n. 1, p. 69-73, Jan-Mar 2016.
- BOEHM, A. B.; SASSOUBRE, L. M. **Enterococci as indicators of environmental fecal contamination. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N (eds) Enterococci, from commensals to leading causes of drug resistant infections [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.**
- BRITT, N. S.; POTTER, E. M. Clinical epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus* bloodstream infections. **J Glob Antimicrob Resist**, v. 5, p. 57-61, Jun 2016.
- CANTAS, L.; SUER, K. Review: The Important Bacterial Zoonoses in “One Health” Concept. **Frontiers in Public Health**, v. 2, n. 144, 2014-October-14 2014.
- COLLINS, M. et al. *Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov.; *E. casseliflavus* nom. rev., comb. nov.; *E. durans* nom. rev., comb. nov.; *E. gallinarum* comb. nov.; and *E. malodoratus* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 220-223, 1984.
- COLLINS, M. D.; FARROW, J. A.; JONES, D. *Enterococcus mundtii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 8-12, 1986.
- DEVRIESE, L. et al. *Enterococcus columbae*, a species from pigeon intestines. **FEMS microbiology letters**, v. 71, n. 3, p. 247-251, 1990.
- DEVRIESE, L. et al. *Streptococcus cecorum*, a new species isolated from chickens. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 772-776, 1983.
- ESTEVEZ, W. T. C.; FERREIRA, A. P.; SICILIANO, S. Potencial impacto na Saúde Pública por *Campylobacter* spp. Estudo de caso: curso inferior do rio São João, RJ, Brasil. **Cad Saúde Colet**, v. 19, n. 1, p. 74-81, 2011.
- EUZEBY, J. P. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. **Int J Syst Bacteriol**, v. 47, n. 2, p. 590-2, Apr 1997.
- FARROW, J. A.; COLLINS, M. D. *Enterococcus hirae*, a new species that includes amino acid assay strain NCDO 1258 and strains causing growth depression in young chickens.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 35, n. 1, p. 73-75, 1985.

FORTINA, M. G. et al. Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveals *Enterococcus italicus* sp. nov. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1717-1721, 2004.

FURUMURA, M. T. et al. Virulence-associated characteristics of *Enterococcus faecalis* strains isolated from clinical sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 230-236, 2006.

GAUTHIER, D. T. Bacterial zoonoses of fishes: A review and appraisal of evidence for linkages between fish and human infections. **The Veterinary Journal**, v. 203, n. 1, p. 27-35, 1// 2015.

GHOSH, A. et al. Resident cats in small animal veterinary hospitals carry multi-drug resistant enterococci and are likely involved in cross-contamination of the hospital environment. **Role and prevalence of antibiotics and the related resistance genes in the environment**, p. 65, 2007.

GILMORE, M. S. et al. **Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection [Internet]**. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.

HAMMAD, A. M.; SHIMAMOTO, T.; SHIMAMOTO, T. Genetic characterization of antibiotic resistance and virulence factors in *Enterococcus* spp. from Japanese retail ready-to-eat raw fish. **Food Microbiol**, v. 38, p. 62-6, Apr 2014.

IWERIEBOR, B. C.; OBI, L. C.; OKOH, A. I. Virulence and antimicrobial resistance factors of *Enterococcus* spp. isolated from fecal samples from piggery farms in Eastern Cape, South Africa. **BMC Microbiol**, v. 15, p. 136, 2015.

KLEIN, G. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. **International journal of food microbiology**, v. 88, n. 2, p. 123-131, 2003.

KUSUDA, R. et al. *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 406-409, 1991.

LAYTON, B. et al. *Enterococcus* species distribution among human and animal hosts using multiplex PCR. **Journal of applied microbiology**, v. 109, n. 2, p. 539-547, 2010.

MADIGAN, M. et al. **Microbiologia de Brock**. 14^a ed. Porto Alegre: ARTMED, 2016.

MOORE, J. E. et al. Determination of total antibiotic resistance in waterborne bacteria in rivers and streams in Northern Ireland: Can antibiotic-resistant bacteria be an indicator of ecological change? **Aquatic Ecology**, v. 44, n. 2, p. 349-358, 2010.

MULIK, L.; PATIL, S. S.; KULKARNI, S. A. Detection of virulence factors in clinical isolates of *Enterococci* in a tertiary care Hospital of Southern Maharashtra. **NJIRM**, v. 7, n. 3, p. 7-11, 2016.

NAZEER, S.; ALI, Z.; MALIK, R. N. Water Quality Assessment of River Soan (Pakistan) and Source Apportionment of Pollution Sources Through Receptor Modeling. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 71, n. 1, p. 97-112, 2016.

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

PADILLA, C.; LOBOS, O. Virulence, bacterocin genes and antibacterial susceptibility in *Enterococcus faecalis* strains isolated from water wells for human consumption. **Springerplus**, v. 2, n. 1, p. 43, Dec 2013.

PAOSINHO, A. et al. Acute Pyelonephritis with Bacteremia Caused by *Enterococcus hirae*: A Rare Infection in Humans. **Case Rep Infect Dis**, v. 2016, p. 4698462, 2016.

RODRIGUES, C. M. ONE HEALTH: SUBSÍDIOS PARA UMA ANÁLISE AMPLIADA DA LEPTOSPIROSE COMO UMA ZOONOSE NEGLIGENCIADA. **Revista Eletrônica Estácio Saúde**, v. 4, n. 2, p. 103-116, 2015.

SANTIAGO-RODRIGUEZ, T. M. et al. Antibiotic-resistance and virulence genes in *Enterococcus* isolated from tropical recreational waters. **J Water Health**, v. 11, n. 3, p. 387-96, Sep 2013.

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

SEDLÁČEK, I. et al. *Enterococcus ureilyticus* sp. nov. and *Enterococcus rotai* sp. nov., two urease-producing enterococci from the environment. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 502-510, 2013.

SHARIFI-RAD, M. et al. First case of vanA-positive *Enterococcus mundtii* in human urinary tract infection in Iran. **New Microbes New Infect**, v. 11, p. 68-70, May 2016.

STALEY, Z. R. et al. Lack of Direct Effects of Agrochemicals on Zoonotic Pathogens and Fecal Indicator Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 22, p. 8146-8150, November 15, 2012.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12^a ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2017. 934p ISBN 978-85-8271-354-9.

TUHINA, B.; ANUPURBA, S.; KARUNA, T. Emergence of antimicrobial resistance and virulence factors among the unusual species of enterococci, from North India. **Indian J Pathol Microbiol**, v. 59, n. 1, p. 50-5, Jan-Mar 2016.

VAN HAL, S. J. et al. Evolutionary dynamics of *Enterococcus faecium* reveals complex genomic relationships between isolates with independent emergence of vancomycin resistance. **Microbial Genomics**, v. 2, n. 1, 2016.

VAN TYNE, D.; GILMORE, M. S. Friend turned foe: evolution of enterococcal virulence and antibiotic resistance. **Annu Rev Microbiol**, v. 68, p. 337-56, 2014.

