

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Aline Andréia Caixeta Magalhães Tibúrcio

Influência de antimicrobianos na expressão de genes de virulência associados à produção de biofilme em *Enterococcus faecalis*

Uberaba

2021

Aline Andréia Caixeta Magalhães Tibúrcio

Influência de antimicrobianos na expressão de genes de virulência associados à produção de biofilme em *Enterococcus faecalis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, área de concentração II: “Parasitologia, Imunologia e Microbiologia”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Fisiológicas. Orientadora: Prof^ª. Dra. Adriana Gonçalves de Oliveira. Coorientadora: Prof^ª. Dra. Aline Dias Paiva.

Uberaba

2021

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

T431i Tibúrcio, Aline Andréia Caixeta Magalhães
Influência de antimicrobianos na expressão de genes de virulência
associados à produção de biofilme em *Enterococcus faecalis* / Aline An-
dréia Caixeta Magalhães Tibúrcio. -- 2021.
65 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) -- Universidade
Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2021
Orientadora: Profa. Dra. Adriana Gonçalves de Oliveira
Coorientadora: Profa. Dra. Aline Dias Paiva

1. *Enterococcus faecalis*. 2. Biofilmes. 3. Fatores de virulência. 4. Re-
sistência beta-Lactâmica. 5. Gentamicinas. 6. Farmacorresistência bacteriana.
I. Oliveira, Adriana Gonçalves de. II. Universidade Federal do Triângulo Mi-
neiro. III. Título.

CDU 615.33

ALINE ANDRÉIA CAIXETA MAGALHÃES TIBÚRCIO

Influência de antimicrobianos na expressão de genes de virulência associados à produção de biofilme em *Enterococcus faecalis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, área de concentração II: “Parasitologia, Imunologia e Microbiologia”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Fisiológicas.

30 de março de 2021.

Banca Examinadora

Dr.^a. Adriana Gonçalves de Oliveira - Orientadora
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dr. Anderson Assunção Andrade
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dr.^a. Alessandra Barbosa Ferreira Machado
Universidade Federal de Juiz de Fora



Documento assinado eletronicamente por **ANDERSON ASSUNCAO ANDRADE, Professor do Magistério Superior**, em 30/03/2021, às 15:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#) e no art. 14 da [Resolução nº 34, de 28 de dezembro de 2017](#).



Documento assinado eletronicamente por **ADRIANA GONCALVES DE OLIVEIRA, Professor do Magistério Superior**, em 01/04/2021, às 17:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#) e no art. 14 da [Resolução nº 34, de 28 de dezembro de 2017](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alessandra Barbosa Ferreira Machado, Usuário Externo**, em 23/04/2021, às 10:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#) e no art. 14 da [Resolução nº 34, de 28 de dezembro de 2017](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.uftm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0501852** e o código CRC **3D574C50**.

Dedico este trabalho aos meus queridos avós: Nivalda Silva Magalhães, Benedito Pacheco de Magalhães, Nilza Cardoso Tibúrcio e Waldson Caixeta Tibúrcio, que sempre me apoiaram, vibraram com todas as minhas conquistas e que são minha inspiração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Hélio Caixeta Tibúrcio e Waldelice das Graças Magalhães Tibúrcio pelo amor, incentivo, suporte e confiança. Aos meus irmãos, Abdias André Caixeta Magalhães Tibúrcio e Alice Adriana Caixeta Magalhães Tibúrcio, pelo amor, compreensão e por toda ajuda ao longo dessa caminhada. A toda minha família: obrigada por serem minha fortaleza e meu amparo.

À minha orientadora Dra. Adriana Gonçalves de Oliveira e minha coorientadora Dra. Aline Dias Paiva, obrigada pela oportunidade e por me incentivarem em todos os momentos. Obrigada pela paciência, conhecimento, dedicação e sabedoria.

Agradeço também aos colegas do Laboratório de Microbiologia: Luiza Corá, Bianca Alves, Beatriz Silva, Diego Oliveira, Fábio Ederson, Larissa Beatriz, Jacqueline Sousa, Nami Yoshimura e Vinícius Marques pelas parcerias nas bancadas, convívio harmonioso, amizades, conversas e trocas de experiência.

Aos funcionários do Laboratório de Microbiologia: Luciene Bessa, Celso Tadeu, Sônia Caiado e Kelly Moreira, por me receberem e acolherem, por toda a disponibilidade e pelas boas conversas.

Aos professores do Laboratório de Microbiologia da época em que realizei meus experimentos: Dr. Anderson Assunção Andrade e Dra. Alessandra Barbosa Ferreira Machado, muito obrigada por enriquecerem meu conhecimento com sua sabedoria e pelos exemplos de profissional.

À Aline Beatriz Mahler Pereira, pelas caronas, almoços, conversas e a amizade cultivada desde nossa entrevista de seleção e em todas as disciplinas que cursamos e por sempre estar disposta a me ajudar em qualquer situação.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas e aos professores do programa, pela oportunidade de aprendizado e desenvolvimento profissional. Especialmente ao Prof. Dr. André Luiz Pedrosa que esteve presente em todas as etapas importantes do meu mestrado, desde o processo de seleção até a dissertação. À Elisabete Perez Caramori Ambrosio, secretária do programa, por sua alegria e por sempre nos ajudar em nossas dúvidas e problemas.

Ao pessoal dos Laboratórios de Farmacologia, de Fisiologia e de Imunologia da UFTM, pelo apoio na realização deste trabalho.

À Dra. Kádima Nayara Teixeira e à Dra. Luciene Barbosa, agradeço as belas palavras e o incentivo para seguir a carreira acadêmica nas cartas de recomendação para o mestrado.

À Vanessa Pereira Tolentino e ao Wander Gonzaga Santos por despertarem em mim o amor pela microbiologia, por todos os ensinamentos e contribuição na minha formação profissional.

Ao Eduardo Alves de Magalhães e ao Dôuglas Caixeta Nunes, obrigada pela inestimável companhia em tantos quilômetros rodados nesses anos de idas e vindas à Uberaba.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Regional Antônio Dias (HRAD/FHEMIG), obrigada por possibilitarem que eu me dedicasse a essa empreitada e pelo apoio de sempre.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa e ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano.”

Isaac Newton

RESUMO

Os biofilmes são considerados fator chave na patogênese das infecções enterocócicas. O presente estudo teve como objetivo investigar o impacto dos antimicrobianos na formação de biofilme e na expressão de genes de virulência em isolados de *E. faecalis* resistente à penicilina, susceptível à ampicilina (EFPRAS) e de *E. faecalis* susceptível à penicilina e ampicilina (EFPSAS). Vinte e 21 isolados clínicos de EFPRAS e EFPSAS, respectivamente, foram usados para investigar o efeito de concentrações subinibitórias (sub-MICs) de antimicrobianos na formação de biofilme e 10 isolados foram submetidos ao ensaio RT-qPCR para detectar a expressão gênica de *efaA*, *asal*, *esp* e *ace*. Todos os isolados avaliados, EFPSAS e EFPRAS, apresentaram capacidade de produzir biofilme. A gentamicina não teve nenhum efeito significativo na formação de biofilme, mas aumentou a expressão do *ace* (+136%). A ampicilina e a penicilina diminuíram a produção de biofilme, mas não afetaram significativamente a expressão dos genes de virulência investigados. As expressões de *ace* (+108%) e *asal* (+120%) foram maiores entre os isolados de EFPSAS. Em conclusão, os achados deste estudo mostraram que a capacidade de formação de biofilme foi semelhante entre os isolados de EFPRAS e EFPSAS, embora o padrão de expressão dos genes *ace* e *asal* foi maior entre os isolados de EFPSAS. Foi demonstrado também que o padrão de expressão de genes de virulência associados ao biofilme pode ser alterado pela exposição a antimicrobianos. Além disso, a capacidade de formação de biofilme não foi influenciada pela exposição a sub-MICs de gentamicina em contraste com a ampicilina e penicilina.

Palavras-chave: Enterococos. Biofilme. Genes de virulência. Resistência aos beta-lactâmicos. Resistência à gentamicina. Resistência aos antimicrobianos.

ABSTRACT

Biofilms have been considered a key factor in the pathogenesis of enterococcal infections. The current study aimed to investigate the impact of antimicrobials in both, biofilm formation and expression of virulence genes in penicillin-resistant, ampicillin-susceptible *E. faecalis* (PRASEF) and penicillin- and ampicillin-susceptible *E. faecalis* (PSASEF) isolates. Twenty PRASEF and 21 PSASEF clinical isolates were used to investigate the effect of sub-minimal inhibitory concentrations (sub-MIC) of antimicrobials on biofilm formation and 10 isolates were submitted to the RT-qPCR assay to detect gene expression of *efaA*, *asaI*, *esp* and *ace*. All PSASEF and PRASEF isolates showed capacity to produce biofilm. Gentamicin did not have any significant effect on biofilm formation but increased the *ace* expression (+136%). Ampicillin and penicillin decreased the production of biofilm but did not significantly affect the expression of the virulence genes investigated. The expression of *ace* (+108%) and *asaI* (+120%) were higher among PSASEF isolates. In conclusion, the findings of this study showed that the biofilm formation ability were similar among PRASEF and PSASEF isolates although the expression pattern of *ace* and *asaI* genes was higher among PSASEF isolates and the expression pattern could be changed by exposure to antimicrobials. In addition, the ability of biofilm formation was not influenced by exposure to sub-MIC of gentamicin in contrast to ampicillin and penicillin.

Key words: Enterococci. Biofilm. Virulence genes. Beta-lactams resistance. Gentamicin resistance. Antimicrobial resistance.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AAC – acetiltransferases
- Ace – adesina de colágeno de *E. faecalis*
- AIP – peptídeo autoindutor
- ANT – nucleotidiltransferases
- APH – fosfotransferases
- AS – substância de agregação
- CIM – concentração inibitória mínima
- CLSI – *Clinical & Laboratory Standards Institute*
- CVC – cateter venoso central
- DNA – ácido desoxirribonucleico
- EfaA – antígeno A de superfície de *E. faecalis*
- EFPRAS – *Enterococcus faecalis* penicilina-resistente/ampicilina-sensível
- Esp – proteína de superfície enterocócica
- et al.* – do latim “e outros”
- fsr* – regulador de *E. faecalis*
- GC – guanina-citosina
- IL-1B – interleucina 1 beta
- IPCSL – infecções primárias de corrente de sanguínea confirmadas laboratorialmente
- kb – quilobases
- MLST – tipagem de sequências multilocus
- MSCRAMMs – *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules* / componentes de superfície microbiana que reconhecem moléculas de matriz adesiva
- NaCl – cloreto de sódio
- NF- κ B – fator nuclear kappa B
- p – nível descritivo ou probabilidade de significância
- PBP – proteína de ligação à penicilina
- pH – potencial hidrogeniônico
- PYR – pirrolidonil- β -naftilamida
- RNA – ácido ribonucleico
- TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE SÍMBOLOS

% – por cento, porcentagem

< – menor que

mol% – mol por cento, porcentagem molar

°C – graus Celsius

α – alfa

β – beta

Δ – delta (indica deleção gênica)

SUMÁRIO

1 REVISÃO DA LITERATURA	11
1.1 ENTEROCOCOS	11
1.2 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS	12
1.2.1 Resistência às penicilinas	15
1.2.2 Resistência de alto nível à gentamicina	16
1.3 <i>E. faecalis</i> PENICILINA-RESISTENTE/AMPICILINA-SENSÍVEL.....	17
1.4 BIOFILME	18
1.5 FATORES DE VIRULÊNCIA	20
APÊNDICE A – Artigo submetido.....	30
APÊNDICE B – Comprovante de Submissão do Artigo	62
APÊNDICE C - Lista de participação de coautores	63

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 ENTEROCOCOS

O gênero *Enterococcus* foi descrito primeiramente em artigos publicados na França por Thiercelin em abril e junho de 1899, como um diplococo saprófito do intestino, capaz de tornar-se patógeno. Nesses artigos, o nome “enterococo” foi utilizado pela primeira vez como referência à origem intestinal do micro-organismo (Thiercelin, 1899a, 1899b). Ainda em 1899, MacCallum e Hastings descreveram um caso letal de endocardite aguda em um alemão de 37 anos e propuseram o nome *Micrococcus zymogenes* para o micro-organismo causador, hoje conhecido como *Enterococcus faecalis*. Eles forneceram a primeira descrição detalhada das características patogênicas dessa espécie (MacCallum, Hastings, 1899). Em 1906, o nome *Streptococcus faecalis* foi utilizado por Andrewes e Horder para caracterizar um organismo de origem fecal semelhante ao observado por MacCallum e Hastings (Andrewes, Horder, 1906).

Os enterococos eram considerados estreptococos do grupo D de Lancefield, entretanto, em 1984, através do uso de técnicas de hibridização e sequenciamento de RNA ribossomal 16S, foi estabelecido que as espécies *S. faecalis* e *S. faecium* eram suficientemente distintas de outros estreptococos e por isso foram transferidas para um novo gênero – *Enterococcus* – e renomeadas como *E. faecalis* e *E. faecium* respectivamente (Schleifer, Kilpper-Bälz, 1984). Atualmente o gênero possui 60 espécies (LSPN, 2021).

Enterococos são cocos Gram positivos que ocorrem isoladamente, aos pares ou em cadeias curtas. São anaeróbios facultativos e a temperatura de crescimento ótimo é cerca de 35°C, sendo a temperatura mínima de 10°C e a máxima de 45°C. Além disso, têm como característica o fato de muitas linhagens sobreviverem ao aquecimento a 60°C por 30 minutos. Crescem em meios contendo cloreto de sódio (NaCl) a 6,5% e em pH elevado (9,6). Têm capacidade de hidrolizar pirrolidonil-β-naftilamida (PYR) e possuem metabolismo fermentativo. O produto final da fermentação da glicose é predominantemente o ácido L-lático. Geralmente são catalase negativos, mas algumas linhagens podem produzir pseudocatalase. O conteúdo de GC do DNA varia entre 37 e 45 mol% (Schleifer, Kilpper-Bälz, 1984).

