

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS

ISABELA SGUILLA ROTTA

**Identificação e caracterização de genes de resistência a
antimicrobianos e fatores de virulência em isolados clínicos
multirresistentes de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium***

UBERABA – MG
2022

ISABELA SGUILLA ROTTA

Identificação e caracterização de genes de resistência a antimicrobianos e fatores de virulência em isolados clínicos multirresistentes de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Área de concentração: II - Parasitologia, Imunologia e Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Aline Dias Paiva.

Coorientadora: Profa. Dra. Alessandra Barbosa Ferreira Machado, Profa. Dra. Adriana Gonçalves Oliveira.

UBERABA – MG

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Catálogo na fonte:

Biblioteca da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

R76i	<p>Rotta, Isabela Sguilla</p> <p>Identificação e caracterização de genes de resistência a antimicrobianos e fatores de virulência em isolados clínicos multirresistentes de <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Enterococcus faecium</i> / Isabela Sguilla Rotta. -- 2022.</p> <p>62 p. : il., tab.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2022</p> <p>Orientadora: Profa. Dra. Aline Dias Paiva</p> <p>Coorientadora: Profa. Dra. Alessandra Barbosa Ferreira Machado</p> <p>Coorientadora: Profa. Dra. Adriana Gonçalves Oliveira</p> <p>1. Enterococcus. 2. Repetições palindrômicas curtas agrupadas e regularmente espaçadas. 3. Drogas - Resistência em micro-organismos. 4. Fatores de virulência. I. Paiva, Aline Dias. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.</p> <p>CDU 579.86</p>
------	--

ISABELA SGUILLA ROTTA

Identificação e caracterização de genes de resistência a antimicrobianos e fatores de virulência em isolados clínicos multirresistentes de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*.

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 (a) em Ciências Fisiológicas.

Uberaba, 9 de março de 2022.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. ALINE DIAS PAIVA - Orientadora
Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)

Prof Dr. ANDERSON ASSUNÇÃO ANDRADE
Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)

Prof. Dr. DANIEL BONOTO GONÇALVES
Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ)

Documento assinado eletronicamente por **ALINE DIAS PAIVA**, **Professor do Magistério Superior**, em 09/03/2022, às 11:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021](#).





Documento assinado eletronicamente por **ANDERSON ASSUNCAO ANDRADE**, Professor do Magistério Superior, em 09/03/2022, às 15:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do



art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021](#).

Documento assinado eletronicamente por **Daniel Bonoto Gonçalves, Usuário Externo**, em 09/03/2022, às 16:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[http://sei.uftm.edu.br/sei/controlador_externo.php?](http://sei.uftm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](http://sei.uftm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0687586** e o código CRC **6D995CA3**.

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais Luciana e Ismael este trabalho fruto de muito esforço e dedicação, e agradeço a confiança, a força e a segurança que me deram durante todo o processo, vocês fizeram toda a diferença, eu amo muito vocês. Dedico também a minha avó Vera Lúcia Pereira dos Santos que nos deixou em 2021 mas que sempre foi inspiração como pessoa e profissional. Vó, você foi parte de todas as escolhas que fiz, sempre lembrarei da senhora com muito amor, carinho, respeito e admiração, muito obrigada por todos os momentos, sei que está feliz por mais essa conquista assim como estive em todas as outras.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por ser a base dos meus pensamentos, pela força e esperança para superar todas as dificuldades enfrentadas durante o caminho.

À Santa Rita de Cássia por me escutar em cada oração e trazer a tranquilidade em cada momento de angústia.

Aos meu pais Luciana e Ismael por acreditarem sempre na minha capacidade e por me encorajarem em todos os momentos, por terem incentivado e investido nos meus estudos e por me darem força e o apoio necessário para não desistir dos meus sonhos. Vocês fazem tudo valer a pena. Obrigada por serem a inspiração que eu preciso diariamente para batalhar sempre. Amo vocês.

Ao meu primo Luiz Vicente por demonstrar o verdadeiro significado de luta, força, coragem e esperança, por ensinar que o amor vai além de todos os obstáculos e que a bondade e a humildade fazem a diferença na humanidade.

À minha família, avó, tios, tias e tia avó, por me encorajarem a continuar sempre em frente, independente da distância física obtida durante todo o processo e por serem o aconchego e a calma nos nossos encontros.

À Giovana Scagliarini pela dedicação e apoio em todos os momentos, pelo incentivo e encorajamento que me deu durante toda etapa. Por ser um ponto de paz em meio a turbilhões de sentimentos. Você faz toda a diferença. Obrigada.

Às professoras Aline Dias Paiva e Alessandra Barbosa Ferreira Machado que desde 2017 são referência na minha jornada. Vocês são exemplo e inspiração. Obrigada por todo ensinamento, por toda conversa amiga, conselhos sinceros, olhares que já diziam tudo e principalmente pelos abraços que marcaram momentos felizes e os que confortaram momentos de angústia. Ao lado de vocês tive conquistas pessoais e profissionais importantes para o meu crescimento. Lembrarei de toda nossa jornada com muito carinho, respeito e consideração. Sou eternamente grata a vocês.

À Amanda Franzão pela amizade, dedicação e apoio durante os anos do mestrado.

Ao técnico Celso do laboratório de Microbiologia que me auxiliou durante os experimentos realizados e compartilhou conselhos importantes para minha vida.

À todos os amigos do Laboratório de Microbiologia que fizeram parte e auxiliaram nessa jornada.

Aos professores do Laboratórios de Microbiologia, Adriana Gonçalves de Oliveira e Anderson Assunção Andrade pelos ensinamentos e conselhos.

À Universidade Federal do Triângulo Mineiro e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas pela oportunidade de aprendizado e desenvolvimento profissional. Em especial a Bete, secretária do programa, por toda disponibilidade e auxílio prestado durante o mestrado.

E à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

RESUMO

No estudo, avaliamos a susceptibilidade antimicrobiana, a presença de fatores de virulência codificadores de genes e do sistema CRISPR, bem como a capacidade de produzir enzimas líticas entre isolados clínicos (n=44) de *E. faecalis* e *E. faecium*. Todos os isolados de enterococos apresentaram fenótipo de multirresistência. Metade dos isolados de *E. faecalis* exibiram alto nível de resistência a gentamicina pelo teste fenotípico, vários deles abrigando o gene *aac(6')Ie-aph(2'')Ia*. O gene *vanA* foi o mais frequente entre os isolados de *E. faecium* resistentes à vancomicina. Foram observadas altas prevalências dos genes de virulência *esp* e *efaA*; o gene *hyl* foi mais associado com *E. faecium*, enquanto os genes *ace* and *efaA* foram mais frequentemente detectados em *E. faecalis*. A atividade de caseinase foi frequentemente detectada entre os isolados. Gelatinase e DNase foram predominantes entre *E. faecalis*, enquanto a capacidade hemolítica foi frequente entre os isolados de *E. faecium*. Vinte e nove isolados apresentaram pelo menos um sistema CRISPR. Vários isolados de *E. faecalis* abrigavam o gene *aac(6')Ie-aph(2'')Ia* e um locus CRISPR. Os locus CRISPR foram positivamente correlacionados com a presença dos genes *efaA* e *gelE*, e as atividades de gelatinase e DNase, enquanto a ausência de CRISPR foi relacionada com a presença do gene *hyl*. Esses resultados mostram que cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* isolados de hospital contendo genes de fatores de virulência apresentam concomitantemente locus CRISPR e determinantes de resistência a antimicrobianos.

Palavras-chave: CRISPR. *Enterococcus*. Resistência a antibiótico. Fatores de Virulência.

ABSTRACT

In this study, we evaluated the antimicrobial susceptibility, the presence of gene-encoding virulence factors and CRISPR systems, as well as the ability to produce lytic enzymes among clinical *E. faecalis* and *E. faecium* isolates (n=44). All enterococci isolates showed phenotypes of multi-drug resistance. Half of the *E. faecalis* isolates exhibited high-level gentamicin resistance phenotype, several of them harboring the *aac(6')Ie-aph(2'')Ia* gene. The gene *vanA* was the most frequent among vancomycin-resistant *E. faecium*. High prevalence of the virulence genes *esp* and *efaA* were observed; *hyl* gene was more associated with *E. faecium*, while *ace* and *efaA* genes were more frequently detected in *E. faecalis*. Caseinase activity was frequently detected among the isolates. Gelatinase and DNase activities predominated among *E. faecalis*, while hemolytic capability was frequent among *E. faecium* isolates. Twenty-nine isolates showed at least one CRISPR system investigated. Several *E. faecalis* isolates harbored the *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* gene and a CRISPR loci. CRISPR loci were positively correlated to *efaA* and *gelE* genes, and gelatinase and DNase activities, while CRISPR loci absence was related to *hyl* gene presence. These results show that hospital- adapted strains of *E. faecalis* and *E. faecium* harboring virulence genes show the concomitant presence of CRISPR loci and antibiotic resistance determinants.

Keywords: CRISPR. *Enterococcus*. Antibiotic resistance. Virulence factors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do antimicrobiano penicilina.....	18
Figura 2 – Estrutura química da classe de antimicrobianos aminoglicosídeos.....	19
Figura 3 – Estrutura química da classe de antimicrobianos glicopeptídeos (vancomicina).....	20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características genóticas e fenóticas dos operons encontrados em linhagens VRE	22
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AACs – Aminoglicosídeos acetiltransferases
AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism
ANTs – Adeniltransferases ou nucleotidiltransferases
APHs – Fosfotransferases
AS – Substância de agregação
BHI – meio *Brain heart infusion*
CaCl₂ – Cloreto de Cálcio
Cas – *CRISPR associated genes*
CIM – Concentração inibitória mínima
CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute
CRISPR – *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*
crRNA – *CRISPR-derived RNA*
Cyl – Citolisina
DNA – Ácido desoxirribonucleico
Esp – Proteínas de superfície extracelulares
geI – Gelatinase
HCl – Ácido clorídrico
HLR – High Level Resistance
Hyl - Hialuronidase
IRAS – Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
IS16 – Sequência de inserção
MGE – Mobile genetic element
PAM - protospacer adjacente motif
PBPs – Protein Binding Penicillin
PCR – Reação em cadeia da polimerase
pré-crRNA – Precursores do RNA
RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA – Ácido ribonucleico
TGI – Trato gastrointestinal
TracrRNA - crRNA transativador
TSA – Meio Tryptic Soy agar
VRE – *Enterococcus* resistentes à Vancomicina

LISTA DE SÍMBOLOS

°C – Grau Celsius

% – Porcento

μL – Microlitro

h – Hora

min – Minuto

pb – Pares de bases

Seg – Segundos

g/L – Grama por litro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. ANTIMICROBIANOS.....	18
1.2. MECANISMOS MOLECULARES DE RESISTÊNCIA BACTERIANA A ANTIMICROBIANOS.....	20
1.3. FATORES DE VIRULÊNCIA.....	23
1.4. SISTEMA CRISPR-Cas.....	25
REFERÊNCIAS.....	28
APÊNDICE A (artigo submetido).....	34
APÊNDICE B (comprovante de submissão do artigo).....	62
APÊNDICE C (lista de participação de co-autores).....	64

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Enterococcus* engloba bactérias em formato de cocos, Gram-positivas, dispostas em pares ou cadeias, ubíquos e anaeróbios facultativos. São conhecidos por sobreviverem a condições hostis, como ambientes salinos (6,5% NaCl) e a amplas faixas de temperatura (10°C a 45°C), e por sua capacidade de persistir por um longo período no ambiente hospitalar. São conhecidas mais de 50 espécies de enterococos, sendo *Enterococcus faecalis* e *E. faecium* as duas espécies mais frequentemente associadas a colonizações e infecções em humanos (Franz CMAP et al., 2007; Wagner T, 2018).

Enterococcus faecalis e *Enterococcus faecium* fazem parte da microbiota do trato gastrointestinal (TGI) de humanos, embora possam atuar como patógenos oportunistas em diferentes sítios anatômicos, incluindo o trato urinário, sistema circulatório, coração, abdômen, pele e, mais raramente, o sistema nervoso central. *E. faecalis* tem sido isolado em 80% a 90% das infecções enterocócicas em seres humanos, enquanto *E. faecium* é encontrado em 5% a 10% dessas infecções (Murray BE et al. 2007, Wagner T, 2018). Outras espécies de menor importância clínica são *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. raffinosus*, *E. malodoratus* e *E. mundtii*. As demais espécies do gênero raramente têm sido isoladas a partir de espécimes clínicos.

Em isolados clínicos de *E. faecalis* e *E. faecium* é comum a identificação de diferentes fatores de virulência, como gelatinase, citolisina, hialuronidase, substância de agregação, proteína de superfície de enterococos, antígeno de endocardite e proteína de ligação ao colágeno. Esses fatores amplificam o arsenal de virulência desses microrganismos, facilitando a colonização do hospedeiro, o processo de infecção e o surgimento de doenças (Barbosa-Ribeiro M, 2016; Kiruthiga A, 2020).

O tratamento de infecções enterocócicas pode ser dificultada pois os enterococos apresentam resistência intrínseca a vários antimicrobianos de uso clínico corrente, tais como cefalosporinas, aztreonam, clindamicina, trimetoprim-sulfametoxazol e penicilinas semissintéticas (oxacilina, carbenicilina, nafcilina e ticarcilina) e, por isso, essas drogas não são usadas no tratamento de infecções enterocócicas (Murray BE, 1992). Os enterococos também apresentam resistência intrínseca aos aminoglicosídeos, porém essa resistência é de baixo nível, o que permite o uso da droga em combinação com as penicilinas (ampicilina, penicilina G e ureidopenicilinas) ou com a vancomicina (glicopeptídeo). Essa combinação de aminoglicosídeo com um antimicrobiano que atua

na parede celular gera um efeito bactericida, essencial no tratamento de infecções enterocócicas graves (Rice LB, 2001; Barbosa-Ribeiro M, 2016).