VESILIND, P. A.; MORGAN, S. M. **Introduction to environmental engineering**. 2^a ed. São Paulo, Brasil. : Cengage Learning, 2013.

WANG, Y. et al. A novel gene, *optrA*, that confers transferable resistance to oxazolidinones and phenicols and its presence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* of human and animal origin. **J Antimicrob Chemother**, May 14 2015.

WILLIAMS, A.; FARROW, J.; COLLINS, M. Reverse transcriptase sequencing of 16S ribosomal RNA from *Streptococcus cecorum*. **Letters in applied microbiology**, v. 8, n. 5, p. 185-189, 1989.

WOJNICZ, D. et al. Study of the impact of cranberry extract on the virulence factors and biofilm formation by *Enterococcus faecalis* strains isolated from urinary tract infections. **Int J Food Sci Nutr**, v. 67, n. 8, p. 1005-16, Dec 2016.

WORMSER, G. P.; ASHOUR, H. M. One Health—People, Animals, and the Environment. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, n. 10, p. 1510-1510, 2014.

ZINSSTAG, J. et al. **One Health: The Theory and Practice of Integrated Health Approaches**. Boston, MA, USA: CABI, 2015. ISBN 9781780643410.

3 CAPÍTULO 1 - ARTIGO

POTENCIAL CITOTÓXICO E VIRULÊNCIA DE *Enterococcus* sp. ISOLADOS DE AMBIENTE AQUÁTICO.

3.1 INTRODUÇÃO

Enterococcus sp. fazem parte da flora normal do trato gastrointestinal tanto de humanos e animais (AMARAL et al., 2017), e nos últimos anos, têm sido relatados como uma das principais causas de infecções nosocomiais (GOH et al., 2017).

Este gênero é um dos principais bioindicadores de contaminação de ambientes aquáticos, pois embora não sejam formadores de esporos, são tolerantes a uma gama de condições ambientais. Ainda, apresentam, capacidade trocar genes de virulência e resistência inter e intra-espécies (AYENI et al., 2016; CHEN et al., 2017; CONWELL et al., 2017).

O consumo de água contaminada tem implicações para a saúde humana, causando doenças que incluem diarreia, endocardite e bacteremia (NANNINI et al., 2005; TAKEUCHI et al., 2005). Estas doenças são um desafio, principalmente pelas cepas enterocócicas multirresistentes aos antimicrobianos.

Junto com o surgimento da resistência antimicrobiana e difusão generalizada, tem havido um surgimento simultâneo de várias espécies de enterococos. Vinte e três espécies de *Enterococcus* têm sido associados com significância clínica, sendo *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* as duas principais espécies (PRAKASH; RAO; PARIJA, 2005).

No entanto, devido a várias questões como a resistência intrínseca a determinado grupo de antibióticos e servindo como potenciais reservatórios de elementos transferíveis, outras espécies têm sido cada vez mais reconhecidas como causa de preocupação mundial. Por essa razão, a identificação e caracterização de isolados enterocócicos de amostras ambientais e clínicas tornou-se importante (TUHINA et al., 2016).

Além da resistência antimicrobiana, ocorreu também a emergência de vários fatores de virulência, os quais contribuem para a disseminação e sobrevivência de microrganismos em diversos nichos (MUNDY; SAHM; GILMORE, 2000). Dentre esses fatores de virulência, destacam-se a produção de hemolisina, gelatinase, substância de agregação, proteína de superfície, e capacidade de formar biofilme (WOODS et al., 2017). *Enterococcus* ainda apresentam a capacidade de sintetizar peptídeos, conhecidos como bacteriocinas, que podem

ter atividade antibacteriana, citotóxica e de resistência (GELDART; KAZNESSIS, 2017; PERUMAL; VENKATESAN, 2017).

A maioria dos estudos tem abordado as duas principais espécies de *Enterococcus*, sendo desconhecido a prevalência exata das demais espécies no ambiente. Porém, já foi descrito que espécies incomuns tem sido responsáveis por graves infecções nosocomiais, necessitando de vigilância epidemiológica deste microrganismo (CHAUDHARY; SHAMMA; YADAV, 2007). Alguns estudos tem relacionado doenças enterocócicas associadas à veiculação hídrica (STILLO; MACDONALD GIBSON, 2017).

Por possuírem um alto potencial de virulência e estar entre as espécies microbianas patogênicas da atualidade, os estudos de *Enterococcus* sp. não pertencentes às espécies *E. faecium* e *E. faecalis* faz se necessário, principalmente os de veiculação hídrica, por apresentarem maior disseminação para a população de forma direta e indireta. Portanto o objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial de virulência, resistência à antibióticos e citotoxicidade de isolados de *Enterococcus* sp. não pertencentes às espécies *E. faecium* e *E. faecalis* provenientes de ambiente aquático.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Coleção de amostras

Neste estudo foram analisados 4 isolados de *E. mundtii* e 8 de *E. casseliflavus*, provenientes de ambientes aquáticos e previamente caracterizados por Roberto (2015). As culturas encontravam-se estocadas em freezer e foram reidratadas em 5 mL de caldo Luria-Bertani (LB) (Himedia) por 10 minutos à temperatura ambiente, seguido de incubação a 37 °C por 24 horas.

Extração de DNA

A extração de DNA genômico foi realizada pelo método de fervura (MARQUES; SUZART, 2004). Para tanto, as bactérias foram cultivadas em caldo LB, incubadas a 37 °C sob agitação constante (180 rpm) por 18 horas. Após este período, as bactérias foram centrifugadas por 10 min a 10.000 rpm, no qual o sedimento foi ressuscitado em 300 µL água ultrapura esterilizada. A suspensão de células foi submetida ao aquecimento a 100 °C por 30 minutos. Em seguida, foram novamente centrifugadas, nas mesmas condições descritas acima, e por fim 150 µL do sobrenadante contendo DNA foi retirado e armazenado em freezer a -20 °C.

Avaliação de genes codificadores de virulência e resistência

A identificação de marcadores de virulência e resistência á antimicrobianos foi realizada pela técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction), sendo utilizada oligonucleotídeos iniciadores conforme descrito na Tabela 2. Todas as reações foram realizadas em termociclador (Biosystems), em um volume final de 20 µL, contendo 10 µL DNA, 1,0 U Taq DNA polimerase (Invitrogen), 10X Tampão da Taq, 2,5mM de MgCl₂, 0,17mM de cada dNTP, 1 µmol de cada oligonucleotídeo iniciador (Forward e Reverse). O programa do termociclador teve uma desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, seguido por 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, pareamento correspondente ao oligonucleotídeo (Tabela 2) por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto, e extensão final a 72 °C por 10 minutos.

O controle negativo conteve todos os reagentes, exceto o DNA. Os produtos resultantes da amplificação foram separados em gel de agarose a 1,0 %, corados com brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta e fotografados com sistema de fotodocumentação computadorizado L-PIX ST (LOCCUS). O tamanho do produto amplificado foi comparado com o marcador de DNA 1Kb ladder plus (Amersham Pharmacia Biotech).