Eles hidrolizam esculina na presença de 40% de sais biliares (Facklam, 1973) e crescem em meios não seletivos tais como ágar sangue e ágar chocolate. Após 24 horas de

incubação, as colônias em ágar sangue são grandes e podem ser não hemolíticas, α -hemolíticas ou, raramente, β -hemolíticas (Murray, Rosenthal, Pfaller, 2015).

A ampla capacidade de colonização dos enterococos deve-se, pelo menos em parte, à versatilidade metabólica e resistência intrínseca a condições inóspitas. Apesar de não serem capazes de formar esporos, os enterococos são altamente tolerantes à dessecação e podem persistir por meses em superfícies secas. Eles também toleram extremos de pH, radiação ionizante, tensões osmóticas e oxidativas, concentrações elevadas de metais pesados e antimicrobianos (Ramsey, Hartke, Huycke, 2014).

Os enterococos eram considerados organismos comensais de pouca importância clínica, mas emergiram como sérios patógenos nosocomiais responsáveis por endocardite e infecções do trato urinário e de corrente sanguínea, meningite, infecções de feridas e do trato biliar, entre outros (Murray, 1990). Os enterococos têm se tornado uma das principais causas de infecções relacionadas à assistência à saúde. Nos Estados Unidos, a espécie *E. faecalis* é a terceira maior causa de infecção de corrente sanguínea associada ao uso de cateter venoso central (CVC) e quinta causa de infecção de trato urinário associado ao cateterismo (Weiner *et al.*, 2016). Na Europa, as espécies *E. faecalis* e *E. faecium* são a quarta e quinta maiores causas de bacteremia, respectivamente (de Kraker *et al.*, 2013).

No Brasil, em 2016, espécies do gênero *Enterococcus* causaram 6% das infecções primárias de corrente de sanguínea (IPCSL) associadas ao uso de CVC, confirmadas laboratorialmente em pacientes adultos hospitalizados em unidades de tratamento intensivo, ocupando assim a sétima posição entre as principais causas deste tipo de infecção. Destas, 56,5% foram causadas pela espécie *E. faecalis* e 19,5% pela espécie *E. faecium* (Brasil, 2017). No ano anterior, o gênero *Enterococcus* foi responsável por 5,4% destas infecções (oitava principal causa), sendo que 49% foram causadas pela espécie *E. faecalis* e 20% pela espécie *E. faecium* (Brasil, 2016).

1.2 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

A importância clínica do gênero *Enterococcus* está diretamente relacionada à resistência aos antimicrobianos, que contribui para um maior risco de colonização e infecção. No geral, as características de resistência dos enterococos podem ser divididas em resistência intrínseca, resistência adquirida e tolerância (Kristich, Rice, Arias, 2014).

A resistência intrínseca é definida como resistência aos antimicrobianos inerente ou inata (não adquirida) que se reflete em padrões antimicrobianos de tipo selvagem de todos ou quase todos os representantes de uma espécie. A espécie *E. faecalis*, por exemplo, é intrinsecamente resistente às cefalosporinas, aminoglicosídeos (baixo nível), clindamicina, sulfametoxazol/trimetoprim, trimetoprim, ácido fusídico, quinupristina/dalfopristina, aztreonam, polimixina B e ácido nalidíxico (CLSI, 2017).

A resistência intrínseca aos aminoglicosídeos é manifestada pela falta de atividade bactericida e parece ser mediada por dois fatores principais: a má absorção do antimicrobiano que requer concentrações mais elevadas para promover a entrada no espaço intracelular e a inativação por modificação covalente dos grupos hidroxila ou amino da molécula de aminoglicosídeo, feita por enzimas enterocócicas de ocorrência natural, criando um impedimento estérico e diminuindo a ligação ao alvo ribossomal (Miller, Munita, Arias, 2014).

Quanto às cefalosporinas, a resistência é associada a uma diminuição da afinidade de ligação das cefalosporinas com as proteínas de ligação à penicilina (PBPs, do inglês *Penicillin Binding Proteins*) enterocócicas, especificamente Pbp5. As PBPs podem ser divididas em: classe A, que são enzimas bifuncionais que possuem atividade D,D-transpeptidase e transglicosilase; e classe B, que possuem apenas o domínio da transpeptidase e dependem da atividade de transglicosilase de outras enzimas (Miller, Munita, Arias, 2014). Em *E. faecalis*, a resistência às cefalosporinas requer igualmente uma cooperação entre Pbp5 de classe B de baixa afinidade e pelo menos uma (PonA ou PbpF) das três PBPs de classe A (PonA, PbpF e PbpZ) produzidas por esta espécie (Arbeloa *et al.* 2004; Rice *et al.*, 2009). Estudos realizados por Arbeloa *et al.* (2004) mostraram que a deleção do gene *pbp5* leva à redução em 4000 vezes da concentração inibitória mínima (CIM) de ceftriaxona em *E. faecalis* JH2-2 (resistentes à rifampicina e ácido fusídico) e em 4 vezes da CIM de ampicilina.

A resistência intrínseca à clindamicina é mediada pelo produto do gene *lsa*, embora o mecanismo ainda não tenha sido bem definido (Kristich, Rice, Arias, 2014). O sulfametoxazol/trimetoprim parece ser ativo contra enterococos quando testado *in vitro* em meio deficiente em folato, mas falha em modelos animais, presumivelmente porque enterococos podem absorver folato do ambiente (Zervos, Schaberg, 1985; Kristich, Rice, Arias, 2014).

A tolerância aos antimicrobianos implica que as bactérias podem ser inibidas por concentrações clinicamente realizáveis, mas só serão mortas por concentrações muito superiores à CIM do antimicrobiano. Os enterococos são tolerantes à atividade normalmente

bactericida de antimicrobianos com atividade na parede celular, tais como β -lactâmicos e vancomicina, entretanto essa tolerância pode ser superada pela combinação desses agentes com um aminoglicosídeo (Kristich, Rice, Arias, 2014).

Estudos realizados na década de 1970 (Moellering Jr, Weinberg, 1971; Zimmermann, Moellering Jr, Weinberg, 1971) forneceram evidências de que a associação de um β -lactâmico ou glicopeptídeo com um aminoglicosídeo produz um efeito bactericida sinérgico contra os enterococos. A base para o sinergismo parece estar relacionada com o aumento na captação da molécula de aminoglicosídeo pela bactéria quando a parede celular é alterada (Arias, Contreras, Murray, 2008).

Além da resistência intrínseca e da tolerância, os enterococos têm sido extraordinariamente bem sucedidos em adquirir rapidamente resistência a virtualmente qualquer agente antimicrobiano colocado em uso clínico. A introdução do cloranfenicol, da eritromicina e da tetraciclina, por exemplo, foi rapidamente seguida por resistência a esses antimicrobianos, atingindo em alguns casos uma prevalência que impediu seu uso empírico. Já é possível notar uma ampla e elevada resistência à ampicilina entre os isolados clínicos de *E. faecium* e uma ocorrência crescente, embora ainda pequena, de resistência à ampicilina em *E. faecalis*. A resistência de alto nível aos aminoglicosídeos, que impede o sinergismo entre agentes ativos de parede celular e aminoglicosídeos, também tem sido reconhecida há várias décadas. A resistência à vancomicina é amplamente prevalente em *E. faecium*, embora permaneça relativamente rara em *E. faecalis* (Kristich, Rice, Arias, 2014).

A resistência adquirida nos enterococos pode ocorrer através de mutações esporádicas ou através da aquisição de material genético. A troca horizontal de genes entre os enterococos ocorre através da transferência de plasmídeos ou através do movimento de *transposons*. Com poucas exceções, vários plasmídeos e *transposons* podem ser identificados em isolados clínicos. Estes elementos podem interagir uns com os outros e com o cromossomo bacteriano para formar elementos móveis (Hollenbeck, Rice, 2012).

Em resposta ao crescente problema de resistência nos enterococos, a indústria farmacêutica desenvolveu uma série de novos agentes que têm atividade contra os enterococos resistentes à vancomicina. No entanto, nenhum destes agentes recentemente licenciados (quinupristina/dalfopristina, linezolida, daptomicina e tigeciclina) foi totalmente livre de resistência (Kristich, Rice, Arias, 2014). A resistência à linezolida, por exemplo, está aumentando de forma constante, e a quinupristina/dalfopristina não é ativa contra *E. faecalis* (Murray, Rosenthal, Pfaller, 2015).

A redução cuidadosa do uso de antimicrobianos e a implantação de práticas apropriadas de controle de infecção, como o isolamento de pacientes infectados e o uso de avental e luvas por qualquer pessoa em contato com pacientes, podem reduzir o risco de colonização, mas a eliminação completa é improvável (Murray, Rosenthal, Pfaller, 2015).

A ampla resistência dos enterococos tem tido um impacto substancial sobre o uso de antimicrobianos empíricos e definitivos para o tratamento de infecções enterocócicas, uma situação que deve persistir no futuro (Kristich, Rice, Arias, 2014).

1.2.1 Resistência às penicilinas

O composto básico das penicilinas é um ácido orgânico com um anel β -lactâmico obtido a partir da cultura do fungo *Penicillium chrysogenum* (Murray, Rosenthal, Pfaller, 2015), anteriormente denominado *P. notatum* (Samson, Hadlok, Stolk, 1977). A ampicilina e a penicilina são os antimicrobianos β -lactâmicos mais ativos contra os enterococos. Eles inibem a síntese de peptidoglicano, que é a estrutura básica da parede celular bacteriana e um componente crítico necessário para a viabilidade bacteriana (Miller, Munita, Arias, 2014).

A construção das cadeias de peptidoglicano e suas ligações cruzadas é catalisada por PBPs (Murray, Rosenthal, Pfaller, 2015). Quando as bactérias em crescimento são expostas aos β -lactâmicos, o antimicrobiano liga-se às PBPs específicas na parede celular bacteriana e inibe a montagem das cadeias de peptidoglicano. Isto, por sua vez, ativa autolisinas que degradam a parede celular, resultando na morte de células bacterianas (Murray, Rosenthal, Pfaller, 2015).

Os enterococos podem apresentar resistência aumentada às penicilinas através da aquisição de β -lactamases ou mutações de PBP4/5. Os genes *bla*, que codificam β -lactamases, são mediados por plasmídeos e foram descritos pela primeira vez em *E. faecalis* em 1983. Desde então, a produção de β -lactamase enterocócica tem sido rara e descrita predominantemente em *E. faecalis* (Hollenbeck, Rice, 2012).

Em alguns casos, a presença de β -lactamase em isolados de infecção por *E. faecalis* pode comprometer a eficácia clínica da ampicilina ou da penicilina (Arias *et. al.*, 2007). Por isso, o *Clinical & Laboratory Standards Institute* - CLSI recomenda, para detecção de β -lactamase, o teste com discos de cefinase em contextos clínicos específicos, como endocardite (CLSI, 2015). Nestes casos, o tratamento com uma combinação de ampicilina com um inibidor de β -lactamase, como o sulbactam, deve ser eficaz.

Uma variedade de mutações pontuais tem sido descritas tanto em *E. faecium* como em *E. faecalis*. Embora essas mutações provavelmente tenham se originado em bactérias sob pressão seletiva de antimicrobianos, a transferência de genes *pbp5* de baixa afinidade tem sido documentada *in vitro* e provavelmente contribuiu para a disseminação de resistência à penicilina em alto nível (Hollenbeck, Rice, 2012).

Apesar da susceptibilidade reduzida de muitas linhagens à penicilina e ampicilina como resultado da expressão de PBPs de baixa afinidade, o nível de resistência à ampicilina não exclui sua utilização clínica. Assim, a ampicilina continua a ser o tratamento de escolha para infecções enterocócicas que carecem de outros mecanismos de resistência de alto nível (Kristich, Rice, Arias, 2014).

1.2.2 Resistência de alto nível à gentamicina

Os aminoglicosídeos consistem em açúcares amino ligados por ligações glicosídicas a um anel aminociclitol, que agem através da inibição da síntese proteica. A gentamicina é um exemplo de aminoglicosídeo isolado de espécies de *Micromonospora*. Ela atravessa a parede celular e a membrana citoplasmática até o citoplasma, onde inibe a síntese de proteínas bacterianas por ligação irreversível às proteínas ribossômicas da subunidade 30S (Murray, Rosenthal, Pfaller, 2015).

A resistência de alto nível aos aminoglicosídeos é conferida por um mecanismo que suprime a atividade bactericida sinérgica dos aminoglicosídeos em combinação com agentes ativos de parede celular. Esse tipo de resistência é geralmente adquirido através de um elemento móvel que codifica uma enzima modificadora de aminoglicosídeo. Tais enzimas podem ser fosfotransferases (APH), acetiltransferases (AAC) ou nucleotidiltransferases (ANT) (Kak *et al.*, 2000; Kristich, Rice, Arias, 2014).

A resistência de alto nível à gentamicina deve-se principalmente a uma enzima modificadora bifuncional AAC(6')-Ie/APH(2')-Ia que possui ambas as atividades de 6'-acetiltransferase e 2'-fosfotransferase e confere resistência a todos os aminoglicosídeos, exceto estreptomicina (Courvalin, Carlier, Collatz, 1980; Miller, Munita, Arias, 2014). Outro gene adquirido, APH(2')-Ic, originalmente isolado de *E. gallinarum*, codifica as fosfotransferases e pode afetar a atividade da gentamicina também em *E. faecalis* e *E. faecium* (Chow *et al.*, 1997; Miller, Munita, Arias, 2014). É de suma importância a detecção da presença de resistência de alto nível aos aminoglicosídeos, uma vez que ela elimina o efeito sinérgico com β -lactâmicos (Kristich, Rice, Arias, 2014).

1.3 *E. faecalis* PENICILINA-RESISTENTE/AMPICILINA-SENSÍVEL

Em 2005, pesquisadores da Grécia relataram um novo fenótipo de resistência em amostras de *E. faecalis* obtidas entre setembro de 2003 e dezembro de 2004 em um hospital daquele país. Observou-se que 31,4% dessas amostras eram resistentes à penicilina e ao imipenem, mas sensíveis à ampicilina (Metzidie *et al.*, 2005). Em 2001, pesquisadores da Suécia haviam relatado esse mesmo fenótipo para amostras de *E. faecium* (El-Amin *et al.*, 2001).