Além da resistência intrínseca, os enterococos também são capazes de rapidamente adquirirem elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons, contendo determinantes de resistência a múltiplas drogas e outros fatores de virulência (Kristich CJ et al. 2014). Essa resistência adquirida pode ocorrer também por meio de mutações cromossômicas, alterando o alvo de ação de algumas drogas. Os fenótipos de resistência adquirida considerados clinicamente mais significativos entre os enterococos são aqueles associados à resistência à penicilina (ampicilina, penicilina G e ureidopenicilinas), aos aminoglicosídeos (alto nível), aos glicopeptídeos (vancomicina) e às oxazolidinonas (linezolida).

Em 2015, o fenótipo de resistência à penicilina G e sensibilidade à ampicilina foi reportado em linhagens de *E. faecalis* isoladas de pacientes atendidos no Hospital de Clínicas, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Essa condição evidencia a trajetória evolutiva desses micro-organismos, visto que, resistência à ampicilina e/ou penicilina G eram raramente observadas nesta espécie. Notavelmente, essa resistência à penicilina está associada à resistência à gentamicina, característica que impede o efeito bactericida, essencial no tratamento de infecções mais graves, obtido pela associação sinérgica da penicilina com o aminoglicosídeo.

A emergência de isolados de *E. faecalis* com esse fenótipo de resistência (penicilina e gentamicina resistente) no ambiente hospitalar pode ter sido facilitada pela presença/acúmulo de fatores de virulência. Embora esta espécie seja a responsável por cerca de 80% a 90% das infecções por enterococos em seres humanos, há uma carência de estudos correlacionando a capacidade dos enterococos em adquirir e transferir material genético, com os mecanismos de virulência e de resistência aos antimicrobianos em *E. faecalis*.

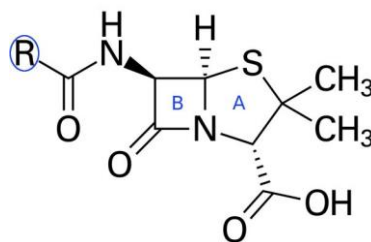
Enterococos resistentes à vancomicina (VRE) têm sido associados a infecções graves e colonização persistente. Desde os primeiros relatos de VRE, na década de 1980 (Uttley AH et al. 1988), estudos epidemiológicos têm demonstrado sérios impactos econômicos e na saúde pública por infecções e colonizações persistentes associadas à VRE (Willems RJL et al. 2005; Shaghaghian S et al. 2012). A partir da elucidação das bases moleculares e genéticas da resistência à vancomicina, os VREs têm emergido como reservatórios e fontes de outros genes de resistência a drogas antimicrobianas.

1.1 ANTIMICROBIANOS

Em 1947, o termo “antibiótico” foi definido como uma substância química, produzida por organismos, com a capacidade de inibir o crescimento e até mesmo promover a destruição da célula-alvo (Waksman AS, 1947). A penicilina foi o primeiro antibiótico descrito, ainda em 1928, por Alexander Fleming; trata-se de um antibiótico do grupo dos β -lactâmicos, sintetizado por algumas espécies de fungos do gênero *Penicillium*.

A estrutura química da penicilina apresenta um anel tiazolúrico (A), ligado ao anel β -lactâmico (B), fixado a uma cadeia lateral (R) (Figura 1). A atividade antimicrobiana está relacionada a integridade da estrutura do anel β -lactâmico e qualquer alteração nessa estrutura inativa a atividade da penicilina. A composição da cadeia lateral determina a família da penicilina, diferenciando quanto as ações terapêuticas, farmacológicas e propriedades físico-químicas. A penicilina G, amplamente conhecida pela sua atividade antimicrobiana, possui um benzil em sua cadeia lateral (Pereira AL, 2005).

Figura 1 – Estrutura química da penicilina.



Legenda: (A) anel tiazolúrico; (B) anel β -lactâmico; (R) cadeia lateral.

Fonte: Pereira AL (2005).

A partir da penicilina naturalmente produzida foram criadas as penicilinas semissintéticas, como a penicilina V, carbenicilina, ampicilina, oxacilina, metecilina, derivadas da estrutura básica da penicilina, porém modificadas quimicamente, com adição de grupos acil, que geram novas propriedades, como maior estabilidade e resistência às β -lactamases (enzimas que inativam a penicilina e constituem o principal mecanismo de resistência em bactérias) (Pandey A et al., 2014).

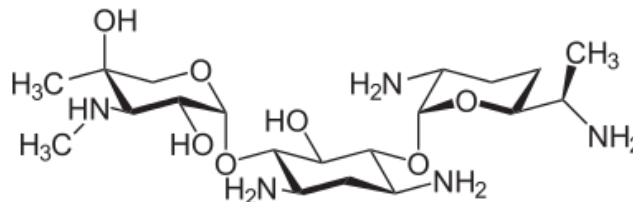
As penicilinas inibem a biossíntese da parede celular bacteriana, se ligando às proteínas de ligação à penicilina (*protein binding penicillin* - PBPs); algumas das PBPs são responsáveis pela reação de transpeptidação, uma etapa essencial à síntese de

peptideoglicano, e a ligação à penicilina impede essa reação, enfraquecendo a estrutura da parede celular bacteriana (Murray BE et al. 2007).

Os aminoglicosídeos representam uma outra classe de antimicrobianos, de amplo espectro, que atuam na inibição da síntese de proteínas. Nessa classe encontram-se gentamicina, ampicacina, tobramicina, dentre outros. Os aminoglicosídeos são usados no tratamento de infecções causadas por micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos. Podem ser naturalmente sintetizados por microrganismos ou obtidos *in vitro* por síntese química.

A estrutura química básica dos aminoglicosídeos é composta pela presença de um anel aminociclitol, ligado a um ou mais açúcares aminados através de ligações glicosídicas (Figura 2). Os diferentes aminoglicosídeos apresentam variações em sua estrutura, como por exemplo a gentamicina, que apresenta o grupo 2-desoziestreptamina (2-DOS) ligado ao anel. A posição da substituição do grupo 2-DOS subdivide os aminoglicosídeos, podendo ser 4,5-bisubstituídos ou 4,6-bisubstituídos (gentamicinas) (Magnet S; Blanchard JS, 2005).

Figura 2 – Estrutura química da classe de antimicrobianos aminoglicosídeos.

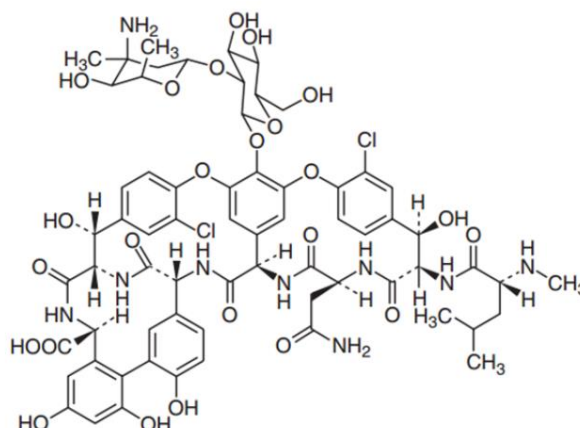


Fonte: Magnet S; Blanchard JS (2005).

Os aminoglicosídeos se ligam à subunidade 30S dos ribossomos inibindo a síntese proteica nas bactérias. Resistência de alto nível (*high level resistance* – HLR) aos aminoglicosídeos entre os enterococos foi reportada inicialmente na França, em 1979; desde então, amostras resistentes têm sido isoladas em todo o mundo (Rice LB, 2001).

Os glicopeptídeos representam a classe de antimicrobianos mais utilizada em infecções graves causadas por bactérias Gram-positivas multi-resistentes. Produzidos por actinomicetos, são formados por estruturas cíclicas variáveis entre os membros da classe, além de aminoácidos e açúcares em sua molécula. A vancomicina, principal representante dos glicopeptídeos, apresenta estrutura tricíclica (Figura 3) (Murray BE, 2015), e impede a formação da parede celular bacteriana, pela ligação ao terminal acil-D-Ala-D-Ala do peptideoglicano (Kang C, 2015).

Figura 3 – Estrutura química da vancomicina.



Fonte: Murray BE (2015).

1.2 MECANISMOS MOLECULARES DE RESISTÊNCIA BACTERIANA A ANTIMICROBIANOS

A resistência adquirida a diversas classes de antimicrobianos em *Enterococcus* é cada vez mais comum, podendo ocorrer por meio de mutações no DNA ou por transferência de genes. Como consequência tem-se a dificuldade do tratamento de infecções enterocócicas (Kristich CJ, 2014).

Originalmente, a resistência adquirida às penicilinas ocorre pela produção de enzimas β -lactamases, que, em *Enterococcus*, são comumente codificadas por plasmídeos mobilizáveis. As β -lactamases são capazes de hidrolisar o anel β -lactâmico das penicilinas e de outros antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos (Murray BE, 1992).

Além da produção de enzimas β -lactamases, outros *Enterococcus* resistentes às penicilinas são capazes de alterar a estrutura das PBPs (Rice LB et al. 2004). As PBPs alteradas apresentam afinidade diminuída a vários β -lactâmicos devido a mutações pontuais no gene que codifica essas enzimas (Poeta P et al. 2009). Um terceiro mecanismo de resistência aos β -lactâmicos em enterococos pode estar relacionado ao aumento da produção de PBPs de baixa afinidade, como as PBPs 4 e 5 (Fontana R et al. 1994; Duez C et al. 2001). É importante ressaltar que a resistência aos β -lactâmicos por síntese de PBPs de baixa afinidade é mais comumente observada entre *E. faecium* e raramente entre linhagens de *E. faecalis*.

Já para a classe dos aminoglicosídeos, o mecanismo de resistência considerado mais relevante clinicamente se deve à ação de enzimas que modificam esses agentes, como as aminoglicosídeo acetiltransferases (AACs) (que acetilam a molécula de acetil-CoA), as adeniltransferases ou nucleotidiltransferases (ANTs) (que adicionam moléculas de adenina) e as fosfotransferases (APHs) (que fosforilam a molécula de aminoglicosídeo) (Vakulenko SB, 2003; Ramirez MS, Tolmasky ME, 2010).

A resistência de alto nível à gentamicina em enterococos deve-se principalmente à aquisição do gene que codifica uma enzima bifuncional denominada AAC(6')-Ie/APH(2'')-Ia (Vakulenko SB, 2003; Ramirez MS, Tolmasky ME, 2010). A presença dessa enzima confere resistência elevada a outros aminoglicosídeos, com exceção da estreptomicina. Outras enzimas APHs monofuncionais já foram encontradas em enterococos e são denominadas de APH(2'')-IIa, APH(2'')-IIIa e APH(2'')-IVa (Chow JW, 2000). Os tipos e a distribuição das enzimas modificadoras de aminoglicosídeos e dos seus genes em enterococos variam de acordo com regiões geográficas (Chow JW, 2000; Donabedian SM et al. 2003).

E. faecalis e *E. faecium* são reconhecidos como os principais reservatórios de genes de resistência aos glicopeptídeos, carreando os genes *van* mais comumente identificados. O principal mecanismo de resistência aos glicopeptídeos em enterococos envolve a alteração de via de biossíntese do peptideoglicano, mais especificamente a substituição de D-Alanina-D-Alanina (D-Ala-D-Ala) por D-Alanina-D-Lactato (D-Ala-D-Lac) ou por D-Alanina-D-Serina (D-Ala-D-Ser) (Arthur M, Quintiliani JR, 2001; Courvalin P, 2006). Tais alterações fazem com que o glicopeptídeo se ligue com menor afinidade à porção terminal do pentapeptídeo: afinidade 1000 vezes menor quando D-Ala-D-Lac está presente e afinidade 7 vezes menor na presença de D-Ala-D-Ser (Reynolds PE, Courvalin P, 2005).

A capacidade de induzir tais alterações está relacionada à presença de genes localizados em elementos genéticos móveis e/ou no próprio cromossomo, dependendo da espécie de *Enterococcus*. Vários operons relacionados à resistência à vancomicina já foram descritos em enterococos, como *vanA*, -B, -C, -D, -E, -G, -L, -M e N (Tabela 1), que são distintos no que se refere ao grau de resistência aos glicopeptídeos, capacidade de transferência e indução (Nilsson O, 2012; Depardieu F et al. 2004; Xu Z et al. 2010; Lebreton F et al. 2011).

Tabela 1 - Características genótípicas e fenotípicas dos operons encontrados em linhagens VRE (Adaptado de Ahmed e Baptiste, 2018).

Operon Van	Principais carreadores	Nível de resistência à vancomicina e teicoplanina	Expressão do fenótipo	Localização e mobilidade
vanA	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>	Alta para ambos	Induzível	Cromossomo Mobilizável
vanB; van B1, B2, B3	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>	Variável para vancomicina; susceptível à teicoplanina	Induzível	Cromossomo Mobilizável
vanC; vanC1, C2, C3, C4	<i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i> <i>E. flavescens</i>	Baixa para vancomicina Susceptível à teicoplanina	Constitutivo Induzível	Cromossomo —
vanD; vanD1, D2, D3, D4, D5	<i>E. faecium</i>	Baixa a alta para ambos	Constitutivo Induzível	Cromossomo —
vanE	<i>E. faecalis</i>	Baixa a moderada para vancomicina Susceptível à teicoplanina	Induzível	Cromossomo —
vanG; vanG1, G2	<i>E. faecalis</i>	Baixa para vancomicina Susceptível à teicoplanina	Induzível	Cromossomo Mobilizável
vanL	<i>E. faecalis</i>	Baixa para vancomicina Susceptível à teicoplanina	Induzível	Cromossomo —
vanM	<i>E. faecium</i>	Alta para ambos	Induzível	Desconhecido Mobilizável
vanN	<i>E. faecium</i>	Baixa para vancomicina Susceptível à teicoplanina	Constitutivo	Plasmídeo Mobilizável

A maioria das infecções por VRE em seres humanos é atribuída à presença dos genes *vanA* e *vanB* (Werner G et al. 2008), os quais têm sido também identificados em vários animais colonizados e amostras ambientais (Caplin JL et al. 2008). Estes são determinantes genéticos distintos e complexos e os operons *van* mais difundidos globalmente (Woodford N, 2001; Shepard BD, Gilmore MS, 2002).