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores e condições de uso para amplificar diferentes marcadores de virulência em *Enterococcus* sp. por PCR.

Gene	Sequência nucleotídica (5'-3')	Tamanho do produto (bp)	T (°C)	Referências
<i>asa 1</i>	F:GCACGCTATTACGAACTATGA R:TAAGAAAGAACATCACCACGA	375	56	VANKERCKHOV EN et al. (2004)
<i>agg</i>	F:AAGAAAAAGAAGTAGACCAAC R:AAACGGCAAGACAAGTAAATA	1553	56	EATON; GASSON (2001)
<i>cylA</i>	F:ACTCGGGGATTGATAGGC R:GCTGCTAAAGCTGCGCTT	688	54	VANKERCKHOV EN et al. (2004)
<i>ace</i>	F:AAAGTAGAATTAGATCCACAC R:TCTATCACATTCGGTTGCG	320	56	MANNU et al. (2003)
<i>gelE</i>	F:AGTTCATGTCTATTTTCTTCAC R:CTTCATTATTTACACGTTTG	402	56	MANNU et al. (2003)
<i>cpd</i>	F:TGGTGGGTTATTTTTCAATTC R:TACGGCTCTGGCTTACTA	782	50	EATON; GASSON (2001)
<i>PAI</i>	F:TTTGGGGCAACTGGAATAGT R:CCCAGCAAATAGTCCATCAT	407	56	AL-TALIB et al. (2015)
<i>sprE</i>	F:GGTAAACCAACCAAGTGAATC R:TTCTTCCGATTGACGCAAAA	300	56	AL-TALIB et al. (2015)
<i>vanA</i>	F:GTAGGCTGCGATATTCAAAGC R:CGATTCAATTGCGTAGTCCAA	231 <i>E.faecium</i> 330 <i>E.faecalis</i>	56	BELL; PATON; TURNIDGE (1998)
<i>vanB</i>	GCTCCGCAGCCTGCATGGAC AACGATGCCGCCATCCTCCTGC	320	56	BELL et al. (1998)

asa1: substância de agregação, *agg*: substância de agregação, *cylA*: secreção de bacteriocinas ativadoras de citolisina, *ace*: adesina de colágeno de *Enterococcus*, *gelE*: gelatinase, *cpd*: feromônio sexual, *PAI*: ilha de patogenicidade, *sprE*: serina endopeptidase, *vanA* e *vanB*: resistência à vancomicina.

Detecção fenotípica dos fatores de virulência

Ensaio de atividade hemolítica

A atividade hemolítica dos isolados foi avaliada em placas de ágar sangue preparadas com ágar Brain Heart Infusion (BHI-Acumedica), contendo 5,0 % v/v de sangue de carneiro desfibrinado (Laborclin), segundo metodologia descrita por Eaton e Gasson (2001), com modificações. Uma alíquota de 10 µL de uma suspensão celular contendo 1x10⁷ células/ml foi adicionada à superfície do meio. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h e a presença de zona de hemólise em torno das colônias foi indicativo de atividade hemolítica positiva, que quando confirmada, foi mensurada em milímetros com valores convertidos em PZ (halo da colônia/ halo da colônia + halo de hemólise). Uma cepa controle de *Staphylococcus aureus* foi utilizada como controle positivo.

Avaliação da produção de gelatinase

A avaliação da produção de gelatinase seguiu a metodologia descrita por Cruz e Torres (2012). Uma alíquota de 10 µL de uma suspensão celular (1×10^7 células/ml) foi adicionada à superfície do meio ágar Muller Hinton (MH-KASVI) suplementado com 1,0 % de gelatina. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h e a presença de halo translúcido em torno das colônias foi indicativo de atividade gelatinolítica positiva, que quando confirmada, foi mensurada em milímetros com valores convertidos em PZ. A bactéria *Serratia marcescens* foi utilizada como controle positivo para a produção de gelatinase.

Avaliação da produção de lipase

A avaliação da produção de lipase seguiu protocolo descrito por Hankin e Anagnostakis (1975), com modificações. Uma alíquota de 10 µL de uma suspensão celular (1×10^7 células/ml) foi adicionada à superfície do meio ágar peptona 1,0 % (m/v) suplementado com 0,5 % (m/v) de NaCl e Tween 20 a 1,0 % (v/v). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h e a presença de halo translúcido em torno das colônias foi indicativo de atividade lipolítica positiva, que quando confirmada, foi mensurada em milímetros com valores convertidos em PZ.

Teste de sensibilidade a antimicrobianos

Os isolados foram testados para a suscetibilidade frente à onze antimicrobianos: (ácido clavulânico 30 µg, amicacina 30 µg, ampicilina 10 µg, ciprofloxacina 5 µg, cloranfenicol 30 µg, eritromicina 15 µg, gentamicina 10 µg, norfloxacina 10 µg, teicoplanina 30 µg, tetraciclina 30 µg e vancomicina 30 µg) pelo método Kirby-Bauer (disco difusão em ágar). Uma colônia de cada isolado foi suspensa em solução salina 0,85 % até atingirem a turbidez da escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) e em seguida, foram semeadas em ágar Muller-Hinton (MH-Himedia). Discos de antibiótico foram depositados sobre o meio inoculado. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e observados o halo de inibição. Interpretação conforme preconizados pelo Clinical Laboratory Standard (CLSI, 2012). Foi utilizada uma cepa controle, ATCC *Staphylococcus aureus* 25923.

Detecção da atividade antagonista

A atividade antagônica foi realizada conforme Drechsel et al (2009). Cada isolado foi semeado meio BHI sólido e incubados a 37 °C por 24 h. Em seguida, as placas foram

invertidas e 1 mL de clorofórmio foi adicionado na parte interna da tampa. As placas foram fechadas e mantidas em repouso durante 20 minutos, seguido da remoção do clorofórmio. Posteriormente, foi depositado sobre o meio, 10 mL de ágar BHI soft contendo $1,5 \times 10^8$ UFC/mL de cada cultura teste. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h e o antagonismo foi verificado pela presença de halo translúcido ao redor das colônias de *Enterococcus* sp. A inibição foi considerada positiva quando a diferença entre o diâmetro da colônia e o diâmetro do halo foi superior a 0,5 mm (SCHILLINGER; LUCKE, 1989).

As culturas testes utilizadas neste estudo foram *Escherichia coli* enterotoxigênica BAC49LT, *Listeria innocua* CLIP 12612, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecium* e *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076. Os experimentos foram conduzidos em triplicatas e em três diferentes repetições.

Citotoxicidade do Sobrenadante de Cultivo Livre de Células

A citotoxicidade do sobrenadante de cultivo livre de células (CFS) dos isolados de *Enterococcus* sp., frente a células HeLa, foi avaliada utilizando o kit Cyto Tox96 Non-Radioative Assay (Promega). Células HeLa foram cultivadas a 3×10^4 células/mL em poço de placas de microtitulação contendo meio DEMEM acrescido de vermelho de fenol (LGC Biotecnologia) e incubadas a 37 °C, 5,0 % de CO₂.