Posteriormente, foi relatado um surto de infecção da corrente sanguínea por amostras de *E. faecalis* com esse fenótipo de resistência em hospitais da Dinamarca. Neste estudo, foi observado que a maioria (85%) das amostras de *E. faecalis* penicilina-resistente/ampicilina-sensível (EFPRAS) também era resistente à gentamicina, o que indica que essas amostras tendem a apresentar resistência a antimicrobianos de outras classes, além dos β -lactâmicos (Guardabassi *et al.*, 2010).

Apesar da escassez de artigos publicados, é possível perceber a presença de amostras de *E. faecalis* com esse fenótipo de resistência incomum em alguns estudos que testaram a sensibilidade às duas penicilinas (ampicilina e penicilina G), embora os autores não tenham discutido esse achado. Titze-de-Almeida *et al.* (2004) relataram que 11,8% das amostras de *E. faecalis* isoladas em dois hospitais de Brasília apresentaram resistência à ampicilina e 27,6% à penicilina. Em outro estudo também foi detectada uma taxa de resistência à penicilina (38,5%) maior que a da ampicilina (3,8%) entre amostras de *E. faecalis* isoladas em vários países da América Latina (Sader *et al.*, 2004).

No Brasil, esse fenótipo incomum de resistência aos de β -lactâmicos, foi primeiramente relatado em resultados parciais apresentados no XXIV Congresso Brasileiro de Microbiologia (Conceição *et al.*, 2007) e publicados em 2011 (Conceição *et al.*, 2011). Posteriormente, Conceição e colaboradores (2012) demonstraram que as amostras de EFPRAS não produzem β -lactamases e apresentam valores de CIM para β -lactâmicos mais elevados, inclusive para a ampicilina, se comparados com aqueles obtidos para as amostras sensíveis à penicilina G. As amostras de EFPRAS do Brasil também tendem a apresentar resistência a antimicrobianos de outras classes quando comparadas com as amostras penicilina-sensível/ampicilina-sensível (Conceição *et al.*, 2008; Conceição, Peixoto, Oliveira, 2012).

Cabe ainda ressaltar que a maioria dessas amostras de *E. faecalis* penicilina-resistente isoladas de pacientes hospitalizados no Brasil são simultaneamente resistentes à gentamicina, semelhantemente ao observado entre as amostras da Dinamarca (Guardabassi *et al.*, 2010; Conceição *et al.*, 2012), mas não são geneticamente semelhantes às da Dinamarca, conforme dados obtidos por Conceição *et al.* (2014) utilizando-se a técnica de tipagem de sequências multilocus (MLST).

1.4 BIOFILME

Biofilme pode ser definido como uma comunidade de micro-organismos sésseis ligados à superfície, que estão incorporados e crescem numa matriz autoproduzida de substâncias poliméricas extracelulares. Esses biofilmes podem ser encontrados em ambientes médicos, industriais e naturais, e também podem ser projetados *in vitro* para várias aplicações biotecnológicas (Srivastava, Bhargava, 2016).

A produção de biofilme requer um número suficiente de bactérias (*quorum*) (Murray, Rosenthal, Pfaller, 2015). A detecção do quórum (*quorum sensing*) ocorre quando uma população bacteriana produz um sinal através de um peptídeo autoindutor (AIP). O AIP se acumula no ambiente por expressão aumentada do sinal de comunicação ou por aumento do número de células que produzem o sinal. Uma vez que o AIP atinge uma concentração limiar, ele interage com um receptor de superfície celular ou entra na célula e provoca uma cascata de regulação transcricional. O locus *fsr* contém os genes *fsrA*, *fsrB* e *fsrC*, reguladores de quórum (Fisher, Phillips, 2009). Foi demonstrado que em *E. faecalis*, quando mutações em *fsrA*, *fsrB* e *fsrC* estão presentes, ocorre uma redução de 28 a 32% na formação de biofilme (Mohamed *et al.*, 2004).

O biofilme é caracterizado por alto grau de interação entre diferentes organismos imobilizados que permite a formação de agregados estáveis nos quais podem se desenvolver efeitos sinérgicos. A cooperação entre bactérias inclui expressão coordenada de genes, diferenciação regulada de células e divisão de tarefas. A colônia comporta-se como uma comunidade social com elevada complexidade e plasticidade, o que proporciona uma melhor adaptabilidade a quaisquer condições de crescimento que possam ser encontradas (Srivastava, Bhargava, 2016).

Os biofilmes desempenham um papel significativo na transmissão e persistência de microrganismos que causam doenças em seres humanos, especialmente doenças associadas a

superfícies inertes, incluindo dispositivos médicos para uso interno ou externo. Infecções por biofilmes são difíceis de erradicar devido à sua melhor proteção contra macrófagos e antimicrobianos, em comparação com células vivas livres, levando a graves complicações clínicas, muitas vezes com resultado letal (Srivastava, Bhargava, 2016).

Holmberg e Rasmussen (2016), num estudo sueco, compararam a sensibilidade aos antimicrobianos em biofilmes novos de *E. faecalis* e *E. faecium* (estabelecidos durante 24 horas) e maduros (estabelecidos durante 120 horas) e concluíram que os biofilmes maduros continham mais bactérias e eram altamente resistentes aos antimicrobianos.

Os enterococos tem uma extraordinária capacidade de formar biofilmes, e essa característica é fortemente relatada em condições específicas como infecções do trato urinário. Em um estudo brasileiro, a habilidade de formar biofilmes foi observada em 81,25% dos isolados clínicos de *Enterococcus* spp., sendo 75,4% classificados como aderência forte ou moderada (Soares *et al.*, 2014).

A formação de biofilme em enterococos é complexa e multifatorial, envolvendo diversos fatores de virulência (Soares *et al.*, 2014). Pouco se sabe ainda sobre a influência de fatores ambientais, como o uso de antimicrobianos sobre a formação de biofilmes e expressão de fatores de virulência. Maestre *et al.* (2012) avaliaram a interferência de concentrações subinibitórias de tigeciclina no desenvolvimento de biofilme em isolados de *E. faecalis* e observaram formação significativamente menor de biofilme em 20 das 50 amostras testadas com tigeciclina.

Por sua vez, Haddadin *et al.* (2010), em estudo realizado com amostras de *Staphylococcus aureus* concluíram que concentrações subinibitórias de ciprofloxacino, roxitromicina ou de cefalexina não eram capazes de inibir nem estimular a produção de biofilme, mas podiam aumentar a produção de alguns fatores de virulência ou regular a síntese e expressão de outros. Também utilizando *S. aureus*, Jo e Ahn (2016) relataram diminuição do número de células formadoras de biofilme na presença de metade da CIM de oxacilina e levofloxacino.

Na Turquia, um estudo avaliou o efeito de alguns antimicrobianos na formação de biofilme em isolados de *Enterococcus faecium* e mostrou que concentrações subinibitórias de cloranfenicol, ampicilina ou gentamicina não induziram a formação de biofilme, diferentemente de concentrações subinibitórias de kanamicina, eritromicina, vancomicina ou estreptomicina, que foram capazes de induzir a formação de biofilme. Além disso, concentrações subinibitórias de estreptomicina, vancomicina ou eritromicina aumentaram a expressão do gene *esp* no isolado analisado por RT-qPCR (Yuksel, Karatug, Akcelik, 2017).

Kafil *et al.* (2016) avaliaram o efeito de alguns antimicrobianos em concentrações subinibitórias sobre a formação de biofilme em amostras clínicas de *E. faecalis* e observaram que gentamicina foi capaz de induzir a formação de biofilme em 89% dos isolados, bem como aumentar a expressão dos genes *esp* e *efaA*, associados à virulência dos micro-organismos, por outro lado reduziu a expressão de *asal* e *ace*.

A pesquisa com biofilmes enterocócicos é impulsionada por seu potencial de produzir novas perspectivas sobre a patogênese de infecções oportunistas, seu tratamento e sua prevenção. Embora tenha sido feito um grande progresso na identificação de fatores determinantes do biofilme, ainda não há uma lista abrangente. Ainda não sabemos o verdadeiro impacto do crescimento de biofilme na expressão e transferência da resistência aos antimicrobianos. Novas estratégias para o desenvolvimento de antimicrobianos são necessárias para superar o rápido aumento da resistência aos antimicrobianos atualmente disponíveis (Dunny, Hancock, Shankar, 2014).

1.5 FATORES DE VIRULÊNCIA

A mudança de comensal para patógeno em *E. faecalis*, embora ajudada pela vantagem seletiva proporcionada pela resistência aos antimicrobianos, depende de fatores de virulência. Fatores de virulência são componentes relacionados à patogenicidade e ao aumento do risco de aquisição de infecções enterocócicas por meio da mediação de adesão, colonização e invasão nos tecidos hospedeiros, modulação da imunidade do hospedeiro e produção extracelular de enzimas e toxinas (Strateva *et al.*, 2016; Medeiros *et al.*, 2014; Miller *et al.*, 2016).

Muitos fatores determinam a virulência das espécies de enterococos, por exemplo: capacidade de colonizar o trato gastrointestinal; capacidade para aderir a uma gama de proteínas da matriz extracelular; e capacidade de aderir ao epitélio do trato urinário, epitélio da cavidade oral e células embrionárias do rim humano (Franz, Holzappel, Stiles, 1999). Embora os enterococos não possuam um repertório robusto de toxinas pró-inflamatórias secretadas, como as produzidas por outros cocos Gram positivos, eles possuem alguns fatores de virulência para ajudá-los a aderir aos tecidos e formar biofilmes (Miller *et al.*, 2016; Arias, Murray, 2013).

Na espécie *E. faecalis*, a expressão desses fatores é regulada por genes de virulência presentes no genoma em regiões denominadas ilhas de patogenicidade (Hacker, Kaper, 2000),

cuja presença está associada a amostras clínicas causadoras de infecções nosocomiais (Huycke, Spiegel, Gilmore, 1991). Ilhas de patogenicidade são segmentos de DNA, inseridos no genoma bacteriano e transmitidos horizontalmente, que contêm genes envolvidos na patogênese, resistência e outros tipos de adaptações clinicamente relevantes. A ilha de patogenicidade de *E. faecalis* tem aproximadamente 150 kb e codifica múltiplos fatores que contribuem para a sua virulência, incluindo a toxina citolisina e a proteína de superfície enterocócica (McBride *et al.*, 2009). Diferenças genéticas entre os enterococos derivados de comensais e os patogênicos sugerem a contribuição desses fatores para a sobrevivência enterocócica no hospital, no processo de transmissão do patógeno e na patogênese (Giridhara Upadhyaya, Ravikumar, Umapathy, 2009).

Substância de agregação (AS) são proteínas de superfície de uma família de adesinas codificadas por plasmídeos que medeiam a adesão do micro-organismo às células hospedeiras e às moléculas da matriz extracelular e promovem a formação de aglomerados, a formação de biofilmes e a transferência de alta frequência de plasmídios durante a conjugação bacteriana (Chuang-Smith *et al.*, 2010; Miller *et al.* 2016). A expressão de AS na superfície de linhagens de *E. faecalis* pode contribuir para a patogênese. A substância de agregação pode causar um aumento de mais de cinco vezes na aderência enterocócica a macrófagos e um aumento de mais de sete vezes na fagocitose. Estas linhagens portadoras de AS são então, significativamente mais resistentes à morte intracelular, provavelmente devido à inibição da explosão respiratória (Süßmuth *et al.*, 2000). O gene *asa1* é um dos responsáveis pela expressão de AS (Anderson *et al.*, 2016).

A proteína de superfície enterocócica (Esp), codificada pelo gene *esp*, é uma proteína associada à parede celular, descrita pela primeira vez em *E. faecalis* por Shankar *et al.* (1999). O gene *esp* encontra-se dentro de uma ilha de patogenicidade que parece estar associada com isolados adquiridos no hospital (Heikens, Bonten, Willems, 2007; Miller *et al.* 2016). Um estudo realizado com 57 amostras patogênicas de *E. faecalis* em Porto Alegre-RS identificou a presença do gene *esp* em 68,4% dos isolados, em contrapartida, nenhuma das 55 amostras de *E. faecalis* obtidas de alimentos continha esse gene (Medeiros *et al.*, 2014). Esp parece promover a adesão, colonização e evasão do sistema imunológico e desempenhar algum papel na resistência aos antimicrobianos, bem como contribuir para a formação de biofilme, que levaria à resistência ao estresse ambiental e adesão a células eucarióticas, como as do trato urinário (Fisher, Phillips, 2009).

Estudos têm demonstrado que a deleção do gene *esp* afeta a capacidade de *E. faecalis* formar biofilmes. Linhagens de *E. faecalis* Esp-negativas, após receberem transferência do

plasmídeo do gene *esp*, foram capazes de produzir biofilmes (Latasa *et al.*, 2006). Kafil e Mobarez (2015) examinaram a relação do gene *esp* em enterococos com a resistência aos antimicrobianos de isolados da infecção do trato urinário. Tal estudo revelou alta frequência do gene *esp* em *E. faecalis* isolados de infecção do trato urinário (77,9%) e correlação significativa entre a presença de *esp* e a resistência aos antimicrobianos ampicilina, cloranfenicol e tetraciclina ($p < 0,001$, $p < 0,001$, $p < 0,001$) em *E. faecalis*.

Zou e Shankar (2016), num estudo que utilizou uma linhagem de *E. faecalis* que expressava Esp e uma linhagem isogênica Esp-deficiente, mostraram que Esp é suficiente para a ativação de NF- κ B e a subsequente produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α em macrófagos *in vitro*. Usando um modelo de peritonite em camundongos, os autores observaram que a infiltração de neutrófilos e lesão tecidual no fígado foi maior nos camundongos infectados com a linhagem que expressava Esp, em comparação com os camundongos infectados com a linhagem mutante Esp-deficiente e concluíram que Esp podia ser adicionada à crescente lista de fatores de virulência enterocócicos por modular a inflamação durante a infecção e ter implicações para a patogênese enterocócica.