A compreensão dos mecanismos de virulência de VRE e outros enterococos requer o emprego de diferentes técnicas moleculares com o objetivo de avaliar os padrões e a clonalidade do DNA genômico, bem como avaliar as relações filogenéticas entre as subespécies de enterococos. A aplicação de métodos como RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), análise por endonucleases de restrição, análise da presença de sistema CRISPR, MLST e sequenciamento do genoma tem permitido a separação de *E. faecium* em duas clades principais, denominadas A e B (Top J, Willems R, Bonten M, 2008; Palmer KL et al. 2012; Homan WL et al. 2002; Buultjens AH et al. 2017).

E. faecium da clade A são principalmente isolados clínicos, associados a infecções humanas em hospitais e adicionalmente divididos em dois subtipos: clade A1, que inclui linhagens clínicas epidêmicas; clade A2, que inclui isolados animais e associados a

infecções humanas esporádicas. Já a clade B é composta por linhagens associadas a infecções comunitárias (Mikalsen T et al. 2015; Buultjens AH et al. 2017).

O genoma de *E. faecium* da clade A1 é caracterizado pela abundância de genes de virulência e genes de resistência a antimicrobianos quando comparado a linhagens não A1. Clade A1, ou complexo clonal 17 (CC17), é um cluster policlonal global de clones adaptados ao ambiente hospitalar com o potencial de causar doença invasiva e colonização do trato gastrointestinal. O complexo clonal CC17 é frequentemente caracterizado como multirresistente a antimicrobianos, incluindo vancomicina, e tipicamente apresenta marcadores de virulência específicos, especialmente os genes que codificam hialuronidase (*hyl*) e proteína de superfície de enterococos (*esp*), bem como a sequência de inserção IS16 (Mikalsen T et al. 2015).

1.3 FATORES DE VIRULÊNCIA

Adicionalmente à elevada resistência aos antimicrobianos, muitos enterococos podem ainda apresentar outros fatores de virulência, que garantiriam vantagem seletiva em ecossistemas complexos. Fatores de virulência são componentes presentes na própria célula microbiana ou produtos do metabolismo, que auxiliam o patógeno em sua habilidade de causar doença ao hospedeiro.

Linhagens de *Enterococcus* reconhecidamente patogênicas comumente apresentam ilhas de patogenicidade e genes que codificam diferentes fatores de virulência, como substância de agregação (AS), gelatinase (GelE), proteínas de superfície extracelulares (Esp), citolisina (Cyl) e hialuronidase (Hyl) (Vebo HC et al. 2010; Kiruthiga A, 2020; Espíndola LC, 2021).

A substância de agregação (AS), codificada pelo gene plasmidial *asa1*, é uma proteína de superfície que permite a agregação bacteriana durante o processo de conjugação, além de contribuir na formação de biofilmes e na evasão da fagocitose. Acredita-se também que esta seja responsável pela adesão de outras proteínas à matriz extracelular e pelo aumento da hidrofobicidade da superfície das células do hospedeiro (Medeiros AW et al. 2014; Van TD, Gilmore MS. 2015). Outra ação desempenhada pela substância de agregação é a adesão a células eucarióticas, como células do epitélio intestinal e renal, e a polimorfonucleares (Rozdzinski E et al. 2001; Kiruthiga A, 2020).

A gelatinase, codificada pelo gene cromossomal *gelE*, é uma metaloproteinase extracelular, produzida na forma de zimogênio, que é clivado para produzir a enzima ativa (Waters CM et al. 2003). A gelatinase é capaz de hidrolisar gelatina, caseína,

hemoglobina, colágeno, fibrinogênio, fibrina e componentes do sistema do complemento (Tendolkar PM et al. 2005). Sua atividade danifica os tecidos do hospedeiro para obtenção de nutrientes a serem utilizados pelo microrganismo (Medeiros AW et al. 2014; Madsen KT et al. 2017). Além disso, a gelatinase também contribui para a formação de biofilmes (Teixeira N et al. 2012; Golob M, 2019).

A proteína de superfície é codificada pelo gene *esp*, presente em uma ilha de patogenicidade, sendo frequentemente encontrada em isolados clínicos de *Enterococcus*, tais como *E. faecium* resistentes à vancomicina (Billstrom H et al. 2008; Espíndola LC, 2021). Sua expressão está relacionada à adesão tecidual e à formação de biofilmes (Heikens E et al. 2007; Van TD, Gilmore MS, 2015).

A citolisina, codificada pelo gene *cylA*, é um peptídeo com atividade hemolítica e bactericida de amplo espectro, além de atuar facilitando a evasão do sistema imune e o acesso a nutrientes (Gilmore MS et al. 2014; Van TD, Gilmore MS, 2015). A citolisina é codificada por um operon, composto por oito genes, que apresentam funções estrutural, secretória, regulatória, de modificação pós-traducional e de imunidade celular. Este operon pode estar presente em plasmídeos ou integrado ao cromossomo bacteriano (Gilmore MS et al. 2014; Barbosa-Ribeiro M, 2016).

A hialuronidase, codificada pelo gene *hyl*, é uma enzima que age sobre o ácido hialurônico, causando degradação dos tecidos e facilitando a invasão bacteriana, sendo considerada um agente de disseminação (Golinska E et al. 2013; Biswas PP et al. 2016).

Codificada pelo gene *ace*, a proteína de adesão ao colágeno é composta por 335 resíduos de aminoácidos e apresenta peso molecular de 71 kDa (Rich RL et al. 1999). Esta adesina faz parte do grupo de componentes da superfície microbiana de reconhecimento de moléculas adesivas de matriz (MSCRAMMs - *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) e apresenta capacidade de ligação aos colágenos de tipo I e V e à laminina (Lebreton F et al. 2009; Singh KV et al. 2010). A expressão da proteína de adesão ao colágeno é induzida por altas temperaturas e pela presença de componentes da matriz extracelular (Lebreton F et al. 2009; Espíndola LC, 2021).

O antígeno de endocardite é codificado pelo gene *efaA*, presente em um operon composto por três genes. Apresenta peso molecular de 37 kDa, sendo um antígeno de superfície com característica lipoprotéica e expressão regulada por manganês (Gilmore MS et al. 2014; Yang F, 2019).

1.4 SISTEMA CRISPR-Cas

Em 1987, o pesquisador Yoshizumi Ishino identificou, no genoma de *Escherichia coli*, uma região configurada de forma peculiar: sequências repetidas e sequências espaçadoras com função desconhecida. Em 1993, essas sequências foram estudadas isoladamente e em 2000 foram identificadas em diversas bactérias, até que em 2002 foram denominadas CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*). Anos depois, genes denominados *cas* (*CRISPR associated genes*) foram identificados próximos ao locus CRISPR e mostraram-se elementos centrais no funcionamento do sistema como um todo (Lopes DAS et al. 2012).

Essas sequências espaçadoras apresentam origem extracromossômica, ou seja, são derivadas de elementos genéticos móveis (*mobile genetic elements* - MGE). Desta forma foi criada a hipótese de que espaçadores serviriam como memória de invasões anteriores no organismo, reconhecendo o sistema CRISPR como um “sistema imune adaptativo” em procarionotos. O sistema funcionaria da seguinte forma: o RNA produzido a partir dessas sequências espaçadoras seria complementar ao invasor (um MGE), permitindo a defesa do organismo de maneira sequência-específica (Lopes DAS et al. 2012; Castrignano SB, 2017).

Os sistemas CRISPR podem ser classificados em três tipos, que se diferenciam de acordo com a sequência, conservação dos genes *cas* e a organização do operon. O mecanismo de imunidade dos sistemas tipo I e III são complexos e esses sistemas não tem sido aplicados na engenharia genética. O sistema CRISPR tipo II interfere na invasão de elementos genéticos com o auxílio de uma proteína multifuncional denominada Cas9 e dos genes universais *cas1* e *cas2*.

O sistema CRISPR-Cas9 é formado por três principais componentes: a proteína Cas, que apresenta função catalisadora do elemento exógeno; o locus CRISPR, que funciona como uma memória genética; o crRNA transativador (TracrRNA) que contribui para a maturação do crRNA e a formação do complexo Cas. No caso do sistema CRISPR-Cas tipo II, na primeira etapa, o material genético invasor é clivado em pequenos fragmentos, denominados sequências protoespaçadoras, por uma nuclease e em seguida incorporado ao locus CRISPR do genoma bacteriano, como um novo espaçador. Na etapa seguinte, denominada biogênese, o locus CRISPR é transcrito em um longo precursor CRISPR RNA (pré-crRNA). O TracrRNA se liga às sequências repetidas do pré-crRNA que é então clivado pela RNase III produzindo crRNAs maduros, cada um contendo um

espaçador e uma sequência de repetidor. Na terceira fase, ocorre a ação contra o DNA invasor, com o reconhecimento e destruição do elemento exógeno por meio do complexo crRNAs e genes acessórios. A especificidade e a degradação da sequência invasora são determinadas por uma sequência próxima a sequência alvo no DNA do invasor, denominada PAM (*protospacer adjacent motif*) (Pereira TC, 2016; Hryhorowicz M, 2017; Jiang F, Doudna JA, 2017).

Análises de genômica comparativa tem evidenciado a ausência do sistema CRISPR em isolados patogênicos, incluindo *E. faecium* e *E. faecalis* (Palmer KL, 2010), o que possibilitaria a maior facilidade de aquisição de elementos genéticos móveis e consequente vantagem para a sobrevivência em um ecossistema competitivo. Uma relação inversa entre a presença de sistemas CRISPR e a resistência a antimicrobianos também têm sido proposta, o que sugere que a não funcionalidade ou ausência do sistema CRISPR possa estar relacionada ao aumento da multirresistência.

Em isolados de *E. faecalis*, o sistema CRISPR2, órfão de genes *cas*, é conservado (Palmer KL, 2010), enquanto os sistemas CRISPR1-Cas e CRISPR3-Cas apresentam distribuição variável. Isolados hospitalares de *E. faecalis* e linhagens multirresistentes a antimicrobianos geralmente não apresentam esses sistemas, o que reforça a hipótese de que o sistema de defesa adaptativo agiria bloqueando a transferência horizontal de genes e, conseqüentemente, sua presença manteria a bactéria susceptível aos antibióticos (Kristich CJ et al. 2014).

Palmer e colaboradores (2010) demonstraram que o isolado de *E. faecalis* OG1RF, proveniente da microbiota intestinal e sensível a antibióticos, apresentava os sistemas CRISPR1-Cas e CRISPR2, além de poucos elementos genéticos móveis no genoma; contrariamente, os autores mostraram que *E. faecalis* V583, resistente à vancomicina, isolado em 1981, nos Estados Unidos, possuía somente o sistema CRISPR2, não possuindo genes *cas* funcionais.

O sistema CRISPR-cas9, original do sistema CRISPR-cas do tipo II, ganhou grande interesse por ser facilmente programável para reconhecer genes específicos e permitir a edificação desse gene, tanto para reparar mutações (restaurando a função do gene) quanto para introduzir mutações novas (Lopes DAS et al. 2012; Castrignano SB, 2017). Na pesquisa com modelos animais o sistema é capaz de alterar permanentemente o gene mutante e restaurar a função do produto do gene. O uso do sistema CRISPR na engenharia genética e como uma ferramenta para o tratamento médico de doenças vem

ganhando destaque, porém envolvem questões éticas importantes que precisam ser debatidas (Vasconcelos MJV, Figueiredo JEF, 2015).

REFERÊNCIAS

- Arthur, M.; Quintiliani, J. R. Regulation of VanA- and VanB-type glycopeptide resistance in enterococci. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, p. 375–381, fev. 2001.
- Barbosa-Ribeiro M., De-Jesus-Soares A., Zaia A. A., Ferraz C. C. R., Almeida J. F. A., Gomes B. P. F. A. Antimicrobial susceptibility and characterization of virulence genes of *Enterococcus faecalis* isolates from teeth with failure of the endodontic treatment. **J Endod**, v. 42, p. 1022-1028, 2016.
- Billstrom, H.; Lund, B.; Sullivan, A.; Nord, C. E. Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*. **Int J Antimicrob Agents**, v. 32, n. 5, p. 374-377, ago 2008.
- Biswas, P.P.; Dey, S.; Sen, A.; Adhikari, L. Molecular characterization of virulence genes in vancomycin-resistant and vancomycin-sensitive enterococci. **J Glob Infect Dis**. v. 8, p. 16-24, jan-mar. 2016.
- Buultjens, A. H.; Lam, M.M.; Ballard, S.; Monk, I. R.; Mahony, A. A.; Grabsch, E. A.; Grayson, M. L.; Pang, S.; Coombs, G. W.; Robinson, J.; Seemann, O. T.; Johnson, P.D.; Howden, B. P.; Stinear, T. P. Evolutionary origins of the emergent ST796 clone of vancomycin resistant *Enterococcus faecium*. **PeerJ**, v. 5, p. e2916, jan. 2017.
- Caplin, J. L.; Hanlon, G. W.; Taylor, H. D. Presence of vancomycin and ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* of epidemic clonal complex-17 in wastewaters from the south coast of England. **Environ. Microbiol.**, v. 10, p. 885–892, abr. 2008.
- Castrignano, S. B. Enzimas em biologia molecular III. Tecnologia CRISPR-Cas9. **Bol Inst Adolfo Lutz**, p. 1-3, 2017.
- Chow, J. W. Aminoglycoside resistance in Enterococci. **Arch Clin Infect Dis**. v. 31, p. 586-589, ago. 2000.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30^a ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**; 2020.
- Conceição, N.; Darini, A. L. C.; Palazzo, I. C. V.; Oliveira, C. C. H. B.; Oliveira, A. G. First report of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in Uberaba, Minas Gerais state. **Braz. J. Microbiol.**, v. 41, p. 34-36, 2010.
- Conceição, N.; Silva, L. E. P.; Darini, A. L. C.; Silva, A. P.; Oliveira, A. G. Penicillin-resistant, ampicilina-susceptible *Enterococcus faecalis* of hospital origin: *pbp4* gene polymorphism and genetic diversity. **Genet Evol**, v. 28, p. 289-295, 2014.
- Courvalin, P. Vancomycin resistance in gram positive cocci. **Clin. Infect. Dis.**, v. 42, p. 25–34, jan. 2006.
- Depardieu, F.; Kolbert, M.; Pruul, H.; Bell, J.; Courvalin, P. VanD-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. **Antimicrob. Agents Chemother**. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, p. 3892–3904, out. 2004.