O CFS de *Enterococcus* sp. foi obtido cultivando o microrganismo em meio caldo BHI a 37 °C por 24 h. O sobrenadante de cultivo foi coletado por centrifugação a 10.000 rpm/10min, seguido de filtração em membrana Millipore® 0,22 µm de porosidade. O cálculo de lactato desidrogenase (LDH) liberada pelas células foi determinado de acordo com o protocolo do fabricante relativo a liberação máxima de LDH a partir das células lisadas e corrigida pela liberação espontânea de LDH pelas células ou sobrenadante apenas. Os experimentos foram realizados em triplicata.

O critério utilizado para determinação do grau de citotoxicidade dos sobrenadantes de cultivo de cada isolado foi baseado na maior diluição capaz de causar maior citotoxicidade nas células comparativamente aos controles.

Quantificação da biomassa de biofilme

A quantificação do potencial dos isolados de *Enterococcus* sp. em formar biofilme em superfície de poliestireno foi realizada em microplacas de poliestireno conforme ensaio

proposto por STEPANOVIC et al. (2007), com modificações. As amostras bacterianas foram cultivadas em meio BHI solidificado a 37 °C por 24 h. Após este período, colônias de cada amostra foram transferidas para 3 mL de caldo BHI e o meio incubado a 37 °C por 24 h. Transcorrido este período, o número de células bacterianas foi determinado por espectrometria, DO (Densidade óptica), em comprimento de onda de 490 nm com o objetivo de determinar o inóculo inicial em cada experimento (DO_{490nm} a 0,1, correspondente a 1×10^8 células/mL). Após ajuste da concentração celular dos isolados correspondente a 1×10^8 células/mL, 200 µL da suspensão foram transferidos para cada poço da placa de poliestireno e esta foi incubada a 37 °C por 24 h. Transcorrido o período de incubação, o conteúdo dos poços foram cuidadosamente aspirados e lavados por duas vezes com solução de PBS 1X para remoção das células não aderidas. Em seguida, os biofilmes formados foram fixados com 200 µL de metanol, que foram removidos após 15 minutos.

As placas foram secas a temperatura ambiente, e 200 µL de cristal violeta (1,0 % v/v) foram adicionados em cada poço e a placa incubada a temperatura ambiente por 5 min. Os poços foram então lavados com água ultrapura estéril e 200 µL de ácido acético (33,0 % v/v) foram adicionados aos poços para liberação do corante. A absorbância da solução foi obtida por leitura espectrofotométrica em leitor de microplaca (Bio-TeK EL 808) a 540 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata com 3 experimentos distintos. As amostras foram classificadas de acordo com o cut-off (DO_c) que foi definido em função da média de três experimentos considerados como controle negativo que incluíam poços acrescidos somente do meio de cultura. Os critérios utilizados para classificar as amostras ambientais de *Enterococcus* sp. quanto à capacidade e a intensidade de formarem biofilme em superfície de poliestireno foram os descritos por STEPANOVIC et al. (2007) como segue:

$DO_A \leq DO_C$ - Não formadores de biofilme (NF)

$DO_C < DO_A \leq 2DO_C$ - Fracamente formadores de biofilme (FRF)

$2DO_C < DO_A < 4DO_C$ - Moderadamente formadores de biofilme (MF)

$DO_A \geq 4DO_C$ - Fortemente formadores de biofilme (FF)

O teste t de Student foi utilizado para comparar os valores de absorbância dos formadores de biofilme entre os isolados. Os resultados foram considerados significativos quando o valor de p foi $\leq 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o Pacote Estatístico do Microsoft office excel 2013.

3.3 RESULTADOS

Neste estudo foram analisados 12 isolados, sendo os isolados 9, 14, 30 e 33 identificados como *Enterococcus mundtii*, isolados 5, 10, 13, 16, 19, 24, 26 e 27 identificados como *Enterococcus casseliflavus*, previamente caracterizados por Roberto (2015).

A distribuição de genes de virulência e resistência nos isolados de *Enterococcus* estão apresentados na Tabela 3. Observou-se que 8,33 % dos isolados apresentavam o gene *vanA*, 33,33 %, *vanB*, 41,66 % *gelE*, 41,66 % *ace*, 33,33 % *asa1*, 50 % *agg*, 25 % *cylA*, 25 % *sprE*. Nenhum dos isolados analisados apresentou os genes *cpd* e *PAI*.

Os isolados *E. mundtii* (14) e *E. casseliflavus* (24) foram os que mais apresentaram genes relacionados à resistência e virulência. Os isolados *E. casseliflavus* (10 e 19), não apresentaram nenhum gene de virulência. No entanto, foi observado a produção de hemolisina em ambos. Os demais isolados apresentaram pelo menos um gene relacionado a resistência ou virulência.

Nos testes fenotípicos foi observado que somente os isolados *E. mundtii* (14 e 30) apresentaram atividade de gelatinase, possuindo também o gene para esta atividade (gene *gelE*).

A avaliação fenotípica dos fatores de virulência avaliados, demonstrou que 16,66 % dos isolados apresentaram produção de gelatinase, 75 % exibiram atividade hemolítica e nenhum apresentou atividade lipolítica (Tabela 3).

Em relação a atividade antagonica, 41,66 % dos isolados inibiram o crescimento de *E. faecalis* e 50 % inibiram o crescimento de *E. faecium*. Não foi observada atividade antagonista para as demais espécies de bactérias teste analisadas.

Os resultados obtidos no teste de sensibilidade a antimicrobianos estão apresentados na Tabela 4. Todos os isolados apresentaram resistência a pelo menos um dos antibióticos testados. O isolado 19 (*E. casseliflavus*) apresentou resistência a todos os antimicrobianos. Enquanto 83,33 % dos isolados apresentaram resistência a gentamicina e ao ácido nalidíxico, 75 % dos isolados apresentaram resistência à ciprofloxacina e à norfloxacina, 66,66 % dos isolados apresentaram resistência à teicoplanina e à vancomicina, e um total de 58,33 % dos isolados apresentaram resistência a ampicilina, 50 % dos isolados apresentaram resistência a amoxicilina, eritromicina e tetraciclina. O antimicrobiano ao qual houve menor número de isolados resistentes foi o cloranfenicol (25 % dos isolados).

Tabela 3: Relação de isolados, fatores genéticos e fenotípicos de virulência.