Outra proteína da superfície celular presente em *E. faecalis* é Ace (adesina de colágeno de *E. faecalis*). Esta é uma proteína de ligação ao colágeno, pertencente à família de proteínas superficiais bacterianas, conhecida como MSCRAMMs (do inglês, “*Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*”) - componentes de superfície microbiana que reconhecem moléculas de matriz adesiva (Rich *et al.*, 1999). Ace medeia a associação de bactérias às proteínas da matriz de células hospedeiras, tais como colágeno I e IV e laminina (Nallapareddy *et al.*, 2000) e é expressa condicionalmente após crescimento em soro ou na presença de colágeno (Singh *et al.*, 2010). A expressão de *ace* por *E. faecalis* é aumentada por estímulos ambientais, tais como a presença de soro, sais biliares, urina e alta temperatura (46°C) (Cohen *et al.*, 2013).

Em diferentes modelos experimentais, as linhagens mutantes que não expressavam *ace* (Δace) foram claramente atenuadas, sugerindo que Ace é um importante fator de virulência. Singh *et al.* (2010) demonstraram a importância de Ace para a patogênese de *E. faecalis* na endocardite, mostrando que a deleção do gene *ace* leva a uma atenuação significativa da endocardite experimental em rato, mas não foi observada diferença significativa num modelo de peritonite. Lebreton *et al.* (2009) demonstraram que a deleção de *ace* diminuiu a virulência de *E. faecalis*. Para isso, eles compararam a capacidades das linhagens selvagem (*wild-type*) e mutante *ace* (Δace) de matar as larvas de *Galleria mellonella* em experimentos de infecção. A taxa de morte foi significativamente menor em

larvas infectadas com a linhagem mutante *ace* que nas infectadas com o tipo selvagem. Após 24 horas de infecção, menos de 10% das larvas infectadas com o tipo selvagem ainda estavam vivas, enquanto que 80% dos animais infectados com a linhagem mutante tinham sobrevivido. Medeiros *et al.* (2014), em um estudo com diferentes amostras clínicas humanas coletadas no sul do Brasil, observaram associação positiva entre a forte capacidade de formação de biofilmes e a presença de *ace* em isolados clínicos ($p < 0,05$).

EfaA é um importante antígeno de superfície de *E. faecalis* e foi identificado em soro de pacientes com endocardite. O gene *efaA* é o terceiro gene do *operon efaBCA*, que codifica componentes de um transportador do tipo ABC, sendo EfaA o componente lipoproteico de ligação ao substrato (Garsin *et al.*, 2014). Singh *et al.* (1998) evidenciaram a importância de *efaA* na infecção por *E. faecalis* ao mostrarem que camundongos infectados com um mutante isogênico de *efaA* de *E. faecalis* OG1RF tinham uma sobrevivência significativamente prolongada em comparação com os infectados com a linhagem selvagem em um modelo experimental de peritonite.

REFERÊNCIAS

- Anderson AC, Jonas D, Huber I, Karygianni L, Wölber J, Hellwig E, Arweiler N, Vach K, Wittmer A, Al-Ahmad A. *Enterococcus faecalis* from Food, Clinical Specimens, and Oral Sites: Prevalence of Virulence Factors in Association with Biofilm Formation. *Front Microbiol.* 2016 Jan 11;6:1534.
- Andrewes FW, Horder TJ. A study of streptococci pathogenic for man. *The Lancet.* 1906;168(4335):852-855.
- Arbeloa A, Segal H, Hugonnet JE, Josseaume N, Dubost L, Brouard JP, Gutmann L, Mengin-Lecreulx D, Arthur M. Role of class A penicillin-binding proteins in PBP5-mediated beta-lactam resistance in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol.* 2004 Mar;186:1221-1228.
- Arias CA, Contreras GA, Murray BE. Emergence and management of drug-resistant enterococcal infections. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2008 Oct;6(5):637-655.
- Arias CA, Murray BE. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2013 Mar 16;10(4):266-278.
- Arias CA, Singh KV, Panesso D, Murray BE. Time-kill and synergism studies of cefobiprole against *Enterococcus faecalis*, including beta-lactamase-producing and vancomycin-resistant isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Jun;51(6):2043-2047.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº14: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência Microbiana do ano de 2015. 2016 Dec 30;14.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 16: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2016. 2017 Dec 29;12.
- Chow JW, Zervos MJ, Lerner SA, Thal LA, Donabedian SM, Jaworski DD, Tsai S, Shaw KJ, Clewell DB. A novel gentamicin resistance gene in *Enterococcus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997 Mar;41(3):511-514.
- Chuang-Smith O, Wells C, Henry-Stanley M, Dunny GM. Acceleration of *Enterococcus faecalis* biofilm formation by aggregation substance expression in an *ex vivo* model of cardiac valve colonization. *PLoS One* 2010 Dec 40;5(12):e15798.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard Twelfth Edition. CLSI document M02-A12. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015. 96p.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-seventh Edition. Informational Supplement. CLSI document M100-S27. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017. 253p.

- Cohen AL, Roh JH, Nallapareddy SR, Höök M, Murray BE. Expression of the collagen adhesion ace by *Enterococcus faecalis* strain OG1RF is not repressed by Ers but requires the Ers box. *FEMS Microbiol Lett.* 2013 Jul;344(1):18-24.
- Conceição N, Oliveira CCHB, Silva LEP, Souza LRC, Oliveira AG. Ampicillin susceptibility can predict in vitro susceptibility of penicillin-resistant ampicillin-susceptible *Enterococcus faecalis* isolates to amoxicillin but not to imipenem and piperacillin. *J Clin Microbiol.* 2012 Nov;50(11):3729-31.
- Conceição N, Oliveira CCHB, Silva PR, Ávila BGM, Oliveira AG. Trends in antimicrobial resistance among clinical isolates of enterococci in a Brazilian tertiary hospital: a 4-year study. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011 Mar-Apr;44(2):177-181.
- Conceição N, Peixoto PB, Oliveira AG. Comparação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de amostras de *Enterococcus faecalis* penicilina-resistente/ampicilina sensível e penicilina-sensível/ampicilina-sensível. In: XIII Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar, 2012, Santos. *J Infect Control.* 2012;1:99 (resumo 208).
- Conceição N, Silva LE, Darini AL, Pitondo-Silva A, Oliveira AG. Penicillin-resistant, ampicillin-susceptible *Enterococcus faecalis* of hospital origin: pbp4 gene polymorphism and genetic diversity. *Infect Genet Evol.* 2014 Dec;28:289-95.
- Conceição N, Silva PR, Oliveira CCHB, Oliveira AG. Detecção de sensibilidade a beta-lactâmicos por testes fenotípicos em amostras de *Enterococcus* isoladas de pacientes hospitalizados. 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia. Em: Sessões Científicas, p. 107, 2007.
- Conceicao N, Teixeira MM, Oliveira CCHB, Melo BG, Oliveira AG. Incidência de *Enterococcus* com alto nível de resistência aos aminoglicosídeos em um hospital universitário. In: XI Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar, 2008, Rio de Janeiro. *Braz J Infec Dis.* 2008;12:12-12.
- Courvalin P, Carlier C, Collatz E. Plasmid-mediated resistance to aminocyclitol antibiotics in group D streptococci. *J Bacteriol.* 1980 Aug;143(2):541-51.
- de-Kraker MEA, Jarlier V, Monem JCM, Heuer OE, Van-De-Sande N, Grundmann H. The changing epidemiology of bacteraemias in Europe: trends from the European Antimicrobial Resistance Surveillance System. *Clin Microbiol Infect.* 2013 Sep;19(9):860-868.
- Dunny GM, Hancock LE, Shankar N. Enterococcal Biofilm Structure and Role in Colonization and Disease. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, editores. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection.* Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014. p.547-580.
- El Amin N, Lund B, Tjernlund A, Lundberg C, Jalakas K, Wretling B. Mechanisms of resistance to imipenem in imipenem-resistant, ampicillin-sensitive *Enterococcus faecium*. *APMIS.* 2001 Nov;109(11):791-796.

Facklam RR. Comparison of several laboratory media for presumptive identification of enterococci and group D streptococci. *J Appl Microbiol.* 1973 Aug;26(2):138-145.

Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology.* 2009 Jun;155(Pt 6):1749-1757.

Franz CMAP, Holzapfel WH, Stiles ME. Enterococci at the crossroads of food safety? *Int J Food Microbiol.* 1999 Mar 1;47(1-2):1-24.

Garsin DA, Frank KL, Silanpää J, Ausubel FM, Hartke A, Shankar N, Murray BE. Pathogenesis and Models of Enterococcal Infection. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, editores. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection.* Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014. p.185-258.

Giridhara Upadhyaya PM, Ravikumar KL, Umapathy BL. Review of Virulence Factors of *Enterococcus*: An Emerging Nosocomial Pathogen. *Indian J Med Microbiol.* 2009 Oct-Dec;27(4):301-5.

Guardabassi L, Larsen J, Skov R, Schonheyder HC. Gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* sequence type 6 with reduced penicillin susceptibility: diagnostic and therapeutic implications. *J Clin Microbiol.* 2010 Oct;48(10):3820-3821.

Hacker J, Kaper JB. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* 2000;54:641-79.

Haddadin RNS, Saleh S, Al-Adham ISI, Buultjens TEJ, Collier PJ. The effect of subminimal inhibitory concentrations of antibiotics on virulence factors expressed by *Staphylococcus aureus* biofilms. *J Appl Microbiol.* 2010 Apr;108(4):1281-1291.

Heikens E, Bonten MJM, Willems RJL. Enterococcal surface protein Esp is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162. *J Bacteriol* 2007 Nov;189(22):8233-40.

Hollenbeck BL, Rice LB. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence.* 2012 Aug 15;3(5):421-433.

Holmberg A, Rasmussen M. Mature biofilms of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* are highly resistant to antibiotics. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2016 Jan;84(1):19-21.

Huycke MM, Spiegel CA, Gilmore MS. Bacteraemia caused by haemolytic high level gentamycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991 Aug;35(8):1626-34.

Jo A, Ahn J. Phenotypic and genotypic characterisation of multiple antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* exposed to subinhibitory levels of oxacillin and levofloxacin. *BMC Microbiology.* 2016 Jul 29;16(1):170.

Kafil HS, Mobarez AM, Moghadam MF, Hashemi ZS, Yousefi M. Gentamicin induces *efaA* expression and biofilm formation in *Enterococcus faecalis*. *Microb Pathog.* 2016 Mar;92:30-35.

- Kafil HS, Mobarez AM. Spread of Enterococcal Surface Protein in Antibiotic Resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates from Urinary Tract Infections. *Open Microbiol J*. 2015 Jun 26;9:14-7.
- Kak V, Donabedian SM, Zervos MJ, Kariyama R, Kumon H, Chow JW. Efficacy of ampicillin plus arbekacin in experimental rabbit endocarditis caused by an *Enterococcus faecalis* strain with high-level gentamicin resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Sep;44(9):2545-2546.
- Kristich CJ, Rice LB, Arias CA. Enterococcal Infection: Treatment and Antibiotic Resistance. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, editores. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014. p.123-184.
- Latasa C, Solano C, Penadés JR, Lasa I. Biofilm-associated proteins. *C R Biol*. 2006 Nov;329(11):849-857.
- Lebreton F, Riboulet-Bisson E, Serror P, Sanguinetti M, Posteraro B, Torelli R, Hartke A, Auffray Y, Giard JC. *ace*, Which encodes an adhesin in *Enterococcus faecalis*, is regulated by *Ers* and is involved in virulence. *Infect Immun*. 2009 Jul;77(7):2832-2839.
- LPSN - List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Genus *Enterococcus*. [Internet]. 2021. [Acesso em 2021 mar 12]. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/enterococcus.html>>.
- Maestre JR, Aguilar L, Mateo M, Gimenez MJ, Mendez ML, Alou L, Granizo JJ, Prieto J. *In vitro* interference of tigecycline at subinhibitory concentrations on biofilm development by *Enterococcus faecalis*. *J Antimicrob Chemother*. 2012 May;67(5):1155-1158.
- MacCallum WG, Hastings TW. A case of acute endocarditis caused by *Micrococcus zymogenes* (Nov. Spec.), with a description of the microorganism. *J Exp Med*. 1899 Sep 1;4(5-6):521-34.
- McBride SM, Coburn PS, Baghdayan AS, Willems RJL, Grande MJ, Shankar N, Gilmore MS. Genetic Variation and Evolution of the Pathogenicity Island of *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol*. 2009 May; 191(10): 3392-3402.
- Medeiros AW, Pereira RI, Oliveira DV, Martins PD, D'Azevedo PA, Van Der Sand S, Frazzon J, Frazzon APG. Molecular detection of virulence factors among food and clinical *Enterococcus faecalis* strains in South Brazil. *Braz J Microbiol*. 2014 Apr 18;45(1):327-332.
- Metzidie E, Manolis EN, Pournaras S, Sofianou D, Tsakris A. Spread of an unusual penicillin and imipenem resistant but ampicillin-susceptible phenotype among *Enterococcus faecalis* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother*. 2005 Jan;57(1):158-160.
- Miller WR, Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2014 Oct;12(10):1221-1236.
- Miller WR, Murray BE, Rice LB, Arias CA. Vancomycin-Resistant Enterococci: Therapeutic Challenges in the 21st Century. *Infect Dis Clin North Am*. 2016 Jun;30(2):415-439.