Donabedian, S. M.; Thal, L. A.; Hershberger, E.; Perri, M. B.; Chow, J. M.; Bartlett, P.; Jones, R.; Joyce, K.; Rositer, S.; Gay, K.; Johnson, J.; Mackinson, C.; Debess, E.; Madden, J.; Angulo, F.; Zervos, M. j. Molecular characterization of gentamicin-resistant enterococci in the United States: evidence of spread from animals to humans through food. **J Clin Microbiol.** v. 41, p. 1109-1113, 2003.

Duez, C.; Zorzi, W.; Sapunarcic, F.; Amoroso, A.; Thamm, I.; Coyette, J. The penicillin resistance of *Enterococcus faecalis* JH2-2r results from an overproduction of the low-affinity penicillin-binding protein PBP4 and does not involve a psr-like gene. **Microbiology.** v. 147, p. 2561-2569, set. 2001.

Espíndola L. C., Nascimento M. V. M. R., Souto R. M., Colombo A. P. V. Antimicrobial susceptibility and virulence of *Enterococcus* ssp. isolated from periodontitis-associated subgingival biofilm. **J Periodontol**, v. 92, p. 1588-1600, 2021

Franz, C.M.A.P.; Belkum, M. J. V.; Holzapfel, W. H.; Abriouel, H.; Gálvez, A. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. **FEMS microbiol. rev.**, v. 31, n. 3, p. 293-310, abr. 2007.

Fontana, R.; Aldegheri, M.; Ligozzi, M.; Lopez, H.; Sucari, A.; Satta, G. Overproduction of a low-affinity penicillin-binding protein and high-level ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 38, p. 1980-1983, set. 1994.

Gilmore, M. S.; Clewell, D. B.; Ike, Y.; Shankar, N. Enterococci: from commensal to leading causes of drug resistant infections. **Boston: Mass Eye and Ear Infirmary.** 2014.

Golinska, E.; Tomusiak, A.; Gosiewski, T.; Wiecek, G.; Machul, A.; Mikolajczyk, D.; Bulanda, M.; Heczko, P.B.; Strus, M. Virulence factors of *Enterococcus* strains isolated from patients with inflammatory bowel disease. **World J of Gastroenterol.** v. 19, p. 3562-3572, jun. 2013.

Golob M., Pate M., Kusar D., Dermota U., Avbersek J., Papic B. Antimicrobial Resistance and virulence genes in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from humans and retail red meat. **BioMed Res Int**, p. 2815279, 2019.

Heikens, E.; Bonten, M. J.; Willems, R. J. Enterococcal surface protein esp is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162. **J Bacteriol.** v. 189, p. 8233-8240, nov. 2007.

Hryhorowicz, M.; Lipinski, D.; Zeyland, J.; Słomski, R. CRISPR/Cas9 Immune System as a Tool for Genome Engineering. **Arch. Immunol. Ther. Exp.** v. 65, p. 233-240, 2017.

Homan, W. L.; Tribe, D.; Poznanski, S.; Li, M.; Hogg, G.; Spalburg, E.; Van Embden, J. D. A.; Willems, R. J. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. **J. Clin. Microbiol.** v. 40, p. 1963-1971, jun. 2002.

Iseppi, R.; Messi, P.; Anacarso, I.; Bondi, M.; Sabia, C.; Condò, C.; De Niederhausern, S. Antimicrobial resistance and virulence traits in *Enterococcus* strains isolated from dogs and cats. **New Microbiol**, v. 38, p. 369-378, jul. 2015.

Jiang, F.; Doudna, JA. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms. **Annu Rev Biophys**, v. 46, p. 505-529, 2017.

Kang, C.; Oh, S. J.; Shin, Y.; Han, S.; Nam, I.; So, J. Bioremediation of lead by ureolytic bacteria isolated from soil at abandoned metal mines in South Korea. **Ecol Eng**. v. 74, p. 402-407, 2015.

Kiruthiga A., Padmavathy K., Shabana P., Naveenkumar V., Gnanadesikan S., Malaiyan J.. Improved detection of *esp*, *hyl*, *asa1*, *gelE*, *cylA* virulence genes among clinical isolates of Enterococci. **BMC Res Notes**, v.13, p.1-7, 2020.

Kristich C. J.; Rice L. B.; Arias C. A. Enterococcal Infection-Treatment and Antibiotic Resistance. Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection. fev. 2014.

Lebreton, F.; Depardieu, F.; Bourdon, N.; Fines-Guyon, M.; Berger, P.; Camiade, S.; Leclercq, R.; Courvalin, P.; Cattoir, V. D-Ala-d-Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. **Antimicrob**, v. 55, p. 4606-4612, out. 2011.

Lebreton, F.; Riboulet-Bisson, E.; Serror, P.; Sanguinetti, M.; Posteraro, B.; Torelli, R.; Hartke, A.; Auffray, Y.; Giard, J.C. *ace*, which encodes an adhesion in *Enterococcus faecalis*, is regulated by Ers and is involved in virulence. **Infect Immun**. v. 77, p. 2832-2839, jul. 2009.

Lopes, D. A. S.; Pessoa, M. H. N.; Santos, R. S.; Barbosa, M. S. A produção de insulina artificial através da tecnologia do DNA recombinante para o tratamento de diabetes mellitus. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 10, p. 234-245, 2012.

Madsen, K.T.; Skov, M.N.; Gill, S.; Kemp, M. Virulence factors associated with *Enterococcus faecalis* infective endocarditis: a mini review. **Open Microbiol J**, v. 11, p. 1-11, mar. 2017.

Magnet, S.; Blanchard, J. S. Molecular Insights into Aminoglycoside Action and Resistance. **Chem. Rev.**, v. 105, p. 477-497, 2005.

Medeiros, A. W.; Pereira, R. I.; Oliveira, D. V.; Martins, P. D.; D'Azevedo, P. A.; Van Der Sand, S.; Frazzon, J.; Frazzon, A. P. Molecular detection of virulence factors among food and clinical *Enterococcus faecalis* strains in south Brazil. **Braz J Microbiol**. v. 45, p. 327-332, abr. 2014.

Mikalsen, T., Pedersen, T.; Willems, R.; Coque, T. M.; Werner, G.; Sadowy, E.; Van, S. W.; Jensen, L. B.; Sundsfjord, A.; Hegstad, K. Investigating the mobilome in clinically important lineages of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. **BMC Genomics**, v. 16, p. 282, abr. 2015.

Murray B.E., Arias C.A., Nannini E.C. Glycopeptides (Vancomycin and Teicoplanin), Streptogramins (Quinupristin-Dalfopristin), Lipopeptides (Daptomycin), and Lipoglycopeptides (Telavancin). Eighth edition. Philadelphia: Elsevier, p. 376-400, 2015.

Murray, B. E.; Baron, E. J.; Jorgensen, J. H.; Landry, M. L.; Pfaller, M. A. **J Clin Microbiol.** 9. ed. Washington; ASM PRESS, 2007.

Murray, B.E. β -lactamase-producing enterococci. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 36, p. 2355-2359, nov. 1992.

Nilsson, O. Vancomycin resistant enterococci in farm animals—occurrence and importance. **Infect Ecol Epidemiol.**, v. 2, p. 16959, abr. 2012.

Palmer, K. L. P.; Godfrey, A.; Griggs, V. N.; Kos, J.; Zucker, C.; Desjardins, G.; Cerqueira, D.; Gevers, S.; Walker, J.; Wortman, M.; Feldgarden, B.; Haas, Birren, B.; Gilmore, M. S. Comparative genomics of enterococci: variation in *Enterococcus faecalis*, clade structure in *E. faecium*, and defining characteristics of *E. gallinarum* and *E. casseliflavus*. **MBio.** v. 3, p. 318–11, 2012.

Palmer, K. L.; M. S. Gilmore. Multidrug-resistant enterococci lack CRISPR-*cas*. **mBio**, v. 4, p. e00227-10, out. 2010.

Pandey, A.; Verma, H.; Asthana, A. K.; Madan, M. Extended spectrum beta lactamase producing *Proeus penneri*: a rare missed pathogen? **Indian J Pathol Microbiol.** v. 57, p. 489-491, ago. 2014.

Pereira, A.L.; Pita, J.R. Alexander Fleming (1881-1955) Da descoberta da penicilina (1928) ao Prémio Nobel (1945). **Revista da Faculdade de Letras**, v. 6, p. 129-151, 2005.

Pereira, T. C. **Introdução à Técnica de CRISPR.** Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de genética, p. 250, 2016.

Poeta, P.; Radhouani, H.; Pinto, L.; Martinho, A.; Rego, V.; Rodrigues, R.; Gonçalves, A.; Rodrigues, J.; Estepa, V.; Torres, C.; Igrejas, G. Wild boars as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* of diferente phylogenetic groups. **J Basic Microbiol.** v. 49, p. 584-588, 2009.

Ramirez, M. S.; Tolmasky, M. E. Aminoglycoside modifying enzymes. **Drug Resist Updat.**, v. 13, p. 151–171, dez. 2010.

Reynolds, P.E.; P. Courvalin. Vancomycin resistance in enterococci due to synthesis of precursors terminating in D-alanyl-D-serine. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, p. 21–25, jan. 2005.

Rice, L. B. Enterococci resistance of antimicrobial: Treatment mechanisms and implications. **Emerg Infect Dis.**, v. 7, n. 2, p. 28-43, 2001.

- Rich, R. L.; Kreikemeyer, B.; Owens, R. T.; Labrenz, S.; Narayana, S. V.; Weinstock, G. M.; Murray, B. E.; Hook, M. Ace is a collagen-binding MSCRAMM from *Enterococcus faecalis*. **J Biol Chem**. v. 274, p. 26939-26945, out. 1999.
- Rozdzinski, E.; Marre, R.; Susa, M.; Wirth, R.; Muscholl-Silberhorn, A. Aggregation substance-mediated adherence of *Enterococcus faecalis* to immobilized extracellular matrix proteins. **Microbial Pathogenesis**. v. 30, p. 211-220, abr. 2001.
- Shaghaghian, S.; Pourabbas, B.; Alborzi, A.; Askarian, M.; Mardaneh, J. Vancomycin-resistant enterococci colonization in chronic hemodialysis patients and its risk factor in southern Iran (2006-2006). **Iran Red Crescent Med J**. v. 12, p. 686-691, out. 2012.
- Shepard, B. D.; Gilmore, M. S. Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. **Microbes. Infect.**, v. 4, p. 215–224, fev. 2002.
- Singh, K. V.; Nallapareddy, S. R.; Sillanpää, J.; Murray, B. E. Importance of collagen adhesin ace in pathogenesis and protection against *Enterococcus faecalis* experimental endocarditis. **PLoS Pathogens**. v. 6, p. 1-13, jan. 2010.
- Teixeira, N.; Santos, S.; Marujo, P.; Yokohata, R.; Iyer, V.S.; Nakayama, J.; Hancock, L.E.; Serror, P.; Silva-Lopes, F. The incongruent gelatinase genotype and phenotype in *Enterococcus faecalis* are due to shutting off the ability to respond to the gelatinase biosynthesis-activating pheromone (GBAP) quorum-sensing signal. **Microbiology**, v. 158, p. 519-528, fev. 2012.
- Tendolkar, P. M.; Baghdayan, A. S.; Shankar, N. The N-terminal domain of enterococcal surface protein, Esp, is sufficient for Esp-mediated biofilm enhancement in *Enterococcus faecalis*. **J Bacteriol**, v. 187, p. 6213-6222, set. 2005.
- Top, J.; Willems, R.; Bonten, M. Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital adapted pathogen. **FEMS Immunol. Med Microbiol**, v. 52, p. 297–308, abr. 2008.
- Uttley, A. H.; Collins, C. H.; Naidoo, J.; George, R. C. Vancomycin-resistant enterococci. **Lancet**. v. 1, p. 57-58, jan. 1988.
- Vakulenko, S. B.; Donabedian, S. M.; Voskresenskiy, A. M.; Zervos, M. J.; Lerner, S. A.; Chow, J. W. Multiplex PCR for detection of aminoglycoside resistance genes in enterococci. **Antimicrob Agents Chemother**. v 47, p 1423-6, abr. 2003.
- Vakulenko, S. B.; Mobashery, S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. **Clin Microbiol Rev.**, v. 16, p. 430–450, jul. 2003.
- Vasconcelos, M. J. V. de; Figueiredo, J. E. F. **Tecnologia CRISPR-Cas para edição gênômica**. Sete Lagoas, MG: EMPRAPA, dez. 2015. (Documentos / Embrapa Milho e Sorgo, 197).
- Vebo, H. C.; Solheim, M.; Snipen, L.; Nes, I. F.; Brede, D.A. Comparative genomic analysis of Pathogenic and probiotic *Enterococcus faecalis* isolates, and their

transcriptional responses to growth in human urine. **PLoS ONE**, v. 5, p. e12489, ago. 2010.

Wagner, T.; Joshi, B.; Janice, J.; Askarian, F.; Skalko-Basnet, N.; Hagestad, O. C.; et. al. *Enterococcus faecium* produces membrane vesicles containing virulence factors and antimicrobial resistance related proteins. **J Proteomics**. v. 187, p. 28-38, set. 2018.

Waksman S.A. What is an antibiotic or an antibiotic substance? **Mycologia**, v. 39, p. 565–569, 1947.