Isolados	Espécies	Genótipos										Fenótipo			$\frac{\text{Biofilme}}{\text{Abs Clas}}$				
		<i>van A</i>	<i>van B</i>	<i>gelE</i>	<i>ace</i>	<i>asa 1</i>	<i>agg</i>	<i>cylA</i>	<i>sprE</i>	<i>cpd</i>	<i>PAI</i>	Gelatinase	Hemolisina	Lipase					
5	<i>E. casseliflavus</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	0,23 ± 0,02	MF
10	<i>E. casseliflavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	0,20 ± 0,03	MF
13	<i>E. casseliflavus</i>	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	0,34 ± 0,07	MF
16	<i>E. casseliflavus</i>	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	0,21 ± 0,03	FF
19	<i>E. casseliflavus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	0,40 ± 0,09	FF
24	<i>E. casseliflavus</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	0,46 ± 0,13	FF
26	<i>E. casseliflavus</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	0,43 ± 0,14	FF
27	<i>E. casseliflavus</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,54 ± 0,04	FF
9	<i>E. mundtii</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	1,07 ± 0,05	FF
14	<i>E. mundtii</i>	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	0,16 ± 0,03	FRF
30	<i>E. mundtii</i>	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,19 ± 0,02	MF
33	<i>E. mundtii</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	0,28 ± 0,01	MF

Abs: absorvância mais desvio padrão. Clas: Classificação. FRF fracamente formador de biofilme, MF moderadamente formador de biofilme, FF fortemente formador de biofilme

Tabela 4: Distribuição da resistência a antimicrobianos entre os isolados de *Enterococcus*.

Espécies	Isolados	Antibióticos Resistentes
<i>E. casseliflavus</i>	5	NOR
<i>E. casseliflavus</i>	10	GEN; NAL; TET
<i>E. casseliflavus</i>	13	AMC; AMP; CIP; ERI; GEN; NAL; NOR; TEC; TET; VAN
<i>E. casseliflavus</i>	16	AMC; AMP; CIP; ERI; GEN; NAL; NOR; TEC; TET; VAN
<i>E. casseliflavus</i>	19	AMC; AMP; CIP; CLO; ERI; GEN; NAL; NOR; TEC; TET; VAN
<i>E. casseliflavus</i>	24	AMC; AMP; CIP; ERI; GEN; NAL; NOR; TEC; TET; VAN
<i>E. casseliflavus</i>	26	AMC; AMP; CIP; CLO; ERI; GEN; NAL; NOR; TEC; VAN
<i>E. casseliflavus</i>	27	CIP; GEN; NAL; NOR
<i>E. mundtii</i>	9	AMP; NAL;
<i>E. mundtii</i>	14	AMP; CIP; CLO; ERI; GEN; NAL; NOR; TEC; TET; VAN
<i>E. mundtii</i>	30	AMC; CIP; GEN; NAL; NOR; TEC; VAN
<i>E. mundtii</i>	33	CIP; ERI; GEN; TEC; VAN

AMC= amoxicilina 30µg; AMP= ampicilina 10µg; CIP= ciprofloxacina 5µg; CLO= cloranfenicol 30µg; ERI= eritromicina 15µg; GEN= gentamicina 10µg; NAL= ácido nalidíxico 30µg; NOR= norfloxacina 9µg; TEC= teicoplanina 30µg; TET= tetraciclina 30µg; VAN= vancomicina 30µg.

Embora todos os isolados foram capazes de formar biofilme (Tabela 3), estes apresentaram diferenças quanto à quantidade de biomassa total de biofilme formada, segundo a classificação proposta por Stepanovic et al. (2007), portanto, os isolados que apresentaram aderência com valores de DO_{540nm} inferiores a 0,09 foram consideradas não formadoras de biofilme. Os valores entre e 0,09 e 0,18 representaram amostras fracamente formadoras de biofilme e na faixa de 0,18 a 0,36 foram classificadas como moderadamente formadoras de biofilme. As amostras fortemente formadoras de biofilme apresentaram valores de DO_{540nm} acima de 0,36.

O isolado 9 apresentou maior potencial em formar biofilme entre todos os isolados avaliados (Abs_{540nm} $1,07 \pm 0,05$), seguido do isolado 27 (Abs_{540nm} $0,54 \pm 0,04$). Os isolados 24, 26 e 19 apresentaram DO_{540nm} de (Abs_{540nm} $0,46 \pm 0,13$; $0,43 \pm 0,14$ e $0,40 \pm 0,09$), respectivamente não apresentando diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$). O isolado 13 apresentou (Abs_{540nm} $0,34 \pm 0,07$), o isolado 33 apresentou (Abs_{540nm} $0,277 \pm 0,01$), já os isolados 5, 16, 10 e 30 apresentaram DO_{540nm} de (Abs_{540nm} $0,23 \pm 0,02$; $0,21 \pm 0,03$, $0,20 \pm 0,03$ e $0,19 \pm 0,02$), respectivamente e também não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$). A menor quantidade de biomassa biofilme entre os isolados avaliados foi observada para o isolado 14 (Abs_{540nm} $0,16 \pm 0,03$), fracamente formador.

A habilidade em formar biofilme foi isolado-dependente não podendo ser classificada de acordo com as espécies utilizadas neste estudo, uma vez que os isolados que apresentaram maior e menor DO_{540nm} pertencem a mesma espécie, *E. mundtii*.

Os resultados para avaliação do potencial citotóxico dos sobrenadantes de cultivo obtidos dos isolados de *Enterococcus* sp. estão apresentados na figura 1. Todos os isolados foram citotóxicos para células HeLa. De acordo com o critério estabelecido, os sobrenadantes de cultivo dos isolados 13, 16, 24 e 27 apresentaram o maior grau de citotoxicidade na concentração 1/2. No entanto, entre estes, o isolado 13 foi o mais citotóxico (24,34 %), seguido pelos isolados 24 (21,03 %), 27 (17,07 %) e 16 (15,43 %), respectivamente. Para os isolados 26 e 19 a maior diluição que se mostrou mais citotóxica para ambos foi a concentração 1/4, no entanto, o isolado 26 (20,35 %) foi mais citotóxico que o isolado 19 (17,86 %). Para os isolados 10, 9, 5, 14, 30, 33, observou-se que o maior grau de citotoxicidade foi demonstrado na concentração de 1/8, no entanto, o sobrenadante obtido do isolado 10 foi o mais citotóxico apresentando 34,16 % de citotoxicidade, seguido pelos sobrenadantes obtidos dos isolados 9 (30,24 %), 5 (28,74 %), 14 (25,39 %), 30 (21,51 %), 33 (19,63 %), respectivamente. Estes dados demonstram relevância uma vez que mesmo na maior diluição do CFS foi possível observar um significativo potencial citotóxico dos sobrenadantes obtidos dos isolados de *Enterococcus* sp. avaliados, especialmente para o isolado 10, o qual apresentou o maior grau de citotoxicidade observado entre todos os isolados avaliados.

O potencial citotóxico dos sobrenadantes foi isolado-dependente não podendo ser classificada de acordo com as espécies utilizadas neste estudo, uma vez que os isolados que apresentaram maior e menor potencial citotóxico pertencem a mesma espécie (*E. casseliflavus*).