- Moellering RC Jr, Weinberg AN. Studies on antibiotic synerism against enterococci. II. Effect of various antibiotics on the uptake of ¹⁴C-labeled streptomycin by enterococci. *J Clin Invest.* 1971 Dec;50(12):2580-2584.
- Mohamed JA, Huang W, Nallapareddy SR, Teng F, Murray BE. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun.* 2004 Jun;72(6):3658-3663.
- Murray BE. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev.* 1990 Jan;3(1):46-65.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical Microbiology*. 8.ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2015. 848p.
- Nallapareddy SR, Qin X, Weinstock GM, Hook M, Murray BE. Enterococcus faecalis adhesin, ace, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. *Infect Immun.* 2000 Sep;68(9):5218-24.
- Ramsey M, Hartke A, Huycke M. The Physiology and Metabolism of Enterococci. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, editores. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014. p.581-636.
- Rice LB, Carias LL, Rudin S, Hutton R, Marshall S, Hassan M, Josseaume N, Dubost L, Marie A, Arthur M. Role of class A penicillin-binding proteins in the expression of beta-lactam resistance in *Enterococcus faecium*. *J Bacteriol.* 2009 Jun;191(11):3649-56.
- Rich RL, Kreikemeyer B, Owens RT, LaBrenz S, Narayana SV, Weinstock GM, Murray BE, Höök M. Ace is a collagen-binding MSCRAMM from *Enterococcus faecalis*. *J Biol Chem.* 1999 Sep 17;274(38):26939-45.
- Sader HS, Jones RN, Gales AC, Silva JB, Pignatari AC. SENTRY Antimicrobial Surveillance Program Report: Latin American and Brazilian Result for 1997 through 2001. *Braz J Infect Dis.* 2004 Feb;8(1):25-79.
- Samson RA, Hadlok R, Stolk AC. A taxonomic study of the *Penicillium chrysogenum* series. *Antonie van Leeuwenhoek.* 1977;43(2):169-175.
- Schleifer KH, Kilpper-Bälz R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* norn. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1984 Jan;34(1):31-34.
- Shankar V, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindahl G, Gilmore MS. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infect Immun* 1999 Jan;67(1),193-200.
- Singh KV, Coque TM, Weinstock GM, Murray BE. *In vivo* testing of an *Enterococcus faecalis* *efaA* mutant and use of *efaA* homologs for species identification. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1998 Aug;21(4):323-331.

Singh KV, Nallapareddy SR, Sillanpää J, Murray BE. Importance of the collagen adhesin ace in pathogenesis and protection against *Enterococcus faecalis* experimental endocarditis. PLOS Pathog. 2010 Jan 8;6(1):e1000716.

Soares RO, Fedi AC, Reiter KC, Caierão J, D'Azevedo PA. Correlation between biofilm formation and *gelE*, *esp*, and *agg* genes in *Enterococcus* spp. clinical isolates. Virulence. 2014 Jul 1;5(5):634-637.

Srivastava S, Bhargava A. Biofilms and human health. Biotechnol Lett. 2016 Jan;38(1):1-22.

Strateva T, Atanasova D, Savov E, Petrova G, Mitov I. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates collected in Bulgaria. Braz J Infect Dis. 2016 Feb;20(2):127-133.

Süßmuth SD, Muscholl-Silberhorn A, Wirth R, Susa M, Marre R, Rozdzinski E. Aggregation Substance Promotes Adherence, Phagocytosis, and Intracellular Survival of *Enterococcus faecalis* within Human Macrophages and Suppresses Respiratory Burst. Infect Immun. 2000 Sep;68(9):4900-4906.

Thiercelin E. Morphologie et modes de reproduction de l'entérocoque. CR Seances Soc Biol Paris. 1899a Juin 24;11:551-553.

Thiercelin E. Sur un diplococque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogène. CR Soc Biol. 1899b Avril 15;5:269-271.

Titze-De-Almeida R, Rollo Filho M, Silveira CAN, Rodrigues IP, Eudes Filho J, Nascimento RS. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of Enterococci recovered from Brazilian intensive care units. Braz J Infect Dis. 2004 Jun;8(3):197-205.

Weiner LM, Webb AK, Limbago B, Dudeck MA, Patel J, Kallen AJ, Edwards JR, Siervert DM. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011-2014. Infect Control Hosp Epidemiol. 2016 Nov;37(11):1288-1301.

Yuksel FN, Karatug NT, Akcelik M. Does subinhibitory concentrations of clinically important antibiotic induce biofilm production of *Enterococcus faecium* strains? Acta Microbiol Immunol Hung. 2018 Mar 1;65(1):27-38. doi: 10.1556/030.64.2017.041. Epub 2017 Dec 15.

Zervos MJ, Schaberg DR. Reversal of *in vitro* susceptibility of enterococci to trimethoprim-sulfamethoxazole by folinic acid. Antimicrob Agents Chemother. 1985 Sep;28(3):446-448.

Zimmermann RA, Moellering RC Jr, Weinberg AN. Mechanism of resistance to antibiotic synergism in enterococci. J Bacteriol. 1971 Mar;105(3):873-879.

Zou J, Shankar N. Surface protein Esp enhances pro-inflammatory cytokine expression through NF- κ B activation during enterococcal infection. Innate Immun. 2016 Jan;22(1):31-9.

APÊNDICE A – Artigo submetido

“Effect of sub-inhibitory concentrations of antibiotics on biofilm formation and expression of virulence genes in penicillin-resistant, ampicillin-susceptible *Enterococcus faecalis*”

Aline Andréia Caixeta Magalhães Tibúrcio^a

Aline Dias Paiva^a

André Luiz Pedrosa^a

Wellington Francisco Rodrigues^b

Raíssa Bernardes da Silva^a

Adriana Gonçalves Oliveira^{a*}

^aInstituto de Ciências Biológicas e Naturais and ^bPrograma de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, Brazil.

*Corresponding author: Instituto de Ciências Biológicas e Naturais, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais. Praça Manoel Terra, 330. 38015-050, Brazil.
Phone: +55 34 37006480. E-mail: adriana.oliveira@uftm.edu.br

Abstract

Biofilms have been considered a key factor in the pathogenesis of enterococcal infections. The current study aimed to investigate the impact of antimicrobials in both, biofilm formation and expression of virulence genes in penicillin-resistant, ampicillin-susceptible *E. faecalis* (PRASEF) and penicillin- and ampicillin-susceptible *E. faecalis* (PSASEF) isolates. Twenty PRASEF and 21 PSASEF clinical isolates were used to investigate the effect of sub-minimal inhibitory concentrations (sub-MIC) of antimicrobials on biofilm formation and 10 isolates were submitted to the RT-qPCR assay to detect gene expression of *efaA*, *asa1*, *esp* and *ace*. In total, 100% of PSASEF and 95% of PRASEF isolates produced biofilm showing a moderate formation capacity. Gentamicin did not have any significant effect on biofilm formation but increased the *ace* expression (+136%). Ampicillin and penicillin decreased the production of biofilm but did not significantly affect the expression of the virulence genes investigated. The expression of *ace* (+108%) and *asa1* (+120%) were higher among PSASEF isolates. In conclusion, the findings of this study showed that the biofilm formation ability were similar among PRASEF and PSASEF isolates although the expression pattern of *ace* and *asa1* genes was higher among PSASEF isolates and the expression pattern could be changed by exposure to antimicrobials. In addition, the ability of biofilm formation was not influenced by exposure to sub-MIC of gentamicin in contrast to ampicillin and penicillin.

Key words: Enterococci; biofilm formation; virulence genes; beta-lactams resistance; HLGR; antimicrobial resistance.

1. Introduction

Previously considered as commensal organisms with little clinical significance, in the last decades, enterococci have emerged as nosocomial pathogens, becoming one of the main causes of healthcare-associated infections. Urinary, wound and bloodstream infections, endocarditis and meningitis stand out among the enterococci diseases. Metabolic versatility and resistance to hostile environments (including wide pH range, ionizing radiation, osmotic and oxidative stresses, high levels of heavy metals and antimicrobials) facilitate the host colonization/infection by enterococci strains (Ramsey et al., 2014).

In the *Enterococcus* genus, the antimicrobial resistance pattern can be divided into intrinsic resistance, tolerance and acquired resistance (Kristich et al., 2014). Regarding the acquired resistance, it is important to mention that enterococci have been extraordinarily successful in acquiring resistance determinants to virtually any antimicrobial agent routinely used in therapy, either through chromosomal mutations or by acquiring mobile genetic elements. Enterococcal antimicrobial resistance is a growing clinical challenge, since it favors the bacterial survival, particularly in the hospital environment, making infection harder to treat and increasing the risk of disease spread and death (Kristich et al., 2014).

Initially reported in Greece by Metzidie and colleagues (2005), the phenotype of resistance to penicillin G and susceptibility to ampicillin showed the capacity of evolution of enterococci, since that the resistance to ampicillin or penicillin had been rarely observed among *E. faecalis* strains. The emergence of this unusual resistance phenotype in hospital environment may have been facilitated by the presence and accumulation of different bacterial virulence factors.

In Brazil, the phenotype of β -lactams resistance among *E. faecalis* isolated from hospitalized patients was first reported by our research group (Conceição et al., 2011). Subsequently, it was demonstrated that the penicillin-resistant, ampicillin-susceptible *E.*

faecalis isolates did not produce β -lactamases (Conceição et al., 2012), and tend to show resistance to other classes of antimicrobials (Conceição et al., 2014).

Although enterococci do not have a vast repertoire of extracellular toxins, they have some virulence factors that contribute to enterococcal survival in hospital environment, as well as in the interindividual transmission and pathogenesis. Among the main virulence factors observed in enterococci are the Enterococcal surface protein (Esp), Aggregation substance (AS), Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules such as Adhesion of collagen from *E. faecalis* (Ace) and the surface antigen known by *E. faecalis* antigen A (EfaA) (Dunny et al., 2014; Garsin et al., 2014).

Some virulence factors in enterococci are associated with a greater ability to adhere to host tissues, and consequently associated to biofilm formation. Defined as a community of sessile microorganisms attached to the surface, and surrounded by a matrix of extracellular polymeric substances, the biofilms show high complexity and plasticity, and can be formed in natural, industrial and medical environments (Srivastava and Bhargava, 2016).

The formation of biofilms by enterococci is a complex and multifactorial event (Soares et al., 2014). The influence of environmental factors, including the effect of antimicrobial exposure, on biofilm formation or on the virulence-associated genes expression remains poorly explored. Thus, the present study aimed to investigate the impact of antimicrobials on the biofilm formation and on the expression of virulence genes in *E. faecalis* strains phenotypically resistant to penicillin and susceptible to ampicillin and *E. faecalis* susceptible to both antibiotics, penicillin and ampicillin.

2. Material and methods

2.1. Bacterial isolates and species identification

Twenty penicillin-resistant, ampicillin-susceptible *E. faecalis* (PRASEF) and 21 penicillin- and ampicillin-susceptible *E. faecalis* (PSASEF) clinical isolates were evaluated in this study. These isolates were obtained from a *Enterococcus* isolates collection recovered from hospitalized patients at a Brazilian tertiary hospital in the period from 2006 to 2014. The isolates were recovered from different clinical specimens, such as secretions (abdominal, pleural and ocular), urine, wounds and blood. The species identification of each isolate was based on conventional biochemical tests (Teixeira et al. 2011) and confirmed by PCR using species-specific primers (Dutka-Malen et al., 1995).

2.2. Antimicrobial susceptibility testing

The microdilution broth method was used in accordance with the CLSI guidelines (CLSI, 2015) to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of ampicillin, penicillin and gentamicin. The results were interpreted according to the guidelines of the CLSI (2017). MIC was determined as the lowest concentration of each antimicrobial agent that prevents the visible growth of the sample. The antimicrobial MICs were also determined using commercially available reagent strips with a predefined antimicrobial gradient (Etest®), which was performed according to the manufacturer's specifications. The interpretative criteria of the MIC were the same as those used by the broth dilution method (CLSI, 2017). The quality control testing was performed using *E. faecalis* ATCC®29212 as reference strain, according to the guidelines described by CLSI (2017).

2.3. Biofilm assay

The microtiter biofilm assay was performed as described by Kafil et al. (2016) and Stepanovic et al. (2007), with modifications. Briefly, few colonies of each isolate were suspended in Brain Heart Infusion (BHI) broth to OD₆₀₀ = 0.2 and homogenized for 1 min.

Each well of a sterile 96-well polystyrene plate was filled with 200 μ L of bacterial suspension. For antimicrobial biofilm induction, sub-MIC concentrations of the antimicrobials (ampicillin, penicillin or gentamicin) were added to each well (specific for each sample). The plates were covered and incubated for 24 hours at 37°C, under aerobic conditions without shaking. For each isolate, six wells were evaluated.

After incubation, the supernatant was discarded, and the wells were washed three times with 200 μ L of sterile phosphate buffered saline (PBS) to remove unattached cells. The plates were left to dry for 1 h at 60°C. The formed biofilms were fixed with 150 μ L methanol for 20 min; the methanol was removed and the plate was air dried, in inverted position, overnight, at room temperature. Biofilms were stained with 150 μ L of crystal violet solution (2%), for 15 min at room temperature, and the wells were rinsed with PBS. Microtiter plates were inverted on a paper towel and air dried. To detach the biofilms, 150 μ L of acetic acid (33%) was added to each well and the lidded plate was left at room temperature for 30 min, without shaking.

The optical density of the resolubilized crystal violet was measured, at 570 nm, using a microtiter plate reader (TP-Reader, ThermoPlate). Negative controls were just the BHI broth, which were dispensed into six wells per tray. The final OD value for each isolate tested and for the negative controls was obtained as the average of the six repetitions. Duplicates were done for all plates. *E. faecalis* ATCC 29212 was used as positive control.

The biofilm production was categorized as proposed by Stepanovic et al. (2000) into non-adherent, weakly, moderately or strongly adherent, based on the mean of the OD values. In brief, the cut-off OD (OD_c) value was defined as three standard deviations above the mean OD of the negative control. Each microtiter plate had its own OD_c value. The final optical density value of each strain was expressed as the mean OD values obtained subtracted by the

ODc value. Negative results for this subtraction represented biofilm non-adhesion, while positive values indicated biofilm production.