Waters, C. M.; Antiporta, M. H.; Murray, B. E.; Dunny, G. M. Role of the *Enterococcus faecalis gelE* protease in determination of cellular chain length, supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins. **J Bacteriol**. v. 185, p. 3613-3623, jun. 2003.

Werner, G.; Klare, I.; Fleige, C.; Witte, W. Increasing rates of vancomycin resistance among *Enterococcus faecium* isolated from German hospitals between 2004 and 2006 are due to wide clonal dissemination of vancomycin-resistant enterococci and horizontal spread of vanA clusters. **Int J Med Microbiol**. v. 298, p. 515–527, jul. 2008.

Willems, R. J. L.; Top, J.; Santen, M. V.; Robinson, D. A.; Coque, T. M.; Baquero, F.; Grundmann, H.; Bonten, M. J. M. Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. **Emerg Infect Dis**. v. 11, p. 821-828, jun. 2005.

Woodford, N. Epidemiology of the genetic elements responsible for acquired glycopeptide resistance in enterococci. **Microb Drug Resist.**, v. 7, p. 229–236, 2001.

Woodford, N.; Johnson, A.; Morrison, D.; Current perspectives on glycopeptide resistance. **J Clin Microbiol Rev**. v. 8, p. 585-615, 1995.

Xu, Z.; Li, L.; Shirliff, M. E.; Peters, B. M.; Peng, Y.; Alam, M. J.; Yamasaki, S.; Shi, L. First report of class 2 integron in clinical *Enterococcus faecalis* and class 1 integron in *Enterococcus faecium* in South China. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v. 68, p. 315-7, nov. 2010.

Yang F., Zhang S., Shang X., Wang X., Yan Z., Li H. Short communication: 507 Antimicrobial resistance and virulence genes of *Enterococcus faecalis* isolated from 508 subclinical bovine mastitis cases in China. **J Dairy Sci**, v.102, p. 140–144, 2019.

APÊNDICE A (artigo submetido)**Hospital-adapted strains of *E. faecalis* and *E. faecium* harboring virulence genes show the concomitant presence of CRISPR loci and antibiotic resistance determinants.**

Isabela Sguilla Rotta ^a, Wellington Francisco Rodrigues ^b Celso Tadeu Barbosa Dos Santos ^a, Hilario Cuquetto Mantovani ^c, Adriana Gonçalves De Oliveira ^a, Alessandra Barbosa Ferreira Machado ^d, Aline Dias Paiva ^{a*}

^a Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, Brazil.

^b Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, Brazil.

^c Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

^d Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil.

ABSTRACT

In this study, we evaluated the antimicrobial susceptibility, the presence of gene-encoding virulence factors and CRISPR systems, as well as the ability to produce lytic enzymes among clinical *E. faecalis* (n=22) and *E. faecium* (n=22) isolates. All enterococci isolates showed phenotypes of multi-drug resistance. Ten *E. faecalis* isolates exhibited high-level gentamicin resistance phenotype, several of them (n=6) harboring the *aac(6')Ie-aph(2'')**Ia* gene. The gene *vanA* was the most frequent among vancomycin-resistant *E. faecium*. High prevalence of the virulence genes *esp* and *efaA* were observed; *hyl* gene was more associated with *E. faecium*, while *ace* and *efaA* genes were more frequently detected in *E. faecalis*. Caseinase activity was frequently detected among the isolates. Gelatinase and DNase activities predominated among *E. faecalis*, while hemolytic capability was

frequent among *E. faecium* isolates. Twenty-nine isolates showed at least one CRISPR system investigated. Several *E. faecalis* isolates harbored the *aac(6')-Ie-aph(2'')*-*Ia* gene and a CRISPR loci. CRISPR loci were positively correlated to *efaA* and *gelE* genes, and gelatinase and DNase activities, while CRISPR loci absence was related to *hyl* gene presence. These results show that hospital-adapted strains of *E. faecalis* and *E. faecium* harboring virulence genes show the concomitant presence of CRISPR loci and antibiotic resistance determinants.

Keywords: CRISPR; *Enterococcus*; antibiotic resistance; virulence factors.

1. Introduction

Enterococcus spp. are widely distributed in the environment, including soil, water, plants, food, and the gut microbiota of humans and other animals. They can survive in stressful conditions, such as high concentrations of NaCl (6.5%), and wide temperature ranges (10 °C to 45 °C). Beyond their ubiquitous, enterococci, especially the species *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*, have been related to human opportunistic infections in the urinary tract, abdomen, skin, soft tissues, circulatory system, and bacteremia [1].

An important feature related to clinical isolates of *E. faecalis* and *E. faecium* is their intrinsic antimicrobial resistance, as well as the resistance acquired by horizontal gene transfer, with the incorporation of mobile genetic elements (MGE) containing drug resistance determinants [2]. In addition to high resistance to antimicrobials, other virulence factors also contribute to the persistence of enterococci in the hospital environment. Expression of virulence factors has been associated with host immune system evasion, degradation of substrates, and adhesion to cell surfaces among clinical isolates of enterococci. Some common phenotypes of highly virulent strains include the

production of aggregation substance (AS), gelatinase (Gel), extracellular surface proteins (Esp), cytolysin (Cyl), hyaluronidase (Hyl), and collagen-binding protein (Ace), in addition to biofilm formation, and antimicrobial peptide production [3, 4].

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) systems are considered an acquired immune system present in many strains of prokaryotes. CRISPR is a type of genome defense against DNA invasion, that could hamper MGE uptake and phage infections, thereby contributing to bacterial genome stability [5]. In enterococci isolates, three Type II CRISPR systems (CRISPR1-*cas*, CRISPR2 and CRISPR3-*cas*) have been reported [5-7].

The present study aimed to assess the virulence arsenal of hospital-acquired *E. faecalis* and *E. faecium* isolates, regarding the presence of gene-encoding virulence factors and CRISPR systems, the antimicrobial susceptibility profile, and the phenotypic ability of the strains to secrete soluble virulence factors.

2. Materials and methods

2.1. Microorganisms and growth conditions

We selected 22 *E. faecalis* and 22 *E. faecium* previously isolated from patients attended at a tertiary hospital, in Uberaba, between 2007 and 2019. The identity of the bacterial strains was confirmed using classical microbiological phenotypic methods and 16S rDNA sequencing. All isolates were stored on 20% glycerol-containing Brain Heart Infusion (BHI) broth, at -80 °C. For culturing experiments, BHI medium (broth or agar), aerobiosis incubation (without shaking) and temperature of 37 °C were used.

2.2. DNA extraction and detection of gene-encoding virulence factors

Genomic DNA was extracted using the phenol-chloroform method [8], with minor modifications: 200 μ L of proteinase K was used for membrane disrupting and the samples were incubated for 1h at 50 °C. The quality and quantification of the extracted DNA was performed in a NanoDrop (Thermo Scientific) spectrophotometer. Samples were kept at -20 °C for further analysis.

The presence of the genes *gelE*, *cylA*, *hyl*, *asaI*, *esp*, *efaA* and *ace* was evaluated by PCR amplification, following the conditions described previously [9-11] (Table S1). PCR reactions were performed in a total volume of 25 μ L, containing 500 U Taq Polymerase (Ludwig), 1 \times Taq buffer (5 mM KCl Tris-HCl, pH 8.5), 50 mM MgCl₂, 10 mM dNTPs (Ludwig), 0,2 μ M forward and reverse primer (Invitrogen), and 50 ng of DNA. Incubation at 94 °C for 5 min was used as initial denaturation step, followed by 35 cycles of amplification, consisting of: denaturation step at 94 °C for 1 min, annealing for 1 min at different temperatures depending on the target gene (Table S1), and elongation step at 72 °C for 1 min. The final elongation was conducted at 72 °C for 5 min. *E. faecalis* ATCC 29212 (*gelE* and *cylA*) and *E. faecium* FAIR-E 77 (*efaA* and *ace*) were used as control strains.

The genes encoding resistance to vancomycin (*vanA*, *vanB*, *vanC1* and *vanC2-3*), and aminoglycoside (*aac(6')-Ie-aph(2'')**Ia*, *aph(2'')**-IIa*, *aph(2'')**-IIIa*, *aph(2'')**-IVa*, *aph(3')**-IIIa* and *ant(4')**-Ia*) were also detected by PCR assays, following the conditions described in the literature [12, 13] (Table S1).

The amplification products were mixed to ethidium bromide (20 mg/mL), analyzed in agarose gel electrophoresis (1,5%), at 100 V, and visualized under UV-transilluminator. The presence of fragments with the expected molecular size was

considered as positive result. DNA ladder (1000 bp, Ludwig) was included as a molecular size marker.

2.3. Detection of CRISPR systems

The investigation of the three CRISPR systems, CRISPR1-cas, CRISPR2 and CRISPR3-cas, in *E. faecalis* and *E. faecium* strains was performed by PCR amplification, following previously described conditions [14]. The bacterial strains were first screened for internal regions of CRISPR1 *csn1* and CRISPR3 *csn1*, and negative strains were re-evaluated with another pair of primers annealing outside the conserved locus position (CRISPR1-cas or CRISPR3-cas) (Table S1).

2.4. Antimicrobial susceptibility testing

Susceptibility to clindamycin (2 µg), gentamicin (10 µg), penicillin G (10U), ampicillin (10 µg), tetracycline (30 µg), chloramphenicol (30 µg), erythromycin (15 µg), amikacin (30 µg), streptomycin (10 µg) and rifampicin (5 µg) was assessed by disk-diffusion method, on Mueller-Hinton Agar (Merck Co., Germany), based on Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines [15]. Multidrug-resistant (MDR) isolates were defined as those expressing resistance to three or more classes of the antimicrobial agents evaluated [16]. *E. faecalis* ATCC 29212 and *E. faecium* ATCC BAA-2127 were used as quality control strains.

High-level gentamicin resistance (HLGR) was determined on gentamicin containing BHI agar (500 µg/mL) [15]. After incubation (37 °C, aerobiosis), the growth of more than one colony was considered positive results (HLGR strain). The minimal inhibitory concentration (CIM) of vancomycin was determined by a broth microdilution method, considering vancomycin-resistant strains that could grow in concentrations ≥ 32

$\mu\text{g/mL}$, and vancomycin-susceptible the cultures that grew only when vancomycin was $\leq 4 \mu\text{g/mL}$ [15].

2.5. Phenotypic assessment of secreted virulence factors

The ability to produce soluble virulence factors was determined using culture-dependent assays. Briefly, an agar base supplemented with the specific substrate and biochemical indicators was added for detecting the target enzymes (by direct reaction or pH change). Microbial strains were grown in aerobiosis, at 37°C on BHI agar before each assay. Stationary cultures (24 hours growth) were spotted into agar plates containing the specific medium and substrate for the detection of gelatinase (Luria-Bertani agar, supplemented with 3% gelatin), caseinase (TSA (Tryptic Soy agar) with 3% milk), lipase (LB agar supplemented with 2 g/L of CaCl_2 and 10 g/L of Tween 80), DNase (DNase agar), and haemolysin (agar plates containing 5% of defibrinated sheep blood). The plates were incubated in aerobiosis, at 37°C , for 24-48 hours. The presence of clear zones or opaque zones (for lipase) surrounding the bacterial colonies indicated positive results for the enzyme production.

2.6. Statistical Analysis

The data were tabulated in Microsoft® Excel and analyzed using IBM SPSS statistics 21. For descriptive analysis, absolute (N) or relative (%) frequencies were used, and the confidence intervals were used considering 95% confidence level. Binomial logistic regression was used to verify the associations between the variables of interest. To indicate the effect sizes, Odds ratio and confidence intervals (95%) were used. The associations were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results

Twenty-two *E. faecalis* and twenty-two *E. faecium* strains were selected for this study. Most of the *E. faecalis* isolates were obtained from secretion samples (31.8%), and samples of urine were the main source of *E. faecium* strains (59.9%). Other clinical specimens included wound (15.9%), blood (11.3%), peritoneal fluid (4.5%), anal swab (4.5%), liquor (2.2%), and bile (2.2%) (Table S2).

Antimicrobial susceptibility profiles showed multi-drug resistance for all the enterococci evaluated. The forty-four bacterial isolates (100.0%) showed resistance to clindamycin (intrinsic resistance). Regarding the aminoglycosides, 86.3% of the strains were resistant to streptomycin, and 50.0% were gentamicin resistant. Resistance to erythromycin and amikacin was also prevalent among *E. faecium* strains (86.3% and 81.8%, respectively). All *E. faecalis* strains were susceptible to vancomycin, and the majority (95.4%) of *E. faecium* was susceptible to chloramphenicol (Table 1).

Table 1 - Antimicrobial resistance frequencies among *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains. Disk diffusion method was used for antimicrobial susceptibility testing.

	<i>E. faecalis</i> (n = 22)	<i>E. faecium</i> (n = 22)	Total (n = 44)
AMK	15 (68.1)	18 (81.8%)	33 (75.0%)
AMP	3 (13.6%)	11 (50.0%)	14 (31.8%)
CHL	4 (18.1%)	1 (4.5%)	5 (11.3%)
CLI	22 (100%)	22 (100%)	44 (100.0%)
ERY	13 (59.0%)	19 (86.3%)	32 (72.7%)
GEN	11 (50.0%)	11 (50.0%)	22 (50.0%)
PEN	11 (50.0%)	15 (68.1%)	26 (59.0%)
RIF	3 (13.6%)	17 (77.2%)	20 (45.4%)
STR	17 (77.2%)	21 (95.4%)	38 (86.3%)
TET	10 (45.4%)	11 (50.0%)	21 (47.7%)

AMK, amikacin; AMP, ampicillin; CHL, chloramphenicol; CLI, clindamycin; ERY, erythromycin; GEN, gentamicin; PEN, penicillin; RIF, rifampicin; STR, streptomycin; TET, tetracycline.