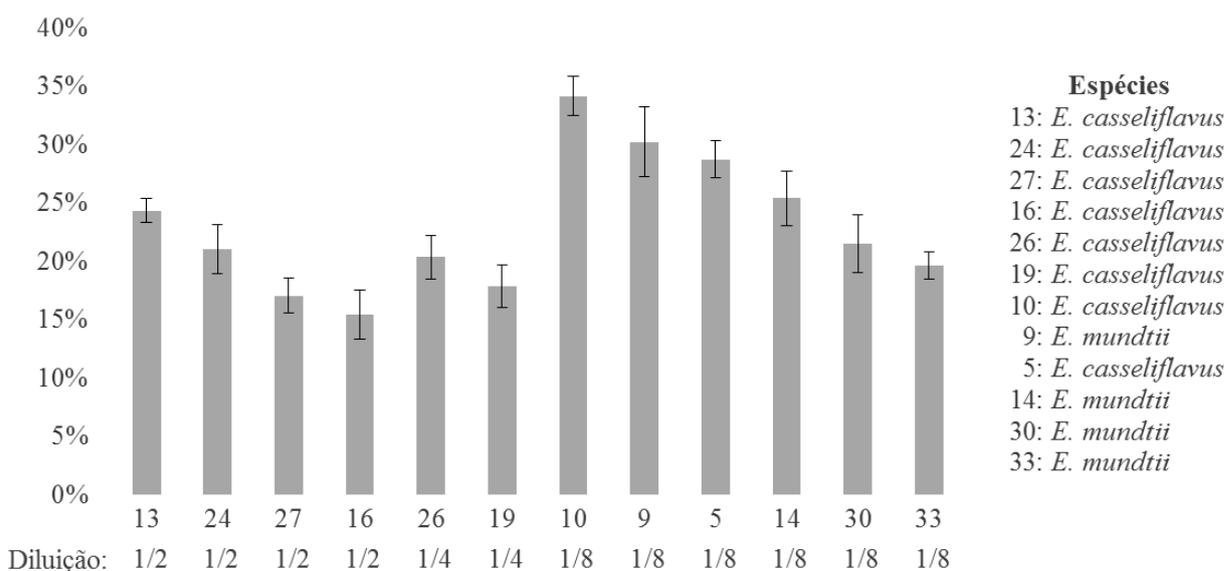


Figura 1: Avaliação do potencial citotóxico.

3.4 DISCUSSÃO

Enterococcus sp. tem sido um bom bioindicador de contaminação hídrica quando comparado com outros microrganismos (EKWANZALA et al., 2017). E quando apresentam fatores de resistência, virulência e citotoxicidade se tornam um grande problema para o ambiente e para saúde pública. Muitos isolados, *E. casseliflavus* (19, 13, 16, 24 e 26) e *E. mundtii* (14), apresentaram resistência a vários antibióticos usualmente aplicáveis como vancomicina e tetraciclina, além de apresentarem genes de virulência (*gelE* e *cyIA*), estando distribuídos na bacia hidrográfica urbana, sua disseminação ocorre para várias regiões, isso pode permitir a transmissão eficiente de seus genes resistentes a antibióticos e virulência a outras bactérias. Aumentando o risco da saúde da população que depende desses recursos hídricos.

A resistência a antimicrobianos está entre os fatores mais relevantes quanto a importância clínica do gênero *Enterococcus*. No entanto, por serem microrganismos ubíquos, esta resistência é relevante na maioria dos ambientes ecológicos naturais em que *Enterococcus* habitam.

E. mundtii não é facilmente isolado de ambientes aquáticos, aparecendo em poucas pesquisas como Abriouel et al. (2008) e Ferguson et al. (2005) que detectaram apenas um isolado em amostras de água. Já Nishiyama et al. (2017) não encontraram esta espécie em sua amostragem. O que torna importante o entendimento de suas características, potencial de virulência e resistência a antibióticos.

E. casseliflavus, é uma das bactérias considerada ubíqua, há vários estudos que mostram seu isolamento de infecções clínicas (BRITT; POTTER, 2016), alimentos (ALFONZO et al., 2017), intestino de inseto (VILANOVA et al., 2016), sedimentos (TANG et al., 2016), frutos do mar (SAID et al., 2017) e águas continentais (NISHIYAMA et al., 2017).

As análises de detecção de genes de resistência a antimicrobianos demonstraram que os isolados da espécie *E. casseliflavus* 5, 13, 16 e 24 apresentaram algum dos genes de resistência à vancomicina analisados. Contudo, somente os isolados 16 e 24 apresentaram resistência *in vitro*, os demais isolados apresentam o gene, porém não foram expressos no momento, podendo estar silenciados. Em contrapartida, os isolados *E. casseliflavus* 19 e 26 não apresentaram os genes *vanA* e *vanB*, porém apresentaram resistência *in vitro*, podendo esta resistência estar relacionada a demais genes que conferem resistência à vancomicina, como *vanD*, *vanM*, *vanC*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanN* (BRITT; POTTER, 2016); (CHUNHUI;

XIAOGANG, 2015; GOUSIA et al., 2015; GULHAN et al., 2015; NISHIYAMA et al., 2017; STARLANDER; TELLGREN-ROTH; MELHUS, 2016).

Apenas o isolado de *E. mundtii* 14 apresentou gene *vanB* para resistência à vancomicina, e também apresentou resistência *in vitro*.

No presente estudo, a espécie *E. casseliflavus* apresentou cinco isolados com fenótipo de resistência à vancomicina, enquanto três isolados de *E. mundtii* apresentaram este fenótipo. Embora a resistência intrínseca à vancomicina em *E. casseliflavus* seja conhecida (ELIOPOULOS; GOLD, 2001; GILMORE et al., 2014), não foi observada neste estudo. Estes dados representam a importância da investigação de genes de resistência em espécies menos frequentes como *E. mundtii*.

Do total de isolados foi observado a resistência à ampicilina e ao cloranfenicol em 58,33 % e 25 % respectivamente, diferentemente do observado por ZHANG et al. (2016), onde nenhum isolado apresentou resistência tanto para ampicilina como para cloranfenicol. Já para TUHINA et al. (2016), observou que menos de 50 % dos isolados apresentaram resistência a ampicilina.

Mais de 41 % de todos os isolados apresentaram o gene *gelE*, que codifica para produção da enzima gelatinase. No entanto, na avaliação fenotípica *in vitro*, apenas 2 isolados de *E. mundtii* 14 e 30, portadores do gene *gelE*, apresentaram fenótipo positivo para produção de gelatinase, o mesmo observado por Zhang et al. (2016) e Araujo et al. (2015) onde alguns isolados apresentaram genótipo positivo e fenótipo negativo para produção de gelatinase.

A atividade hemolítica foi observada em 75 % do total de isolados, independente da espécie, onde apenas um isolado *E. mundtii* (14) apresentou o gene *cylA*, que codifica para produção de citolisina-hemolisina e outros dois isolados, um *E. casseliflavus* (24) e um *E. mundtii* (30), foram positivos para presença do gene *cylA*, mas não apresentaram atividade hemolítica na avaliação fenotípica *in vitro*. Resultados superiores aos encontrados por MULIK et al. (2016) que observou menos de 36 % de atividade hemolítica. Mulik et al (2016) ressalta que a hemolisina é um importante marcador de virulência em infecções por enterococos.

Estes resultados, ressaltam a importância dos estudos das espécies de *Enterococcus* não pertencentes às espécies *E. faecium* e *E. faecalis*, uma vez que pouco se conhece sobre os fatores de virulência dessas espécies. Neste estudo observou-se que em todos os isolados que apresentaram fenótipos de atividade gelatinase ou atividade hemolítica positiva foram detectados os genes *gelE* e *cylA*, respectivamente.