2.4. Detection of virulence factors genes by PCR reaction

The presence of genes encoding proteins for different virulence factors (*asa1*, *esp*, *efaA* and *ace*) were determined by PCR using specific primers previously described in the literature (Vankerckhoven et al., 2004; Martín-Platero et al., 2009; Moraes et al., 2012). Amplifications were conducted in the thermocycler GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA). PCR was carried out with: 50 ng/μL of bacterial DNA, 0.2 μM of each specific primer, 0.2 mM of a mix dNTPs, 1X reaction buffer, 2 mM MgCl₂, 0.625 U/μL TaqDNA polymerase and MilliQ water to a final volume of 10 μL. An initial denaturation step (94°C for 5 min) was followed by 30 cycles of denaturation (94°C for 1 min), annealing with a specific temperature for each primer pair for 1 minute and extension (72°C for 1 min), followed by a single final extension step (72°C for 5 min). Each PCR set included a no-template control. The PCR products were separated by electrophoresis (50-90 min at 90 V) on 1.5% agarose gel in 1X TAE buffer solution, stained with ethidium bromide and visualized under UV light. A 100-bp DNA ladder was used as a molecular marker.

2.5. Quantitative RT-PCR assay (RT-qPCR)

For antimicrobial induction, ten PRASEF and PSASEF isolates were cultured overnight and diluted to 1% in BHI fresh medium (Liofilchem, Italy) and incubated at 37°C until OD₅₉₀ = 0.4 (exponential phase of growth). The cultures were centrifuged (12000 rpm, 10 min) and the pellet was suspended in 10 mL of BHI-containing sub-minimal inhibitory concentration of antimicrobial (ampicillin or gentamicin) or only BHI broth (control) for each isolate. After incubation with shaking for one hour at 37°C, the culture was centrifuged and

subjected for RNA extraction using TRIzolTM Reagent (Thermo ScientificTM, USA) according to the manufacturer's instructions.

The RNA concentration was measured by NanoDropTM Lite Spectrophotometer apparatus (Thermo ScientificTM, USA). All samples were submitted to the DNase I treatment with RQ1 RNase-Free DNase (Promega, USA), according to the manufacturer's instructions. RNA concentrations were measured again using NanoDropTM Lite Spectrophotometer apparatus (Thermo ScientificTM, USA). RNA quality was measured based to the OD260/280 ratio. Following extraction, the reverse transcription reaction was performed in order to obtain the cDNA synthesis. The GoScriptTM Reverse Transcription System kit (Promega, USA) was used according to the manufacturer's instructions. The cDNA was stored at -20°C.

Gene expression analysis was performed by RT-qPCR using the specific primers described elsewhere (Kafil et al., 2016), on 96-well real-time PCR plates (Applied BiosystemsTM) sealed with optical adhesive (Applied BiosystemsTM). All primers were used in three wells (triplicates) for each isolate. The final volume of each reaction was 20 μ L, containing 10 μ L of QuantiNova SYBR Green Master Mix (2X) (Qiagen, Germany), 2 μ L of QN ROX Reference Dye, 0.2 μ L of yellow buffer, 2.8 μ L of nuclease-free water, 2 μ L of the forward primer (0.7 μ M), 2 μ L of the reverse primer (0.7 μ M) and 1 μ L of the cDNA sample (100 ng). The amplification reaction and data acquirement in real-time was performed by the StepOneTM System equipment (Applied BiosystemsTM), under the following conditions: PCR initial heat activation at 95°C for 2 minutes; followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 5 seconds, combined annealing/extension at 60°C for 10 seconds.

The Cts of each transcript were normalized according to the Ct of the 23S rRNA. The melting curve was analyzed to verify the specificity and identity of the amplified products. The differences between the means of the normalized Cts of the *ace*, *esp*, *asa1* and *efaA* transcripts of the isolates treated with gentamicin or ampicillin and controls (not treated-NT

with antimicrobials) were analyzed in pairs (NT- gentamicin and NT- ampicillin). Likewise, the differences between the mean Cts of the transcripts were determined between the PRASEF and PSASEF groups for each type of treatment.

2.6. Statistical analysis

The data were tabulated and analyzed in the program IBM SPSS statistics 21 and GraphPad Prism 7.0. The data were evaluated for distribution and the variances were compared (D'Agostino & Pearson normality test and Bartlett's test to compare variances). Mann Whitney and Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons were used to assess the biofilm continuous variables independently and the data were expressed in median with the 95% confidence interval or maximum and minimum values. The paired t-test was used to assess the difference between the means of the normalized Cts of the transcripts of the isolates and the data were expressed as mean and standard deviation. As for the categorical variables associated with the biofilm synthesis were assessed by Chi-square, Fisher's exact or Chi-square with Yates' correction tests and associations assessed by the Odds ratio (Baptista-Pike) with their respective confidence intervals. The differences were considered significant when $P < 0.05$.

3. Results

The 41 clinical *E. faecalis* isolates included in this study were recovered from various clinical samples mainly from wounds (29.3%), urine (24.4%) and blood (17.1%) (Supplementary Data Table 1). The MIC values obtained for each isolated are demonstrated in Supplementary Data Table 1. All 41 *E. faecalis* isolates were susceptible to ampicillin while 47.6% and 85% of the PSASEF and PRASEF isolates, respectively, showed high level of gentamicin resistance (HLGR). All 21 PSASEF and 19 of PRASEF isolates, representing

100 and 95%, respectively, were moderate biofilm producers (Table 1 and Supplementary Data Table 2).

The figure 1 demonstrates the OD-values for each PSASEF (figure 1A) or PRASEF (figure 1B) isolate in the absence and presence of sub-MIC of antimicrobials. As observed, gentamicin did not have any significant effect on biofilm formation either PRASEF or PSASEF isolates if compared to the control group without antimicrobials (non-treated). Conversely, in the presence of ampicillin or penicillin the intensity of biofilm was significantly lower.

All the 41 clinical *E. faecalis* isolates evaluated had the *efaA* gene. In addition, a total of 37 (90.2%) had the *asaI* gene, while 33 isolates (80.5%) had the *esp* gene and only 32 isolates (78.0%) presented the *ace* gene. Taking together, our results demonstrated that each isolate possess at least two virulence genes. In brief, 7.3% of the *E. faecalis* isolates (n=3) had only two genes, 36.6% of the isolates (n=15) presented three genes and the majority of the isolates 56.1% (n=23) had all the four virulence genes studied. No significant differences were observed if the isolates are stratified according to penicillin susceptibility profile although the PRASEF isolates showed higher rates of *esp* (90.0%) and *asaI* (100.0%) genes comparing to the PSASEF isolates (71.4% and 81.0%, respectively) (Table 3). The figure 2 demonstrates the biofilm formation of the PSASEF (figure 2A) and PRASEF (figure 2B) isolates according to the virulence gene pattern and to the absence or presence of sub-MIC of antimicrobials. There was no significant correlation between the biofilm production ability with the virulence genes evaluated or with exposure to antimicrobials.

The RT-qPCR assay was used to analyze the mRNA expression of the virulence genes associated with colonization when the PRASEF and PSASEF isolates are exposed to sub-MIC of ampicillin and gentamicin. The normalized Cts means of the transcripts of each virulence gene in PRASEF and PSASEF isolates were analyzed in pairs when the isolates were treated

with gentamicin, ampicillin or when non-treated with antimicrobials. It was observed a significantly difference between the levels of *ace* and *asaI* transcripts between the PRASEF and PSASEF groups not treated with antimicrobials ($p = 0.017$ and $p = 0.003$, respectively) and in the level of *ace* transcript treated with gentamicin ($p = 0.026$) as shown in Table 4. Relative quantification reveals that the levels of *ace* and *asaI* transcripts are approximately 4.2 ($2^{2.08}$) and 4.6 ($2^{2.20}$) higher in not treated PSASEF isolates than in PRASEF isolates, and the level of the *ace* transcript is approximately 5.1 ($2^{2.36}$) higher in the PSASEF isolates treated with gentamicin. Ampicillin increased expression of *esp* and *efaA* in PSASEF isolates but the difference was not statistically significant (Table 4).

4. Discussion

Enterococci have an extraordinary ability to form biofilm, which is a remarkable pathogenesis strategy, allowing them to survive in adverse conditions and to persist at the site of infection. Biofilms have been considered essentials in the pathogenesis of enterococcal infections, especially in urinary tract infections (Mohamed et al., 2004; Vestby et al. 2020). Biofilm formation is a complex and multifactorial event but may be attributable in part to specific virulence factors such as those associated to the enterococci colonization/adhesion of the host (Toledo-Arana et al., 2001; Fisher and Phillips, 2009). In the current study we evaluated a total of 41 clinical isolates of *E. faecalis* and our results showed that almost all clinical PRASEF and PSASEF isolates produced biofilm which were classified as moderate. In the presence of sub-MIC of ampicillin and penicillin, the biofilm production decreased significantly but sub-MIC of gentamicin did not cause any alteration.

The prevalence of biofilm formation among clinical enterococci may vary according to the type of methodology, nature of specimens, type of strains and geographical location. Weng et al. (2019) found that 49.0% of the *E. faecalis* isolates were producers of biofilm and

among those 28% were strong biofilm producers. However, high rates of biofilm formation was reported in *E. faecalis* isolates in Italy (80%) and UK (100%) (Baldassarri et al. 2001; Sandoe et al. 2003) similar to our study. The great prevalence of clinical *E. faecalis* isolates evaluated in the current study in terms of biofilm production is not surprising, since all of them are originated from a hospital, where is common to find more virulent enterococci strains due to the high selective pressure of environment. In addition, most of the 41 clinical isolates had three or four of the virulence genes investigated (*ace*, *asaI*, *efaA* and *esp*), representing most important virulence factors related to biofilm formation in enterococci. This high prevalence of virulence genes may have prevented the confirmation of a positive correlation between these virulence genes and the biofilm production ability in the present study, as has been reported in previous studies.

Tsikrikonis et al. (2012) has reported higher biofilm formation in *esp*-positive isolates. Likewise, Toledo-Arana et al. (2001) and Soares et al. (2014) found significant associations of *esp* and the ability to form biofilm in *E. faecalis* isolates from clinical origin. Chuang-Smith et al. (2010), Soares et al. (2014) and Anderson et al. (2016) observed an association of the presence of *asaI* with biofilm formation. Seno et al. (2005) reported that *E. faecalis* isolates from urinary tract infections with both *asaI* and *esp* genes formed biofilms at significantly higher rates than those with neither gene.

In the present study, the sub-MIC of gentamicin did not have any effect on biofilm formation ability but increased significantly the *ace* expression among PSASEF isolates. Interestingly, Kafil et al. (2016) have shown that the exposition of *E. faecalis* to this antimicrobial increased both the *efaA* expression and the biofilm formation. Gentamicin is an aminoglycoside used alone or in association with other antimicrobials for treatment of various bacterial infections. Kafil et al. (2016) also reported that sub-MIC of ampicillin have any significant difference on biofilm formation of *E. faecalis* or *E. faecium* isolates evaluated but

strongly increased expression of *ace*. Differently, in our study, sub-MIC ampicillin slightly increased expression of *efaA* and *esp* but decreased significantly the biofilm formation likewise the penicillin. Corroborating with our data, Di Domenico et al. (2019) have shown that ampicillin was the most effective antimicrobial at eradicating biofilm-growing *E. faecalis* recovered from infective endocarditis.

It has been demonstrated that different environmental factors can affect the expression of virulence genes in enterococci. *E. faecalis* is capable of up-regulating virulence factors and stress response genes, which often are connected to virulence, in response to various types of food- and host-associated stresses (Lenz et al. 2010). Hew et al. (2007) found that *efaA* had significantly upregulated upon exposure to BHI in *E. faecalis*. Therefore, differences in environmental conditions to test the biofilm formation could explain the variety of results observed regarding to expression of virulence genes besides the presence of antimicrobials.

In conclusion, the findings of the current study showed that the ability to biofilm formation were similar among PRASEF and PSASEF isolates although the expression pattern of *ace* and *asaI* genes was higher in PSASEF isolates and could be changed by exposure to antimicrobials. In addition, the ability of biofilm formation was not influenced by exposure to sub-MIC of gentamicin in contrast to ampicillin and penicillin that seem to have some impact on it. Nonetheless, it should be noted that there are a variety of methods to detect the formation of biofilm, highlighting the need to determine which method and or condition is the most appropriate to be used, which would allow comparisons among the studies and a better understanding of this important phenomenon, common in many enterococcal infections. Furthermore, understanding of this phenomenon may have important future clinical implications for this emerging multiresistant pathogen.

Funding

This work was supported in part by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Finance Code 001), Brazil.

Conflict of interests

The authors declare that there are no conflict of interests.

CRedit author statement

Aline A. C. M. Tibúrcio: Investigation, Methodology, Data Curation; **Aline D. Paiva:** Methodology, Writing - Review & Editing; **André L. Pedrosa:** Methodology, Formal analysis; **Wellington F. Rodrigues:** Formal analysis, Visualization/data presentation; **Raíssa B. Silva:** Formal analysis, Visualization/data presentation; **Adriana G. Oliveira:** Conceptualization, Supervision, Funding acquisition, Writing - Review & Editing.

References

Anderson AC, Jonas D, Huber I, Karygianni L, Wölber J, Hellwig E, Arweiler N, Vach K, Wittmer A, Al-Ahmad A. Enterococcus faecalis from Food, Clinical Specimens, and Oral Sites: Prevalence of Virulence Factors in Association with Biofilm Formation. *Front Microbiol.* 2016 Jan 11;6:1534. doi: 10.3389/fmicb.2015.01534. PMID: 26793174; PMCID: PMC4707231.

Baldassarri L, Cecchini R, Bertuccini L, Ammendolia MG, Iosi F, Arciola CR, Montanaro L, Di Rosa R, Gherardi G, Dicuonzo G, Orefici G, Creti R. Enterococcus spp. produces slime

and survives in rat peritoneal macrophages. *Med Microbiol Immunol*. 2001 Dec;190(3):113-20. doi: 10.1007/s00430-001-0096-8. PMID: 11827199.

CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*; Approved Standard – Tenth Edition. CLSI document M07-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.

CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*; Twenty-Seventh Informational Supplement. CLSI document M100-S27. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.