High-level gentamicin resistance (HLGR) phenotype was observed in 90.9% of the *E. faecalis* isolates showing resistance to gentamicin in the disk diffusion method; only the isolate 175 did not grow on gentamicin-containing BHI agar (500 µg/mL). Six HLGR *E. faecalis* isolates carried the *aac(6')Ie-aph(2'')Ia* gene, and another HLGR isolate (isolate 904) contained the *aph(3')-IIIa* gene. The *aac(6')Ie-aph(2'')Ia* gene was also detected in four gentamicin-susceptible *E. faecalis* isolates (Table 2).

Table 2 – High-level gentamicin resistance (HLGR) phenotype and presence of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes among *E. faecalis* isolates.

Isolate	Disk-diffusion	HLGR phenotype	<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>	<i>aph(2'')-IIa</i>	<i>aph(2'')-IIIa</i>	<i>aph(2'')-Iva</i>	<i>aph(3')-IIIa</i>	<i>ant(4')-Ia</i>
20	Resistant	+	+	-	-	-	-	-
34	Susceptible	-	-	-	-	-	-	-
35	Resistant	+	+	-	-	-	-	-
58	Resistant	+	-	-	-	-	-	-
74	Resistant	+	+	-	-	-	-	-
155	Susceptible	-	-	-	-	-	-	-
157	Resistant	+	+	-	-	-	-	-
175	Resistant	-	-	-	-	-	-	-
221	Susceptible	-	-	-	-	-	-	-
228	Susceptible	-	+	-	-	-	-	-
240	Resistant	+	-	-	-	-	-	-
250	Resistant	+	-	-	-	-	-	-
291	Resistant	+	-	-	-	-	-	-
313	Resistant	+	+	-	-	-	-	-
715	Susceptible	-	-	-	-	-	-	-
904	Resistant	+	+	-	-	-	+	-
911	Susceptible	-	-	-	-	-	-	-
912	Susceptible	-	+	-	-	-	-	-
913	Susceptible	-	-	-	-	-	-	-
914	Susceptible	-	+	-	-	-	-	-
915	Susceptible	-	+	-	-	-	-	-
916	Susceptible	-	-	-	-	-	-	-

Legend: (+) positive; (-) negative.

The vancomycin-resistance phenotype (growth in ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$ vancomycin) was observed in 50.0% of the *E. faecium* isolates (n=11), but in none of the *E. faecalis*. The *vanA* genotype was identified in 36.36% (4/11) of the phenotypically vancomycin-resistant isolates. The *vanB*, *vanC* and *vanC2-3* genes were not detected in *E. faecium* (Table 3).

Table 3 – Vancomycin-resistance phenotype and presence of genes encoding vancomycin resistance among *E. faecium* isolates.

Isolate	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	Profile	<i>vanA</i>	<i>vanB</i>	<i>vanC1</i>	<i>vanC2-3</i>
126	2	Susceptible	-	-	-	-
293	>64	Resistant	+	-	-	-
324	>64	Resistant	+	-	-	-
327	>64	Resistant	-	-	-	-
349	4	Susceptible	-	-	-	-
373	>64	Resistant	-	-	-	-
379	2	Susceptible	-	-	-	-
386	2	Susceptible	-	-	-	-
391	>64	Resistant	-	-	-	-
413	>64	Resistant	-	-	-	-
454	>64	Resistant	-	-	-	-
489	4	Susceptible	-	-	-	-
517	>64	Resistant	+	-	-	-
884	2	Susceptible	-	-	-	-
1005	4	Susceptible	-	-	-	-
1031	2	Susceptible	-	-	-	-
1034	2	Susceptible	-	-	-	-
1058	2	Susceptible	-	-	-	-
1089	>64	Resistant	+	-	-	-
1105	4	Susceptible	-	-	-	-
1123	>64	Resistant	-	-	-	-
1159	>64	Resistant	-	-	-	-

Legend: (+) positive; (-) negative.

All virulence genes evaluated in this study were detected among the enterococci isolates: *esp* (28/44) and *efaA* (26/44) were the most prevalent, while *cylA* (5/44) was detected the least in the bacterial cultures under investigation. The gene *hyl* was found in 72.7% of the *E. faecium* strains, but in only one *E. faecalis* isolate (4.5%), and *hyl* was thirty-one times (OR=31.4) more associated with *E. faecium* when compared to *E.*

faecalis ($p < 0.05$). The genes *ace* and *efaA* were more frequently detected among *E. faecalis* isolates (68.1% and 86.3% respectively) ($p < 0.001$), being their presences forty-five (OR=45.0) and thirteen (OR=13.5) times more associated to *E. faecalis* when compared to *E. faecium* (Table 4).

Our results showed that *gelE* gene was present in 54.5% of the isolates, and gelatinase activity was phenotypically detected in 43.1% of the enterococci evaluated (Table 4). It is important to note that gelatinase activity was almost six times more prevalent among *E. faecalis* isolates ($p < 0.05$; OR=5.95). Additionally, DNase activity was twenty-one times more associated with *E. faecalis* ($p < 0.05$; OR=21.0), while *E. faecium* isolates showed more hemolytic capability ($p < 0.05$; OR=7.11). The capacity to hydrolyze casein was detected in almost all the enterococci isolates (95.4%), and lipolytic activity was the least frequent among the isolates (Table 4).

Regarding the presence of type II CRISPR systems, twenty-nine enterococci isolates (65.9%) showed at least one of the elements investigated (CRISPR1-cas, CRISPR2 and/or CRISPR3-cas). Almost two-thirds of the enterococci isolates (27/44) harbored a complete CRISPR-cas locus (CRISPR1-cas or CRISPR3-cas), and only five isolates (two *E. faecalis* and three *E. faecium*; 11.3%) carried an orphan CRISPR2 locus (Table 4).

Overall, *E. faecalis* was fourteen times more associated with the presence of CRISPR systems when compared to *E. faecium* isolates ($p < 0.05$; OR=14.44). CRISPR1-cas (CRISPR1-cas *csn1*- and CRISPR1-cas-positive strains) was more frequently detected among *E. faecalis* when compared to the *E. faecium* group ($p < 0.05$; OR=9.67). CRISPR3-cas was the most frequently detected element among the *E. faecium* isolates evaluated (8/22; CRISPR1-cas *csn1*- and CRISPR1-cas-positive strains) (Table 4).

Table 4 - Virulence genes, virulence factors and CRISPR systems detection among *Enterococcus faecalis* (n = 22) and *Enterococcus faecium* (n = 22) clinical strains.

Characteristic	Total (n = 44)	<i>E. faecalis</i> (n = 22)	<i>E. faecium</i> (n = 22)	P-value	Odds ratio	Lower Confidence Interval	Upper Confidence Interval
Virulence genes							
<i>ace</i>	16 (36.3%)	15 (68.1%)	1 (4.5%)	<0.001*	45.0	4.998	405.13
<i>asa1</i>	23 (52.2%)	13 (59.0%)	10 (45.4%)	0.56	2.32	0.12	41.91
<i>cylA</i>	5 (11.3%)	4 (18.1%)	1 (4.5%)	0.99	0.99	0.001	628.20
<i>efaA</i>	26 (59.0%)	19 (86.3%)	7 (31.8%)	<0.001*	13.57	2.99	61.59
<i>esp</i>	28 (63.6%)	11 (50.0%)	17 (77.2%)	0.76	1.45	0.13	16.20
<i>gelE</i>	24 (54.5%)	13 (59.0%)	11 (50.0%)	0.789	1.39	0.10	17.97
<i>hyl</i> **	17 (38.6%)	1 (4.5%)	16 (72.7%)	0.017*	31.4	1.83	540.80
Phenotypic test							
Gelatinase	19 (43.1%)	14 (63.6%)	5 (22.7%)	0.008*	5.95	1.57	22.33
Caseinase	42 (95.4%)	21 (95.4%)	21 (95.4%)	1.000	1.00	0.05	17.10
Lipase	8 (18.1%)	6 (27.2%)	2 (9.0%)	0.134	0.26	0.04	1.5
DNase	32 (72.7%)	21 (95.4%)	11 (50.0%)	0.006*	21.0	2.39	184.51
Hemolytic activity **	22 (50.0%)	6 (27.2%)	16 (72.7%)	0.004*	7.11	1.89	26.80
CRISPR system							
CRISPR detection	29 (65.9%)	20 (90.9%)	9 (40.9%)	0.002*	14.44	2.68	77.80
CRISPR1-cas	21 (47.7%)	16 (72.7%)	5 (22.7%)	0.002*	9.67	2.31	35.65
CRISPR2	5 (11.3%)	2 (9.0%)	3 (13.6%)	0.637	1.57	0.23	10.51
CRISPR3-cas	17 (38.6%)	9 (40.9%)	8 (36.3%)	0.075	1.21	0.36	4.08

Estimates represent the log odds of "specie = enterococcus faecalis" vs. "specie = enterococcus faecium".

*Statistical difference (P-value<0.05.). **Estimates represent the log odds of "specie = enterococcus faecium" vs. "specie = enterococcus faecalis".

The simultaneous presence of the three CRISPR systems was observed in two *E. faecium* isolates. Concomitant presence of CRISPR1-cas and CRISPR2 was observed in one *E. faecalis* isolate, but non among *E. faecium*. One *E. faecium* isolate showed CRISPR2 and CRISPR3-cas simultaneously. The detection of the complete CRISPR-cas

loci (CRISPR1-cas and CRISPR3-cas), was observed in both *E. faecalis* (n=6) and *E. faecium* isolates (n=2) (Fig. 1).

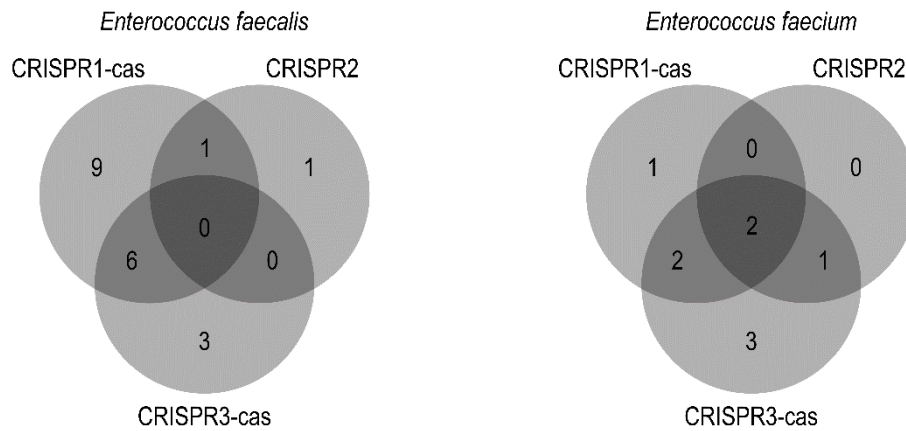


Fig. 1. Distribution of CRISPR systems among *Enterococcus faecalis* (n = 22) and *Enterococcus faecium* (n = 22) clinical strains.

The correlation between the presence of antibiotic resistance and virulence genes with the occurrence of CRISPR loci (CRISPR1-cas, CRISPR2 or CRISPR3-cas) among the enterococci was investigated. Regarding the presence of aminoglycoside resistance genes among the *E. faecalis* strains, *aac(6′)-Ie-aph(2′′)-Ia* gene was observed in nine CRISPR-positive isolates (9/20), and the *aph(3′)-IIIa* gene was detected in only one CRISPR+ isolate, but without statistical correlation (Table 5). Among the *E. faecium* strains, no correlation between *vanA* gene and CRISPR loci was observed (Table 5).

The gene *efaA* was strongly correlated with the presence of CRISPR loci among our enterococci collection ($p < 0.05$; OR=34.43). A significant correlation between CRISPR loci and the gene *gelE* was also evidenced ($p < 0.05$; OR=19.0). The gene *hyl* was the only one more detected among CRISPR-negative enterococci strains ($p < 0.05$; OR=16.1) (Table 5).

A correlation between the presence of CRISPR loci and the detection of biological activity of the enzymes gelatinase and DNase was observed ($p < 0.05$; OR=9.2 for gelatinase; OR=20.74 for DNase) (Table 5).

Table 5 - Correlation between the presence of virulence genes, enzymatic activity, presence of vancomycin resistance genes, presence of aminoglycoside resistance genes and CRISPR loci among the *Enterococcus spp.* clinical isolates.

Characteristic	CRISPR + (29/44)	CRISPR - (15/44)	P-value	Odds ratio	Lower Confidence Interval	Upper Confidence Interval
Virulence genes						
<i>ace</i>	14 (48.2%)	2 (13.3%)	0.842	0.774	0.062	9.637
<i>asaI</i>	17 (58.6%)	6 (40.0%)	0.245	0.204	0.014	2.973
<i>cylA</i>	4 (13.7%)	1 (6.6%)	0.495	0.335	0.014	7.744
<i>efaA</i>	23 (79.3%)	3 (20.0%)	0.011*	34.430	2.288	518.10
<i>esp</i>	18 (62.0%)	10 (66.6%)	0.843	1.255	0.132	11.885
<i>gelE</i>	21 (72.4%)	3 (20.0%)	0.033*	19.021	1.263	286.31
<i>hyl**</i>	6 (20.6%)	11 (73.3%)	0.031*	16.175	1.285	203.45
Phenotypic test						
Gelatinase	17 (58.6%)	2 (13.3%)	0.009*	9.208	1.747	48.520
Caseinase	27 (93.1%)	15 (100%)	0.995	9,47E-08	0	Inf
Lipase	6 (20.6%)	2 (13.3%)	1.000	0.999	0.122	8.210
DNase	27 (93.1%)	5 (33.3%)	0.005*	20.749	2.535	169.82
Hemolytic activity**	11 (37.9%)	11 (73.3%)	0.740	1.375	0.210	9.00
Resistance genes						
<i>vanA</i>	2 (6.9%)	2 (13.3%)	0.684	1.571	0.178	13.86
<i>vanB</i>	0	0	-	-	-	-
<i>vanC1</i>	0	0	-	-	-	-
<i>vanC2-3</i>	0	0	-	-	-	-
<i>aac(6`)-Ie-aph(2``)-Ia</i>	9 (31.0%)	1 (6.66%)	0.831	0.727	0.039	13.50
<i>aph(2``)-IIa</i>	0	0	-	-	-	-
<i>aph(2``)-IIIa</i>	0	0	-	-	-	-
<i>aph(2``)-Iva</i>	0	0	-	-	-	-
<i>aph(3`)-IIIa</i>	1 (3.4%)	0	0.997	5,32E+06	0	Inf
<i>ant(4`)-Ia</i>	0	0	-	-	-	-

CRISPR+ = detection of CRISPR loci by PCR amplification. CRISPR- = absence of CRISPR loci.