Em relação a avaliação do potencial dos isolados avaliados em formar biofilme, todos os isolados apresentaram-se como formadores de biofilme, no entanto com diferentes quantidades de biomassa produzida. Entre os fortemente formadores de biofilme, isolado *E. mundtii* (9) apresentou maior capacidade em formar biofilme que os demais isolados avaliados, o que poderia sugerir um potencial de virulência aumentado, ou também ser um fator que poderia contribuir para uma maior resistência a antibióticos. No presente estudo esta hipótese não se confirma, já que neste caso, o isolado 9 apresentou resistência a apenas dois dos antibióticos testados (ampicilina e ácido nalidíxico). No entanto, a capacidade de formar biofilme facilita a troca e recebimento de genes horizontalmente, uma vez que no ambiente, essas bactérias não estão isoladas e sim em comunidades.

O isolado *E. casseliflavus* 24 também demonstrou-se como fortemente formador de biofilme, o que tende a potencializar sua virulência e resistência a antibióticos. As maiores infecções clínicas foram causadas por *Enterococcus* que possuem a capacidade de formar biofilme (GULHAN et al., 2015), aumentando sua proteção contra o sistema imune do hospedeiro, tornando difícil erradicar (WOJNICZ et al., 2016).

A adesão bacteriana às células hospedeiras é o evento inicial em muitas infecções. No entanto, há pouca informação disponível sobre os fatores que promovem a adesão de *Enterococcus* spp. aos tecidos hospedeiros. No presente estudo a citotoxicidade do sobrenadante de cultivo dos isolados foi avaliada frente a células HeLa, demonstrando, que mesmo nas menores concentrações, foi possível observar altos níveis de citotoxicidade. Furumura et al., 2006, ao avaliar a citotoxicidade de isolados *E. faecalis* frente a células HeLa, observou-se que 50 % dos isolados aderiram a esta linhagem celular. No entanto, poucos estudos existem sobre o potencial citotóxico de metabólitos de *Enterococcus* spp.

Essa capacidade de metabolizar e secretar biomoléculas, que podem ser peptídeos, proteínas, enzimas dentre outras, conferem as bactérias o poder de inibir o crescimento de outras bactérias e de causar danos a células humanas (PERUMAL; VENKATESAN, 2017).

Todas as células apresentaram capacidade de formar biofilme, potencial citotóxico e resistência à antibióticos distintos, o que reforça a necessidade de ampliar os estudos sobre isolados incomuns de *Enterococcus*.

3.5 CONCLUSÃO

E. casseliflavus e *E. mundtii* apresentam diferentes genes de resistência à antimicrobianos e diferentes genes de virulência, distribuídos de forma heterogênea entre os isolados avaliados.

Entre os isolados que apresentaram fatores de virulência positivos nas avaliações fenotípicas, nem sempre apresentaram algum dos respectivos genes correlacionados. A habilidade em formar biofilme para os isolados avaliados independe da espécie, da presença de genes de resistência ou de genes de virulência.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que nas condições testadas, nem todos os determinantes de virulência foram necessariamente encontrados nos isolados, porém todos apresentaram-se tóxicos frente a linhagem celular HeLa, o que sugere o fato de que a infecção enterocócica seja multifatorial envolvendo tantos fatores de virulência do microrganismo bem como fatores relacionados ao hospedeiro.

A capacidade e resistência a antibióticos tornam os isolados de grande importância ambiental e médica, uma vez que esses isolados estão em ambientes aquáticos e esses recursos são utilizados para irrigação e recreação, há um contanto indireto com a população, podendo contaminar alimentos e infectar o homem.

Com suas virulências e resistências aumentada, com a capacidade de formarem biofilme, o que potencializa seus indivíduos. Apresentando capacidade de lisar células por seus metabólitos formados, atividade hemolíticas e gelatinase. Tornam os isolados altamente patogênicos e com alto potencial de virulência.

Os isolados de *Enterococcus* sp. possuem características únicas de resistência para cada isolado, não sendo possível estabelecer um parâmetro para cada espécie, onde na mesma espécie apresenta resistências diferentes de um indivíduo para outro. Mostrando a importância do estudo da capacidade e potencial de virulência das espécies de *Enterococcus* de ambientes e locais distintos, para assim compreender e tomar medidas que possam mitigar a ação desses microrganismo.

3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRIOUEL, H. et al. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 123, n. 1–2, p. 38-49, 3/31/ 2008.

AL-TALIB, H. et al. Genotypic variations of virulent genes in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from three hospitals in Malaysia. **Adv Clin Exp Med**, v. 24, n. 1, p. 121-7, Jan-Feb 2015.

ALFONZO, A. et al. Monitoring of wheat lactic acid bacteria from the field until the first step of dough fermentation. **Food Microbiol**, v. 62, p. 256-269, Apr 2017.

AMARAL, D. M. et al. *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* isolated from cheese: Survival in the presence of medications under simulated gastrointestinal conditions and adhesion properties. **J Dairy Sci**, v. 100, n. 2, p. 933-949, Feb 2017.

ARAUJO, C. et al. Evaluation of *Enterococcus* spp. from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum), feed, and rearing environment against fish pathogens. **Foodborne Pathog Disease**, v. 12, n. 4, p. 311-22, Apr 2015.

AYENI, F. A. et al. Identification and prevalence of tetracycline resistance in enterococci isolated from poultry in Ilishan, Ogun State, Nigeria. **J Pharm Bioallied Sci**, v. 8, n. 1, p. 69-73, Jan-Mar 2016.

BELL, J. M.; PATON, J. C.; TURNIDGE, J. Emergence of vancomycin-resistant enterococci in Australia: phenotypic and genotypic characteristics of isolates. **J Clin Microbiol**, v. 36, n. 8, p. 2187-90, Aug 1998.

BRITT, N. S.; POTTER, E. M. Clinical epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus* bloodstream infections. **J Glob Antimicrob Resist**, v. 5, p. 57-61, Jun 2016.

CHAUDHARY, U.; SHAMMA, M.; YADAV, A. Antimicrobial susceptibility patterns of common and unusual *Enterococcus* species isolated from clinical specimens. **J Infect Dis Antimicrob Agents**, v. 24, p. 55-62, 2007.

CHEN, W. et al. Differences in the chemical composition of *Enterococcus faecalis* biofilm under conditions of starvation and alkalinity. **Bioengineered**, v. 8, n. 1, p. 1-7, Jan 02 2017.

CHUNHUI, C.; XIAOGANG, X. Genetic characteristics of vancomycin resistance gene cluster in *Enterococcus* spp. **Yi Chuan**, v. 37, n. 5, p. 452-7, May 2015.

CLSI. **Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing.** Approved standard M02 – A11. v. 32, nº 1, 2012.

CONWELL, M. et al. Interspecies transfer of vancomycin, erythromycin and tetracycline resistance among *Enterococcus* species recovered from agrarian sources. **BMC Microbiol**, v. 17, n. 1, p. 19, Jan 18 2017.