Conceição N, Oliveira CC, Silva LE, Souza LR, Oliveira AG. Ampicillin susceptibility can predict in vitro susceptibility of penicillin-resistant, ampicillin-susceptible *Enterococcus faecalis* Isolates to amoxicillin but not to imipenem and piperacillin. *J Clin Microbiol*. 2012 Nov;50(11):3729-31. doi: 10.1128/JCM.01246-12. Epub 2012 Aug 15. PMID: 22895041; PMCID: PMC3486203.

Conceição N, Oliveira CC, Silva PR, Avila BG, Oliveira AG. Trends in antimicrobial resistance among clinical isolates of enterococci in a Brazilian tertiary hospital: a 4-year study. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011 Mar-Apr;44(2):177-81. doi: 10.1590/s0037-86822011005000009. Epub 2011 Apr 1. PMID: 21468473.

Conceição N, Silva LE, Darini AL, Pitondo-Silva A, Oliveira AG. Penicillin-resistant, ampicillin-susceptible *Enterococcus faecalis* of hospital origin: *pbp4* gene polymorphism and

genetic diversity. *Infect Genet Evol.* 2014 Dec;28:289-95. doi: 10.1016/j.meegid.2014.10.018. Epub 2014 Oct 30. PMID: 25445645.

Chuang-Smith ON, Wells CL, Henry-Stanley MJ, Dunny GM. Acceleration of *Enterococcus faecalis* biofilm formation by aggregation substance expression in an ex vivo model of cardiac valve colonization. *PLoS One.* 2010 Dec 30;5(12):e15798. doi: 10.1371/journal.pone.0015798. PMID: 21209892; PMCID: PMC3012704.

Di Domenico EG, Rimoldi SG, Cavallo I, D'Agosto G, Trento E, Cagnoni G, Palazzin A, Pagani C, Romeri F, De Vecchi E, Schiavini M, Secchi D, Antona C, Rizzardini G, Dichirico RB, Toma L, Kovacs D, Cardinali G, Gallo MT, Gismondo MR, Ensoli F. Microbial biofilm correlates with an increased antibiotic tolerance and poor therapeutic outcome in infective endocarditis. *BMC Microbiol.* 2019 Oct 21;19(1):228. doi: 10.1186/s12866-019-1596-2. PMID: 31638894; PMCID: PMC6802308.

Dunny GM, Hancock LE, Shankar N. Enterococcal Biofilm Structure and Role in Colonization and Disease. 2014 Feb 14. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, editors. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014—. PMID: 24649508.

Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol.* 1995 Jan;33(1):24-7. doi: 10.1128/JCM.33.1.24-27.1995. Erratum in: *J Clin Microbiol* 1995 May;33(5):1434. Erratum in: *J Clin Microbiol.* 1995 May;33(5):1434. PMID: 7699051; PMCID: PMC227872.

Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology (Reading)*. 2009 Jun;155(Pt 6):1749-1757. doi: 10.1099/mic.0.026385-0. Epub 2009 Apr 21. PMID: 19383684.

Garsin DA, Frank KL, Silanpää J, Ausubel FM, Hartke A, Shankar N, Murray BE. Pathogenesis and Models of Enterococcal Infection. 2014 Feb 7. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, editors. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014-. PMID: 24649512.

Hew CM, Korakli M, Vogel RF. Expression of virulence-related genes by *Enterococcus faecalis* in response to different environments. *Syst Appl Microbiol*. 2007 Jun;30(4):257-67. doi: 10.1016/j.syapm.2006.08.002. Epub 2006 Sep 28. PMID: 17010551.

Kafil HS, Mobarez AM, Moghadam MF, Hashemi ZS, Yousefi M. Gentamicin induces *efaA* expression and biofilm formation in *Enterococcus faecalis*. *Microb Pathog*. 2016 Mar;92:30-35. doi: 10.1016/j.micpath.2015.12.008. Epub 2015 Dec 25. PMID: 26724739.

Kristich CJ, Rice LB, Arias CA. Enterococcal Infection—Treatment and Antibiotic Resistance. 2014 Feb 6. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, editors. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014-. PMID: 24649502.

Lenz CA, Hew Ferstl CM, Vogel RF. Sub-lethal stress effects on virulence gene expression in *Enterococcus faecalis*. *Food Microbiol.* 2010 May;27(3):317-26. doi: 10.1016/j.fm.2009.11.008. Epub 2009 Nov 10. PMID: 20227595.

Martín-Platero AM, Valdivia E, Maqueda M, Martínez-Bueno M. Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses. *Int J Food Microbiol.* 2009 Jun 1;132(1):24-32. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.010. Epub 2009 Mar 27. PMID: 19375810.

Metzidie E, Manolis EN, Pournaras S, Sofianou D, Tsakris A. Spread of an unusual penicillin- and imipenem-resistant but ampicillin-susceptible phenotype among *Enterococcus faecalis* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2006 Jan;57(1):158-60. doi: 10.1093/jac/dki427. Epub 2005 Nov 24. PMID: 16308417.

Mohamed JA, Huang W, Nallapareddy SR, Teng F, Murray BE. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun.* 2004 Jun;72(6):3658-63. doi: 10.1128/IAI.72.6.3658-3663.2004. Erratum in: *Infect Immun.* 2005 Oct;73(10):7075. PMID: 15155680; PMCID: PMC415661.

Moraes PM, Perin LM, Todorov SD, Silva A Jr, Franco BD, Nero LA. Bacteriocinogenic and virulence potential of *Enterococcus* isolates obtained from raw milk and cheese. *J Appl Microbiol.* 2012 Aug;113(2):318-28. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05341.x. Epub 2012 Jun 11. Erratum in: *J Appl Microbiol.* 2012 Dec;113(6):1564. PMID: 22587647.

Ramsey M, Hartke A, Huycke M. The Physiology and Metabolism of Enterococci. 2014 Feb 15. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, editors. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014—. PMID: 24649507.

Sandoe JAT, Witherden IR, Cove JH, Heritage J, Wilcox MH. Correlation between enterococcal biofilm formation in vitro and medical-device-related infection potential in vivo. *J Med Microbiol*. 2003 Jul;52(Pt 7):547-550. doi: 10.1099/jmm.0.05201-0. PMID: 12808074.

Seno Y, Kariyama R, Mitsuhata R, Monden K, Kumon H. Clinical implications of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in the urinary tract. *Acta Med Okayama*. 2005 Jun;59(3):79-87. doi: 10.18926/AMO/31979. PMID: 16049560.

Soares RO, Fedi AC, Reiter KC, Caierão J, d'Azevedo PA. Correlation between biofilm formation and *gelE*, *esp*, and *agg* genes in *Enterococcus* spp. clinical isolates. *Virulence*. 2014 Jul 1;5(5):634-7. doi: 10.4161/viru.28998. Epub 2014 Apr 29. PMID: 24782231; PMCID: PMC4105314.

Srivastava S, Bhargava A. Biofilms and human health. *Biotechnol Lett*. 2016 Jan;38(1):1-22. doi: 10.1007/s10529-015-1960-8. Epub 2015 Sep 19. PMID: 26386834.

Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods*. 2000 Apr;40(2):175-9. doi: 10.1016/s0167-7012(00)00122-6. PMID: 10699673.

Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, Ruzicka F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*. 2007 Aug;115(8):891-9. doi: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x. PMID: 17696944.

Teixeira L, Carvalho M, Shewmaker P, Facklam R. 2011. *Enterococcus*, p 350-364. In Versalovic J, Carroll K, Funke G, Jorgensen J, Landry M, Warnock D (ed), *Manual of Clinical Microbiology*, 10th Edition. ASM Press, Washington, DC. doi: 10.1128/9781555816728.ch21

Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta MJ, Cucarella C, Lamata M, Amorena B, Leiva J, Penadés JR, Lasa I. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol*. 2001 Oct;67(10):4538-45. doi: 10.1128/aem.67.10.4538-4545.2001. PMID: 11571153; PMCID: PMC93200.

Tsikrikonis G, Maniatis AN, Labrou M, Ntokou E, Michail G, Daponte A, Stathopoulos C, Tsakris A, Pournaras S. Differences in biofilm formation and virulence factors between clinical and fecal enterococcal isolates of human and animal origin. *Microb Pathog*. 2012 Jun;52(6):336-43. doi: 10.1016/j.micpath.2012.03.003. Epub 2012 Mar 15. PMID: 22445820.

Weng PL, Ramli R, Hamat RA. Antibiotic Susceptibility Patterns, Biofilm Formation and *esp* Gene among Clinical Enterococci: Is There Any Association? *Int J Environ Res Public Health*. 2019 Sep 17;16(18):3439. doi: 10.3390/ijerph16183439. PMID: 31533204; PMCID: PMC6765802.

Vankerckhoven V, Van Autgaerden T, Vael C, Lammens C, Chapelle S, Rossi R, Jabes D, Goossens H. 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.* 2004 Oct;42(10):4473-9. doi: 10.1128/JCM.42.10.4473-4479.2004. PMID: 15472296; PMCID: PMC522368.

Vestby LK, Grønseth T, Simm R, Nesse LL. Bacterial Biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease. *Antibiotics (Basel).* 2020 Feb 3;9(2):59. doi: 10.3390/antibiotics9020059. PMID: 32028684; PMCID: PMC7167820.

Table 1. Classification of penicillin-resistant, ampicillin-susceptible *Enterococcus faecalis* (PRASEF), and penicillin- and ampicillin-susceptible *E. faecalis* (PSASEF) regarding biofilm formation.

Groups of isolates		Number (%) of isolates			
		Non-adherent	Weakly adherent	Moderately adherent	Strongly adherent
PRASEF	Non-treated	0	1 (5.0)	19 (95.0)	0
	Ampicillin	0	11 (55.0)	9 (45.0)	0
	Penicillin	0	20 (100.0)	0	0
	Gentamicin	0	3 (15.0)	17 (85.0)	0
PSASEF	Non-treated	0	0	21 (100.0)	0
	Ampicillin	0	11 (52.4)	10 (47.6)	0
	Penicillin	2 (9.5)	14 (66.7)	3 (14.3)	2 (9.5)
	Gentamicin	0	1 (4.8)	20 (95.2)	0

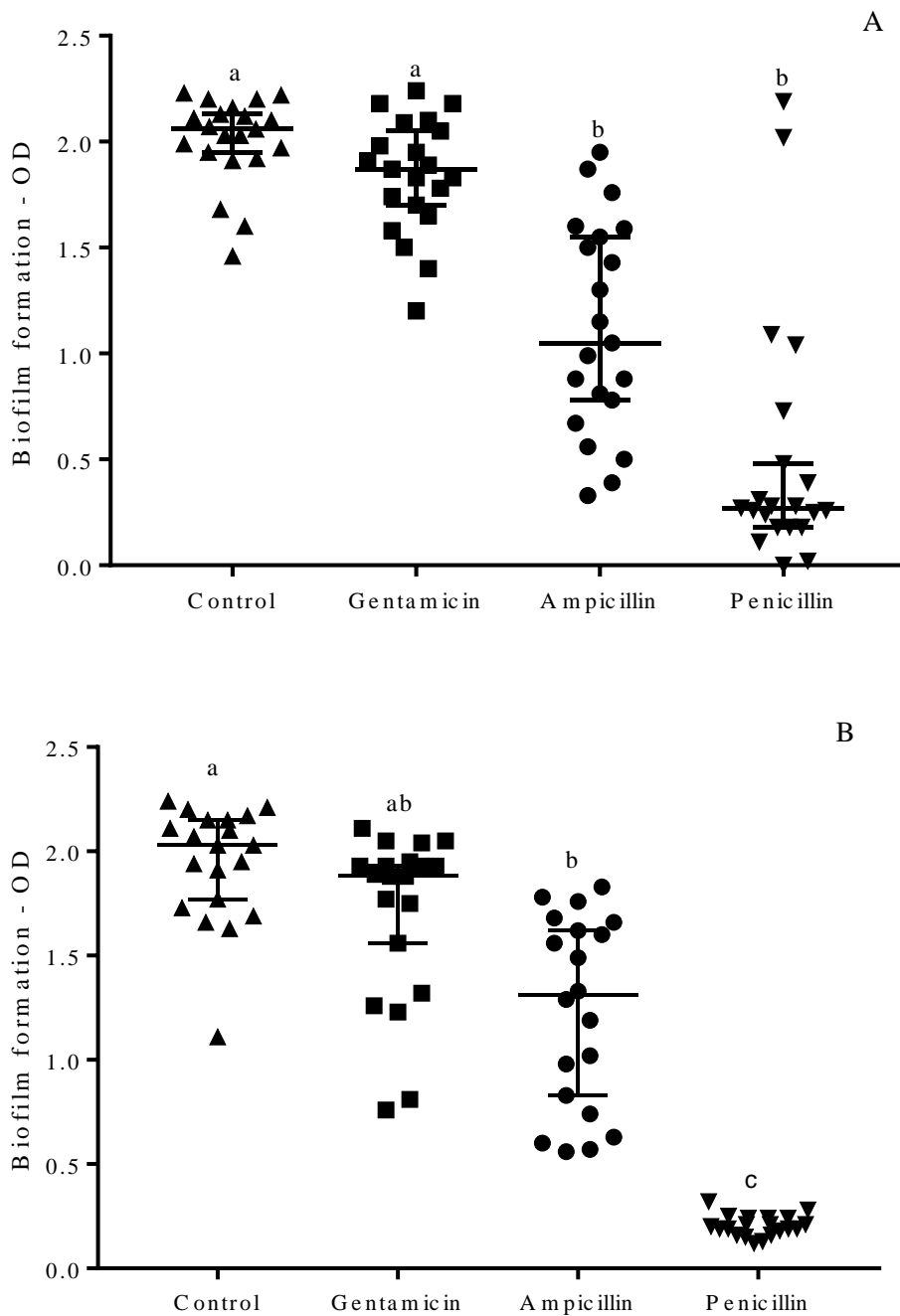


Figure 1. Biofilm formation by (A) penicillin- and ampicillin-susceptible *Enterococcus faecalis* (PSASEF), and by (B) penicillin-resistant, ampicillin-susceptible *E. faecalis* (PRASEF), in the absence (non-treated; control) or presence of subinhibitory concentrations of gentamicin, ampicillin and penicillin. The letters a, b and c represent statistically significant differences ($p < 0.05$).