Estimates represent the log odds of "CRISPR System = Positive" vs. "CRISPR System = Negative".

*Statistical difference (P-value<0.05.). ** Estimates represent the log odds of "CRISPR System = Negative" vs. "CRISPR System = Positive"

4. Discussion

Enterococci are commensal bacteria and are among the main Gram-positive pathogens causing healthcare-associated infections, representing a generalist microorganism. Antimicrobial resistance and the diversity of virulence factors are important features that contribute to this profile [4, 17]. Among *Enterococcus* genus, *E. faecalis* and *E. faecium* are the most common human-associated. Multiple studies have concluded that an expansion of genome size by incorporation of MGEs, phages and/or pathogenicity islands is associated with multi-drug resistant and hospital-adapted phenotypes for *E. faecalis* and *E. faecium* strains [18, 19, 20].

In the present study, we evaluated the antimicrobial susceptibility, the presence of gene-encoding virulence factors and CRISPR loci, as well as the ability to produce lytic enzymes in clinical *E. faecalis* and *E. faecium* isolates, obtained from 2007 to 2019, and covering a broad set of clinical sources, including secretions, urine, wound, blood, peritoneal fluid, anal swab, liquor, and bile.

Multi-drug resistance was observed in all enterococci isolates evaluated in this work, and the high frequency of resistance to the aminoglycosides (streptomycin, amikacin and gentamicin) was quite high. Protonotariou et al. (2010) [21] and Barbosa-Ribeiro et al. (2016) [3] also reported resistance to streptomycin among *E. faecalis* and *E. faecium* isolates. Erythromycin resistance was prevalent among our *E. faecium* isolates, as previously reported in other studies with swine isolates [22, 23].

The *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* is a bifunctional aminoglycoside-modifying enzyme that confers resistance to clinically useful aminoglycosides. The HLGR phenotype was

observed in ten of the *E. faecalis* isolates (10/22), with the *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* gene detected in six HLGR isolates. Other studies have reported a high frequency of the gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* among HLGR *E. faecalis* strains [5, 24]. Diab et al. (2019) [25] showed that 78.0% of *Enterococcus* isolates were HLGR and 66.7% of them carried the *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* gene.

Vancomycin resistance was phenotypically observed in eleven *E. faecium* isolates (25% of all enterococci isolates evaluated), and the *vanA* gene was detected in four isolates. Komiyama et al. (2016) [26] showed low or no resistance to vancomycin and chloramphenicol among oral enterococci. Ejaz et al. (2019) [27] reported vancomycin-resistance phenotype in 2.9% of the enterococci isolated from different clinical samples. Pontinen *et al.* (2021) [20] identified vancomycin resistance genes in 4.9% of their *Enterococcus* isolates, while Ejaz et al. (2019) [27] detected the *vanA* and *vanB* genotypes in 25.0% and 75.0%, respectively, of the enterococci isolates investigated in their work. The *vanA* and *vanB* genes are the main vancomycin resistance genes found in clinical *E. faecalis* and *E. faecium* strains [28]. Other *van* genes remain sparsely reported and are considered non-related to human pathogens [29].

The expression of *asaI* allows the bacterium to maintain physical contact and performs the transfer of genetic information through conjugation transfer. The *esp* genes have been associated with tissue adhesion, biofilm formation, and tissue colonization by *Enterococcus* strains. *cylA* encodes a cytotoxin, also defined as a peptide belonging to lantibiotic-class of bacteriocins, and it shows cytotoxic activity against both bacterial and mammalian cells. The *hyl* gene encodes a hyaluronidase, responsible for the degradation of hyaluronic acid, which favors tissue degradation and bacterial invasion. Ace is a collagen adhesion protein, an adhesin that is part of the microbial surface recognition group of matrix adhesive molecules. EfaA is an endocarditis antigen found on the surface,

with lipoprotein characteristics, and manganese-regulated expression. GelE is an extracellular enzyme that can hydrolyze gelatin, casein, and other substrates; its activity allows the degradation of host tissues and the consequent release of nutrients, needed for microbial survival. In addition, GelE has been associated with biofilm formation [3, 4, 33].

A high prevalence of the virulence genes *esp* and *efaA*, and a low frequency of *cylA* were observed among our enterococci isolates. Similar results were reported by Comerlato et al. (2013) [30], which detected positive results for *esp* gene in 76% of the *Enterococcus* isolates from patients in Porto Alegre, Brazil, especially among *E. faecalis*. According to Akbari and collaborators (2017) [31], *efaA* gene was detected in 82% of the *Enterococcus spp.* isolated from dental root isolates, while *cylA* was not found in any isolate. Low frequency of *cylA* gene among *Enterococcus spp.* isolated from periodontitis-associated subgingival biofilm was also reported [17].

The analysis of the distribution of virulence genes according to the bacterial species revealed a prevalence of *hyl* among *E. faecium* strains. Some studies have identified the gene *hyl* in both *E. faecalis* and *E. faecium* strains [32, 33], and in other studies its presence has been more frequently related to *E. faecium* [5, 34].

A higher frequency of the genes *ace* and *efaA* was observed among *E. faecalis* isolates. Barbosa-Ribeiro et al. (2016) [3] detected *ace* gene in all *E. faecalis* strains isolated from teeth failing endodontic treatment, followed by *efaA* (95%), *gelE* (75%) and *asa* (70%). Recent studies have reported *ace* as a predominant virulence gene among *Enterococcus* isolated from periodontitis-associated subgingival biofilm [17], and Bulk tank milk in Korea [35]. High prevalence of *efaA* gene has been detected among *E. faecalis* isolated from subclinical bovine mastitis (91.4% of the isolates) [36] and from subgingival biofilms (97.7% of the isolates) [17].

Although the *gelE* gene has been identified in 13 and 11 strains of *E. faecalis* and *E. faecium*, respectively, gelatinase activity was detected in 14 *E. faecalis* isolates and in only five of our *E. faecium* strains. The *E. faecalis* isolate 291, obtained from secretion, was the only one showing gelatinase activity in the absence of *gelE* gene detection by PCR. The absence of gelatinase activity detection in six isolates of *E. faecium* may be due to limitations of the screening method or to interruptions or *in vitro* non-expression of the gene.

Gelatinase and DNase activities were more prevalent among *E. faecalis* strains. These results agree with the findings of Kashef et al. (2017) [37] and Hashem et al. (2021) [38]. In our study, hemolytic activity was more frequent among *E. faecium* isolates, and the phenotype was of partial hemolysis (alpha-hemolysis). In contrast, Kiruthiga et al. (2020) [4] observed beta-hemolytic activity in 41.4% of the enterococci evaluated, the majority being represented by *E. faecalis* isolates.

The capacity to degrade casein is a common feature among enterococci isolates [38], as observed in our enterococci collection (caseinase activity was observed in 42 of the 44 enterococci isolates evaluated). In contrast, the capacity to degrade lipids was observed in six *E. faecalis* isolates and only two *E. faecium* isolates, different of the results obtained by Bhagwat and Annapure (2019) [39] that showed excellent lipase production among human *Enterococcus* strains.

Type II CRISPR systems were detected in approximately two-thirds of the isolates evaluated in the present study. In line with the literature about CRISPR loci distribution [5-7], our results evidenced that CRISPR systems can be more commonly found in *E. faecalis* strains when compared to *E. faecium* isolates.

However, regarding the presence of specific CRISPR loci, our results differ from the literature. Most studies evaluating the presence of CRISPR systems among

enterococci have shown orphan CRISPR2 locus as the most widespread system among enterococci [6, 40]. However, in our study, CRISPR2 has been detected in only two *E. faecalis* and three *E. faecium* isolates.

Huescas et al. (2019) [6] detected CRISPR1-cas in 44.77% of the non-clinical *E. faecalis* strains. Gholizadeh et al. (2020) [40] reported a higher prevalence of CRISPR3-cas locus among dental *Enterococcus* isolates (35.6%) and more CRISPR1-cas positive strains among hospital isolates (19.3%) when compared to dental enterococci.

In our study, complete CRISPR-cas loci were detected in nineteen *E. faecalis* and eight *E. faecium* isolates. Gholizadeh et al. (2021) [40] reported CRISPR3-cas and CRISPR1-cas in 17.75 and 10.42 % of the *E. faecalis* isolates, respectively.

Of the MDR *E. faecalis* strains in our collection, only two lack CRISPR loci, and all except one (isolate 914) high-level gentamicin-resistant *E. faecalis* were CRISPR-positive. Regarding MDR *E. faecium* strains, 12 lack CRISPR loci, including four vancomycin-resistant *E. faecium* strains. Eight vancomycin-resistant and only two vancomycin-sensitive *E. faecium* strains were CRISPR-positive.

Gholizadeh et al. (2021) [40] reported a predominance of CRISPR2 in gentamicin and rifampin *E. faecalis* susceptible isolates ($p < 0.05$), while CRISPR3 was predominant in erythromycin, tetracycline, ciprofloxacin and gentamicin susceptible isolates ($p < 0.05$). According to the authors, the absence of CRISPR3 was significantly associated with the increased values of vancomycin MIC, while the absence of CRISPR2 and CRISPR3 was significantly associated with the increased values of gentamicin MIC ($p < 0.05$).

An inverse relationship between the presence of CRISPR-cas loci and acquired antibiotic resistance has been described for *E. faecalis* and *E. faecium*. According to Labibzadeh et al. (2018) [24] and Santos et al. (2020) [5], the genes *ant(6)Ia* and *aac(6')*-

Ie-aph(2'')-Ia were more commonly detected among enterococci isolates lacking CRISPR elements. Association among CRISPR2 presence and absence of *aac6'-aph(2'')* genes, as well as the absence of *aac6'-aph(2'')* gene among CRISPR3-positive *E. faecalis* clinical isolates were reported by Gholizadeh and colleagues (2021) [40]. Mlaga et al. (2021) [7] detected the association of vancomycin resistance genes and the absence of CRISPR system into genomes of *Enterococcus* isolated from humans and chicken feces. In our study, nine out of ten *E. faecalis* isolates harboring *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* gene were CRISPR-positive, and no correlation between *van* genes and CRISPR absence was observed.

Among our enterococci isolates, the presence of CRISPR loci was directly associated with the presence of the genes *efaA* and *gelE*, and to the activity of the enzymes gelatinase and DNase ($p < 0.05$), while the absence of CRISPR loci was only significantly associated with the presence of the *hyl* gene ($p < 0.05$).

5. Significance

The absence of CRISPR loci is expected to facilitate the acquisition of MGEs carrying traits like antibiotic resistance, hemolysin and bacteriocin production, or even new metabolic properties, providing a selective advantage to the bacterial strain. The idea that members of high-risk enterococcal lineages lack complete CRISPR loci has been suggested by several researchers [5, 14, 20, 40]. However, the presence of antibiotic resistance and virulence factors-associated genes, as well as the phenotypical detection of antimicrobial resistance and production of lytic enzymes among our CRISPR loci positive strains (Tables S4 e S5) suggests that CRISPR systems could not confer a complete genome defense in clinical *E. faecalis* and *E. faecium* hosts. The inactivity, non-functionality, or attenuation of CRISPR machinery in these lineages, or even specialized

ways to evade this defense, may be related to their success in acquiring foreign DNA, enhancing survival and contributing to the selection of hospital-adapted enterococci.

Acknowledgments: The authors thank CNPq and FAPEMIG for financial support. Isabela Sguilla Rotta was FAPEMIG scholarship holder.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- [1] Wagner T, Joshi B, Janice J, Askarian F, Skalko-Basnet N, Hagestad OC, et al. *Enterococcus faecium* produces membrane vesicles containing virulence factors and antimicrobial resistance related proteins. J Proteomics 2018;187:28-38.
- [2] Kristich CJ, Rice LB, Arias CA. Enterococcal Infection-Treatment and Antibiotic Resistance, Eye and Ear Infirmary, Boston, 2014.
- [3] Barbosa-Ribeiro M, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JFA, Gomes BPPA. Antimicrobial susceptibility and characterization of virulence genes of *Enterococcus faecalis* isolates from teeth with failure of the endodontic treatment. J Endod 2016;42:1022-1028.
- [4] Kiruthiga A, Padmavathy K, Shabana P, Naveenkumar V, Gnanadesikan S, Malaiyan J. Improved detection of *esp*, *hyl*, *asaI*, *gelE*, *cylA* virulence genes among clinical isolates of Enterococci. BMC Res Notes 2020;13:1-7.
- [5] Santos BA, Oliveira JS, Parmanhani-da-Silva BM, Ribeiro RL, Teixeira LM, Neves FPG. CRISPR elements and their association with antimicrobial resistance and virulence genes among vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible enterococci recovered from human and food sources. Infect Genet Evol 2020;80:104183.
- [6] Huescas CGY, Pereira RI, Prichula J, Azevedo PA, Frazzon J, Frazzon APG. Frequency of Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPRs) in

- non-clinical *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains. *Braz J Biol* 2019;79:460-465.
- [7] Mlaga KD, Garcia V, Colson P, Ruimy R, Rolain JM, Diene SM. Extensive comparative genomic analysis of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* reveal a direct association between the absence of CRISPR-cas systems, the presence of anti-endonuclease (*ardA*) and the acquisition of vancomycin resistance in *E. faecium*. *Microorganisms* 2021;9:1118.
- [8] (Oliveira DC, Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:2155-2161.
- [9] Vankerckhoven V, Autgaerden TV, Vael C, Lammens C, Chapelle S, Rossi R, et al. Development of a multiplex PCR for the detection of *asaI*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 2004;42:4473–4479.
- [10] Rivas P, Alonso J, Moya J, Górgolas M, Martinell J, Guerrero MLF. The impact of hospital acquired infections on the microbial etiology and prognosis of late-onset prosthetic valve endocarditis. *Chest* 2005;128:764–771.
- [11] 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;132:24–32.
- [12] Zanella RC, Brandileone MCC, Bokermann S, Almeida SCG, Valdetaro F, Vitória F, et al. Phenotypic and genotypic characterization of VanA *Enterococcus* isolated during the first nosocomial outbreak in Brazil. *Microb. Drug Resist* 2003;9:283–291.
- [13] Vakulenko SB, Mobashery S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev* 2003;16:430–450.