CRUZ, T. E. E.; TORRES, J. M. O. Gelatin hydrolysis test protocol. Washington: Microbial Library American Society for Microbiology. 2012. Disponível em: < <http://www.microbelibrary.org/library/laboratory-test/3776-gelatinhydrolysis-test-protocol> >. Acesso em: 05 de março 2015.

DRECHSEL, M. M.; VIDAL, M. S.; BALDANI, J. I. Indução de substâncias antagônicas produzidas pela bactéria endofítica *Gluconacetobacter diazotrophicus* por raios ultravioleta. **Embrapa Agrobiologia. Boletim de Pesquisa**, v. 57, 2009.

EATON, T. J.; GASSON, M. J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. **Appl Environ Microbiol**, v. 67, n. 4, p. 1628-35, Apr 2001.

EKWANZALA, M. D. et al. Genetic relatedness of faecal coliforms and enterococci bacteria isolated from water and sediments of the Apies River, Gauteng, South Africa. **AMB Express**, v. 7, n. 1, p. 20, Dec 2017.

ELIOPOULOS, G. M.; GOLD, H. S. Vancomycin-Resistant Enterococci: Mechanisms and Clinical Observations. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 2, p. 210-219, July 15, 2001 2001.

FERGUSON, D. M. et al. Enumeration and speciation of enterococci found in marine and intertidal sediments and coastal water in southern California. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 3, p. 598-608, 2005.

GELDART, K.; KAZNESSIS, Y. N. Characterization of Class IIa Bacteriocin Resistance in *Enterococcus faecium*. **Antimicrob Agents Chemother**, Jan 23 2017.

GILMORE, M. S. et al. **Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection [Internet]**. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.

GOH, H. M. et al. Model systems for the study of Enterococcal colonization and infection. **Virulence**, p. 0, Jan 19 2017.

GOUSIA, P. et al. Vancomycin-resistance phenotypes, vancomycin-resistance genes, and resistance to antibiotics of enterococci isolated from food of animal origin. **Foodborne Pathog Dis**, v. 12, n. 3, p. 214-20, Mar 2015.

GULHAN, T. et al. Characterization of *Enterococcus faecalis* isolates originating from different sources for their virulence factors and genes, antibiotic resistance patterns, genotypes and biofilm production. **Iran J Vet Res**, v. 16, n. 3, p. 261-6, Summer 2015.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi. **Mycologia**, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.

MANNU, L. et al. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. **Int J Food Microbiol**, v. 88, n. 2-3, p. 291-304, Dec 01 2003.

MARQUES, E. B. D.; SUZART, S. Occurrence of virulence-associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina, Brazil. **J Med Microbiol**, v. 53, n. Pt 11, p. 1069-73, Nov 2004.

MULIK, L.; PATIL, S. S.; KULKARNI, S. A. Detection of virulence factors in clinical isolates of *Enterococci* in a tertiary care Hospital of Southern Maharashtra. **NJIRM**, v. 7, n. 3, p. 7-11, 2016.

MUNDY, L.; SAHM, D.; GILMORE, M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 13, n. 4, p. 513-522, 2000.

NANNINI, E. C. et al. Decreased virulence of a *gls24* mutant of *Enterococcus faecalis* OG1RF in an experimental endocarditis model. **Infect Immun**, v. 73, n. 11, p. 7772-4, Nov 2005.

NISHIYAMA, M. et al. Antibiotic Resistance Profiling and Genotyping of Vancomycin-Resistant Enterococci Collected from an Urban River Basin in the Provincial City of Miyazaki, Japan. **Water**, v. 9, n. 2, p. 79, 2017.

PERUMAL, V.; VENKATESAN, A. Antimicrobial, cytotoxic effect and purification of bacteriocin from vancomycin susceptible *Enterococcus faecalis* and its safety evaluation for probiotization. **LWT - Food Science and Technology**, v. 78, p. 303-310, 5// 2017.

PRAKASH, V. P.; RAO, S. R.; PARIJA, S. C. Emergence of unusual species of enterococci causing infections, South India. **BMC Infect Dis**, v. 5, p. 14, Mar 17 2005.

ROBERTO, S. B. **Virulência e resistência antimicrobiana de *Enterococcus* sp. isolados de amostras de água**. 2015. 90 p. (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina.

SAID, L. B. et al. Diversity of species and antibiotic resistance in enterococci isolated from seafood in Tunisia. **Annals of Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 135-141, 2017.

SCHILLINGER, U.; LUCKE, F. K. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. **Appl Environ Microbiol**, v. 55, n. 8, p. 1901-6, Aug 1989.

STARLANDER, G.; TELLGREN-ROTH, C.; MELHUS, A. Fatal acquisition of *vanD* gene during vancomycin treatment of septicemia caused by *Enterococcus faecium*. **J Hosp Infect**, v. 92, n. 4, p. 409-10, Apr 2016.

STEPANOVIC, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS**, v. 115, n. 8, p. 891-9, Aug 2007.

STILLO, F.; MACDONALD GIBSON, J. Exposure to Contaminated Drinking Water and Health Disparities in North Carolina. **American Journal of Public Health**, v. 107, n. 1, p. 180-185, 2017.

TAKEUCHI, K. et al. Drug resistance of *Enterococcus faecium* clinical isolates and the conjugative transfer of gentamicin and erythromycin resistance traits. **FEMS Microbiol Lett**, v. 243, n. 2, p. 347-54, Feb 15 2005.

TANG, S. et al. Aerobic degradation of BDE-209 by *Enterococcus casseliflavus*: Isolation, identification and cell changes during degradation process. **J Hazard Mater**, v. 308, p. 335-42, May 05 2016.

TUHINA, B.; ANUPURBA, S.; KARUNA, T. Emergence of antimicrobial resistance and virulence factors among the unusual species of enterococci, from North India. **Indian J Pathol Microbiol**, v. 59, n. 1, p. 50-5, Jan-Mar 2016.

VANKERCKHOVEN, V. et al. Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 10, p. 4473-9, Oct 2004.

VILANOVA, C. et al. The Generalist Inside the Specialist: Gut Bacterial Communities of Two Insect Species Feeding on Toxic Plants Are Dominated by *Enterococcus* sp. **Front Microbiol**, v. 7, p. 1005, 2016.

WOJNICZ, D. et al. Study of the impact of cranberry extract on the virulence factors and biofilm formation by *Enterococcus faecalis* strains isolated from urinary tract infections. **Int J Food Sci Nutr**, v. 67, n. 8, p. 1005-16, Dec 2016.

WOODS, S. E. et al. Characterization of Multi-Drug Resistant *Enterococcus faecalis* Isolated from Cephalic Recording Chambers in Research *Macaques* (*Macaca* spp.). **PLoS One**, v. 12, n. 1, p. e0169293, 2017.

ZHANG, F. et al. Screening probiotic strains for safety: Evaluation of virulence and antimicrobial susceptibility of *enterococci* from healthy Chinese infants. **J Dairy Sci**, v. 99, n. 6, p. 4282-90, Jun 2016.