Table 2. Absence of inhibitory effect upon gentamicin treatment in penicillin- and ampicillin-susceptible *E. faecalis* (PSASEF), and by penicillin-resistant, ampicillin-susceptible *E. faecalis* (PRASEF).

Susceptible to penicillin (PSASEF)					
Group	Upper limit of CI - ODc		Total - N (%)	OR (95% CI)	P-value
	\geq - N (%)	< - N (%)			
Control	11 (52.38)	10 (47.62)	21 (100)	2.75 (0.82 to 8.65)	0.21
Gentamicin	6 (28.57)	15 (71.43)	21 (100)		
Resistant to penicillin (PRASEF)					
	\geq - N (%)				
		< - N (%)			
Control	9 (45.00)	11 (55.00)	20 (100)	4.64 (1.00 to 17.96)	0.08
Gentamicin	3 (15.00)	17 (85.00)	20 (100)		

CI = confidence interval (95%). ODc = optical density of group control. % = percentage. N = number.

Table 3. Presence of *ace*, *asa1*, *esp* and/or *efaA* genes in penicillin-resistant, ampicillin-susceptible *Enterococcus faecalis* (PRASEF) and penicillin- and ampicillin-susceptible *E. faecalis* (PSASEF).

Genes	Number (%) of isolates			P-value
	PSASEF (n= 21)	PRASEF (n=20)	Total (n=41)	
<i>ace</i>	18 (85.71)	14 (70.00)	32 (78.05)	0.28
<i>asa1</i>	17 (80.95)	20 (100.00)	37 (90.24)	0.11
<i>esp</i>	15 (71.43)	18 (90.00)	33 (80.49)	0.24
<i>efaA</i>	21 (100.00)	20 (100.00)	41 (100.00)	-
<i>ace+asa1</i>	15 (71.43)	14 (70.00)	29 (70.73)	-
<i>ace+esp</i>	12 (57.14)	12 (60.00)	24 (58.54)	-
<i>asa1+esp</i>	13 (61.90)	18 (90.00)	31 (75.61)	0.20
<i>ace+asa1+esp</i>	11 (52.38)	12 (60.00)	23 (56.10)	-
<i>ace+asa1+esp+efaA</i>	11 (52.38)	12 (60.00)	23 (56.10)	-

Figure 2. Demonstration of *ace*, *esp*, *asaI* and/or *efaA* gene presence and biofilm formation by (A) penicillin- and ampicillin-susceptible *Enterococcus faecalis* (PSASEF), and by (B) penicillin-resistant, ampicillin-susceptible *E. faecalis* (PRASEF), in the absence (control – Ctl) or presence of subinhibitory concentrations of gentamicin (Gen), ampicillin (Amp) and penicillin (Pen). Biofilm production was evaluated by optical density (OD). The data were expressed as median, minimum and maximum values. The numbers above each box-plot represent the absolute values for each bacterial profile.

Table 4. Standardized Cts and ddCts of ace, esp, asa1 and efaA transcripts in penicillin-resistant, ampicillin-susceptible *Enterococcus faecalis* (PRASEF), and penicillin- and ampicillin-susceptible *E. faecalis* (PSASEF), in the absence (control) or presence of subinhibitory concentrations of gentamicin or ampicillin.

Transcript	ddCt ¹ (PRASEF - PSASEF)					
	Control		Gentamicin		Ampicillin	
	Mean ± SD (%) ²	P value	Mean ± SD (%)	P value	Mean ± SD (%)	P value
ace	2.08 ±0.85 (+108%)	0.017	2.36 ±1.15 (+136%)	0.026	0.96 ±2.22 (-4%)	0.448
esp	0.90 ±2.30 (-10%)	0.429	0.51 ±2.48 (-50%)	0.543	1.53 ±2.31 (+53%)	0.192
asa1	2.20 ±0.51 (+120%)	0.003	0.98 ±2.01 (-2%)	0.402	0.54 ±2.15 (-46%)	0.652
efaA	0.92 ±0.79 (-8%)	0.293	0.45 ±0.82 (-55%)	0.218	1.52 ±1.70 (+52%)	0.140

¹ddCt was determined considering the means of standardized Cts for PRASEF and PSASEF according to the treatment.

²%: percentage of increase or decrease in the transcript level calculated from the ddCt.

SD: Standard Deviation

Supplementary Data Table. Characteristics of the penicillin-resistant, ampicillin-susceptible *Enterococcus faecalis* (PRASEF) and penicillin-susceptible, ampicillin-susceptible *Enterococcus faecalis* (PSASEF) isolates evaluated in the current study.

Isolate	Clinical specimens	MIC [sub-MIC]			Biofilm categories			Biofilm-related genes					
		Pen	Amp	Gen	NT	Pen	Amp	Gen	<i>asaI</i>	<i>efaA</i>	<i>esp</i>	<i>ace</i>	
PSASEF													
07/06	Wound	4 [1]	0.25 [0.12]	16 [8]	M	W	M	M	+	+	+	+	
35/06	Urine	4 [1]	1 [0.5]	8 [4]	M	M	W	M	+	+	-	+	
155/07	Wound	4 [2]	0.5 [0.25]	8 [4]	M	W	W	M	-	+	-	+	
175/08	Blood	4 [2]	1 [0.25]	64 [32]	M	W	M	M	+	+	+	+	
221/08	Tissue biopsy	4 [1]	0.5 [0.25]	> 2,000 [500]	M	W	W	M	+	+	-	+	
228/08	Urine	4 [1]	0.5 [0.25]	16 [8]	M	W	M	M	+	+	+	+	
277/09*	Wound	8 [2]	1 [0.25]	> 2,000 [500]	M	NA	W	M	+	+	+	+	
443/10	Tissue biopsy	8 [4]	2 [1]	> 2,000 [500]	M	W	M	M	+	+	+	-	
532/10	Peritoneal fluid	1 [0.5]	1 [0.25]	32 [16]	M	S	M	M	+	+	+	+	
579/11*	Urine	4 [2]	1 [0.5]	> 2,000 [500]	M	W	W	M	+	+	+	+	

587/11	Blood	2 [1]	2 [0.5]	> 2,000 [500]	M	M	W	M	+	+	+	+
601/11	Blood	2 [1]	1 [0.25]	1,000 [500]	M	M	M	M	+	+	-	+
664/12	Blood	2 [1]	2 [0.25]	16 [8]	M	NA	W	M	+	+	+	+
691/12*	Wound	4 [1]	0.5 [0.25]	> 2,000 [500]	M	W	W	M	+	+	+	+
721/12	Blood	4 [1]	0.5 [0.25]	32 [16]	M	W	M	M	-	+	+	-
753/13	Urine	4 [2]	1 [0.25]	> 2,000 [500]	M	W	M	W	-	+	+	+
756/13*	Urine	2 [1]	0.5 [0.25]	> 2,000 [500]	M	W	W	M	+	+	+	+
829/13	Cerebrospinal fluid	4 [1]	1 [0.25]	32 [16]	M	W	M	M	+	+	+	-
848/13*	Cerebrospinal fluid	2 [1]	1 [0.25]	> 2,000 [500]	M	W	W	M	+	+	+	+
879/14	Cerebrospinal fluid	1 [0.5]	0.5 [0.25]	32 [16]	M	S	M	M	-	+	-	+
900/14	Blood	2 [1]	0.5 [0.25]	32 [16]	M	W	W	M	+	+	-	+
PRASEF												
20/06	Urine	32 [8]	8 [1]	>2,000 [500]	M	W	M	M	+	+	+	+
38/06*	Wound	32 [4]	4 [1]	> 2,000 [500]	M	W	M	M	+	+	+	+

157/07	Wound	16 [4]	4 [1]	> 2,000 [500]	M	W	W	M	+	+	+	+
212/08	Urine	32 [4]	8 [1]	> 2,000 [500]	M	W	W	M	+	+	+	+
236/08	Wound	32 [4]	4 [1]	> 2,000 [500]	M	W	W	M	+	+	+	-
250/08*	Wound	32 [4]	8 [1]	> 2,000 [500]	M	W	W	W	+	+	+	+
269/08	Wound	32 [4]	8 [1]	1,000 [500]	M	W	M	M	+	+	+	+
272/09	Wound	32 [4]	8 [1]	1,000 [500]	M	W	M	M	+	+	+	+
291/09*	Pleural fluid	32 [4]	8 [1]	1,000 [500]	M	W	W	W	+	+	+	+
313/09	Wound	32 [4]	8 [2]	> 2,000 [500]	M	W	W	M	+	+	+	+
409/10	Peritoneal fluid	16 [4]	4 [1]	16 [8]	M	W	M	M	+	+	+	+
427/10	Urine	16 [4]	4 [1]	> 2,000 [500]	M	W	W	M	+	+	+	-
439/10	Pleural fluid	16 [4]	4 [1]	16 [8]	M	W	M	M	+	+	+	-
472/10*	Peritoneal fluid	32 [4]	2 [1]	> 2,000 [500]	M	W	W	M	+	+	+	+
505/10	Urine	16 [4]	8 [1]	> 2,000 [500]	M	W	W	M	+	+	+	-
571/11	Tissue biopsy	16 [2]	4 [1]	> 2,000 [500]	M	W	W	M	+	+	+	-
737/12	Blood	16 [2]	1 [0.25]	> 2,000 [500]	W	W	M	M	+	+	-	+

754/13	Wound	16 [1]	1 [0.25]	32 [16]	M	W	M	M	+	+	+	-
896/14	Tissue biopsy	16 [2]	1 [0.25]	> 2,000 [500]	M	W	M	M	+	+	-	+
946/14*	Urine	32 [4]	2 [1]	> 2,000 [500]	M	W	W	W	+	+	+	+

Notes: MIC (minimum inhibitory concentration) and sub-Mic (sub-minimal inhibitory concentration) values are expressed in $\mu\text{g/mL}$. Biofilm was classified as non-adherent (NA), weakly adherent (W), moderately adherent (M) or strongly adherent (S), in the absence of antibiotics (NT - not treated) and in the presence of gentamicin (Gen), ampicillin (Amp) and penicillin (Pen). +, presence of the corresponding gene; -, absence of the corresponding gene. *Isolates used in the RT-qPCR assays.

APÊNDICE B – Comprovante de Submissão do Artigo

Heliyon

Effect of sub-inhibitory concentrations of antibiotics on biofilm formation and expression of virulence genes in penicillin-resistant, ampicillin-susceptible *Enterococcus faecalis* --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	HELIYON-D-21-05295
Article Type:	Original Research Article
Section/Category:	Microbiology
Keywords:	Enterococci; biofilm; virulence genes; beta-lactams resistance; gentamicin resistance; sub-MIC
Manuscript Classifications:	110: Biological Sciences; 130: Health Sciences
Corresponding Author:	Wellington Rodrigues Universidade Federal do Triângulo Mineiro Uberaba, MG BRAZIL
First Author:	Aline Andréia Caixeta Magalhães Tibúrcio
Order of Authors:	Aline Andréia Caixeta Magalhães Tibúrcio Aline Dias Paiva André Luiz Pedrosa Wellington Rodrigues Raissa Bernardes da Silva Adriana Gonçalves Oliveira
Abstract:	Biofilm formation is a key factor in the pathogenesis of enterococcal infections. Thus, the present study aimed to evaluate the biofilm-forming ability and the frequency of biofilm-related genes in penicillin-resistant, ampicillin-susceptible <i>Enterococcus faecalis</i> (PRASEF) in comparison to penicillin- and ampicillin-susceptible <i>E. faecalis</i> (PSASEF). The effect of sub-inhibitory concentrations (sub-MICs) of antibiotics on biofilm formation and on expression of virulence genes was also evaluated. Twenty PRASEF and 21 PSASEF clinical isolates were used to investigate the effect of sub-MICs of antibiotics (ampicillin, penicillin and gentamicin,) on biofilm formation and 10 selected isolates were submitted to the RT-qPCR assay to detect the transcript levels of virulence genes (<i>efaA</i> , <i>asa1</i> , <i>esp</i> and <i>ace</i>). Antibiotic susceptibility was evaluated by microdilution broth method. Biofilm formation assay was performed by microtiter plate method. All PSASEF and PRASEF isolates showed capacity to produce biofilm <i>in vitro</i> . Mostly isolates presented three or four virulence genes. Sub-MICs of ampicillin significantly decreased the biofilm production and the expression of <i>ace</i> and <i>asa1</i> genes, although the transcript levels were significantly lower (-350% and -606.2%, respectively) among PSASEF isolates only. Sub-MICs of gentamicin did not cause any significant effect on biofilm formation, whereas increase slightly the levels of <i>efaA</i> transcripts. In conclusion, this study showed that the biofilm-forming ability and the frequency of the virulence genes evaluated were similar among PRASEF and PSASEF isolates. Additionally, it was confirmed that <i>in vitro</i> antibiotic sub-MICs were able to interfere with expression pattern of virulence genes and with biofilm formation by <i>E. faecalis</i> . Nonetheless, further studies are required to clarify the real role of sub-lethal doses of antibiotics on enterococcal biofilm.
Suggested Reviewers:	Ashraf Mohabati Mobarez Faculty of Medical Sciences, Tehran, Iran mmmobarez@modares.ac.ir MUSTAFA AKCELIK Faculty of Science, Ankara University, Ankara, Turkey akcelik@science.ankara.edu.tr Tiane Martin de Moura Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

APÊNDICE C - Lista de participação de coautores

Em atendimento ao regulamento do PPGCF, listamos abaixo a participação de cada coautor, exceto a mestranda, orientadora e coorientadora.

O manuscrito apresentado foi formatado de acordo com as instruções aos autores da revista “Microbial Pathogenesis”.

André Luiz Pedrosa: Auxílio na realização dos experimentos de RT-qPCR e análise dos resultados de RT-qPCR;

Wellington Francisco Rodrigues: Análise estatística e elaboração de figuras e tabelas;

Raíssa Bernardes da Silva: Análise estatística dos resultados de RT-qPCR.