- [14] Palmer KL, Gilmore MS. Multidrug-resistant enterococci lack CRISPR-cas. *MBio* 2010;1:e00227.
- [15] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 31. ed, Wayne: CLSI, 2021. Suppl. M100.
- [16] Falagas ME, Karageorgopoulos DE. Pandrug resistance (PDR), extensive drug resistance (XDR), and multidrug resistance (MDR) among Gram-negative Bacilli: need for international harmonization in terminology. *Arch Clin Infect Dis* 2008;46:1121-1122.
- [17] Espíndola LC, Nascimento MVMR, Souto RM, Colombo APV. Antimicrobial susceptibility and virulence of *Enterococcus* ssp. isolated from periodontitis-associated subgingival biofilm. *J Periodontol* 2021;92:1588-1600.
- [18] Raven KE, Reuter S, Gouliouris T, Reynolds R, Russell JE, Brown NM, et al. Genome-based characterization of hospital-adapted *Enterococcus faecalis* lineages. *Nat Microbiol* 2016;1:15033.
- [19] Lebreton F, Manson AL, Saavedra J, Straub TJ, Earl AM, Gilmore MS. Tracing the Enterococci from Paleozoic Origins to the Hospital. *Cell* 2017;169:849-861.
- [20] Pontinen A, Top J, Arredondo-Alonso S, Tonkin-Hill G, Freitas AR, Novais C, et al. Apparent nosocomial adaptation of *Enterococcus faecalis* predates the modern hospital era. *Nat Commun* 2021;12:1523.
- [21] Protonotariou E, Dimitroulia E, Pournaras S, Pitiriga V, Sofianou D, Tsakris A. Trends in antimicrobial resistance of clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in Greece between 2002 and 2007. *J Hosp Infect* 2010;75:225-227.
- [22] Kim HJ, Koo M. Occurrence, antimicrobial resistance and molecular diversity of *Enterococcus faecium* in processed pork meat products in Korea. *Foods* 2020;9:1283.

- [23] Xuan H. Antimicrobial resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates of swine origin from eighteen provinces in China. J Vet Med Sci 2021.
- [24] Labibzadeh M, Kaydani GA, Mohammad S, Ekrami A, et al. Emergence of high-level gentamicin resistance among enterococci clinical isolates from burn patients in south-west of Iran: vancomycin still working. Pol J Microbiol 2018;67:2544–4646.
- [25] Diab M, Salem D, El-Shenawy A, Abdelghany A, Awad AR, et al. Detection of high level aminoglycoside resistance genes among clinical isolates of *Enterococcus* species. Egypt J Med HuM Genetic 2019;20.
- [26] Komiyama EY, Lepageur LSS, Yassuda CG, Samaranayake LP, Parahitiyawa NB, Balducci I, et al. *Enterococcus* species in the oral cavity: prevalence, virulence factors and antimicrobial susceptibility. PLoS One 2016;11:e0163001.
- [27] Ejaz A, Khawaja A, Arshad F, Tauseef A, Ullah R, Ahmad I. Etiological profile and antimicrobial patterns in blood culture specimens in a tertiary care setting. Cureus 2020;12:e11000.
- [28] Dziri R, Lozano C, Ben SL, Bellaaj R, Boudabous A, Ben SK, et al. Multidrug-resistant enterococci in the hospital environment: detection of novel vancomycin-resistant *E. faecium* clone ST910. J Infect Dev Count 2016;10:799–806
- [29] Ahmed MO, Baptiste K. Vancomycin-resistant Enterococci: a review of antimicrobial resistance mechanisms and perspectives of human and animal health. Microb Drug Resist 2018;24:590-606.
- [30] Comerlato CB, Resende MCC, Caierao J, Azevedo PA. Presence of virulence factors in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* susceptible and resistant to vancomycin. Mem Inst Oswaldo Cruz 2013;108:590-595.
- [31] Akbari AM, Barhaghi MHS, Aghazadeh M, Jafari F, Hagh MB, Haghdoost M, et al. Virulence genes in biofilm producer *Enterococcus faecalis* isolates from root canal infections. Cell Mol Biol 2017;63:55-59.

- [32] Shokoohizadeh L, Ekrami A, Labibzadeh M, Ali L, Alavi SM. Antimicrobial resistance patterns and virulence factors of enterococci isolates in hospitalized burn patients. *BMC Res Notes* 2018;11.
- [33] Golob M, Pate M, Kusar D, Dermota U, Avbersek J, Papic B, et al. Antimicrobial Resistance and virulence genes in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from humans and retail red meat. *BioMed Res Int* 2019;2815279.
- [34] Biswas PP, Dey S, Sen A, Adhikari L, et al. Molecular Characterization of virulence genes in Vancomycin-Resistant and Vancomycin-sensitive Enterococci. *J Glob Infect Dis* 2016;8:16-24.
- [35] Yonn S, Lee YJ. Molecular characteristics of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from Bulk tank milk in Korea. *Animals* 2021;11:661.
- [36] Yang F, Zhang S, Shang X, Wang X, Yan Z, Li H, et al. Short communication: Antimicrobial resistance and virulence genes of *Enterococcus faecalis* isolated from subclinical bovine mastitis cases in China. *J Dairy Sci* 2019;102:140–144.
- [37] Kashef M, Alvandi A, Hasanvand B, Azizi M, Abiri R. Virulence factor and biofilm formation in clinical enterococcal isolates of the west of Iran. *Jundishapur J Microbiol* 2017;10.
- [38] Hashem YA, Abdelrahman KA, Aziz RK. Phenotype-Genotype correlations and distribution of key virulence factors in *Enterococcus faecalis* isolates from patients with urinary tract infections. *Infect Drug Resist* 2021;14:1713-1723.
- [39] Bhagwat A, Annapure US. In vitro assessment of metabolic profile of *Enterococcus* strains of human origin. *J Genet Eng Biotechnol* 2019;17:1-11.
- [40] Gholizadeh P, Aghazadeh M, Ghotaslou R, Rezaee MA, Pirzadeh T, Kose S, et al. CRISPR-cas system in the acquisition of virulence genes in dental-root canal and hospital-acquired isolates of *Enterococcus faecalis*. *Virulence* 2020;11:1257-1267.

SUPPLEMENTARY

Supplementary Table 1 - Primers, annealing temperatures, and size of fragments expected for each analyzed virulence gene, antimicrobial resistance genes and CRISPR system in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*.

Gene	Primers	Annealing temperature	Size of fragments	Reference
<i>gelE</i>	TATGACAATGCTTTTTGGGAT AGATGCACCCGAAATAATATA	47 °C	213 pb	[9]
<i>cylA</i>	ACTCGGGGATTGATAGGC GCTGCTAAAGCTGCGCTT	52 °C	688 pb	[9]
<i>hyl</i>	ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG GACTGACGTCCAAGTTTCCAA	53 °C	276 pb	[9]
<i>asaI</i>	GCACGCTATTACGAACTATGA TAAGAAAGAACATCACCACGA	50 °C	375 pb	[9]
<i>esp</i>	AGATTTTCATCTTTGATTCTTG AATTGATTCTTTAGCATCTGG	47 °C	510 pb	[9]
<i>efaA</i>	GCCAATTGGGACAGACCCTC CGCCTTCTGTTCTTCTTTGGC	57 °C	688 pb	[11]
<i>ace</i>	GAATTGAGCAAAAAGTTCAATCG GTCTGTCTTTTCACTTGTTTC	48 °C	1008 pb	[11]
<i>vanA</i>	5'AAATGTGCGAAAAACCT 3' 3'TCCTGATGAATACGAAAGAT 5'	54 °C	600	[12]
<i>vanB</i>	5'ACCTACCCTGTCTTTGTGAA 3' 3'AATGTCTGCTGGAACGATA 5'	54 °C	300	[12]
<i>vanC1</i>	5'GGTATCAAGGAAACCTC 3' 3'CTCCGCCATCATAGCT 5'	50 °C	822	[12]
<i>vanC2-3</i>	5'CTCCTACGATTCTCTTG 3' 3'CGAGCAAGACCTTTAAG 5'	50 °C	439	[12]
<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>	CAGAGCCTTGGGAAGATGAAG CCTCGTGTAATTCATGTTCTGGC	55 °C	348	[9]
<i>aph(2'')-IIa</i>	CTTGACGCTGAGATATATGAGCAC GTTTGTAGCAATTCAGAAACACCCTT	55 °C	867	[9]
<i>aph(2'')-IIIa</i>	CCACAATGATAATGACTCAGTTCCC CCACAGCTTCCGATAGCAAGAG	55 °C	444	[9]
<i>aph(2'')-IVa</i>	GTGGTTTTTACAGGAATGCCATC CCCTCTTCATACCAATCCATATAACC	55 °C	641	[9]
<i>aph(3'')-IIIa</i>	GGCTAAAATGAGAATATCACCGG CTTTAAAAAATCATACAGCTCGCG	55 °C	523	[9]

<i>ant(4')-Ia</i>	CAAAC TGCTAAATCGGTAGAAGCC	55 °C	294	[9]
	GGAAAGTTGACCAGACATTACGAACT			
CRISPR1-cas csn1	CAGAAGACTATCAGTTGGTG	48 °C	783	[14]
	CCTTCTAAATCTTCTTCATAG			
CRISPR1-cas	GCGATGTTAGCTGATACAAC	55 °C	315	[14]
	CGAATATGCCTGTGGTGA AAA			
CRISPR2	CTGGCTCGCTGTTACAGCT	56 °C	variable	[14]
	GCCAATGTTACAATATCAAACA			
CRISPR3-cas csn1 homologue EFKG 00787	GCTGAATCTGTGAAGTTACTC	58 °C	258	[14]
	CTGTTTTGTTACCGTTGGAT			
CRISPR3 cas	GATCACTAGGTTTCAGTTATTTC	57 °C	224	[14]
	CATCGATTATTCTCTCAA			

Supplementary Table 2 – Clinical specimen and year of the isolation of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*.

<i>E. faecalis</i>	Year of isolation	Specimen	<i>E. faecium</i>	Year of isolation	Specimen
34	2019	Urine	126	2009	Urine
155	2008	Blood	349	2009	Urine
221	2008	Urine	379	2009	Urine
228	2009	Secretion	386	2009	Urine
715	2012	Secretion	489	2010	Secretion
911	2014	Secretion	884	2014	Anal Swab
912	2007	Secretion	1005	2016	Urine
913	2008	Blood	1031	2016	Blood
914	2008	Urine	1034	2016	Urine
915	2010	Peritoneal Liq.	1058	2017	Urine
916	2014	Liquor	1105	2017	Blood
20	2006	Urina	293	2009	Urine
35	2006	Wound	324	2009	Wound
58	2007	Secretion	327	2009	Bile
74	2007	Secretion	373	2009	Urine
157	2007	Wound	391	2009	Wound
175	2008	Wound	413	2010	Urine
240	2008	Blood	454	2009	Urine
250	2008	Secretion	517	2010	Urine
291	2009	Secretion	1089	2017	Anal Swab
313	2009	Wound	1123	2016	Peritoneal Liq.
904	2014	Urine	1159	2016	Urine

Supplementary Table 3 – Antimicrobial susceptibility, enzymatic activity, virulence genes and CRISPR system in clinical *Enterococcus faecalis* isolates.

ISOLATES	AMK	AMP	CHL	CLI	ERY	GEN	PEN	RIF	STR	TET	VAN	Caseinase	DNase	Gelatinase	Lipase	alpha-hemolysis	ace	asa1	cytA	efaA	esp	gseE	hyl	sac(6)-te- act(2)-1a	act(2)-11a	act(2)-1-11a	act(2)-1-11a	act(2)-1-11a	act(4)-1a	CRISPR		
Urine																																
20	Red	Red	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
34	Red	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
221	Red	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
904	Red	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
914	Red	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
Blood																																
155	Red	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
240	Red	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
913	Red	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
Secretion																																
58	Red	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
74	Red	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
228	Red	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
291	Red	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
715	Red	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
911	Red	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
912	Red	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
Peritoneal Liq.																																
915	Red	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
Liquor																																
316	Red	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
Wound																																
35	Red	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
157	Red	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
175	Red	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
250	Red	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
313	Red	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green

For antibiogram tests: (green) susceptible, (red) resistant; to others test: (green) positive, (red) negative. AMK, amikacin; AMP, ampicillin; CHL, chloramphenicol; CLI, clindamycin; ERY, erythromycin; GEN, gentamicin; PEN, penicillin; RIF, rifampicin; STR, streptomycin; TET, tetracycline.

Supplementary Table 4 – Antimicrobial susceptibility, enzymatic activity, virulence genes and CRISPR system in clinical *Enterococcus faecium* isolates.

ISOLATES	AMK	AMP	CHL	CLI	ERY	GEN	PEN	RIF	STR	TET	VAN	Caseinase	DNase	Gelatinase	Lipase	alpha-hemolysis	ace	asa1	cyfA	efaA	esp	gelE	hyl	vanA	vanB	vanC1	vanC2-3	CRISPR
Urine																												
126	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
293	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
349	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
373	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
379	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
386	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
413	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
454	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
517	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
1005	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
1034	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
1058	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
1159	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
Blood																												
1031	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
1105	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
Secretion																												
489	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
Peritoneal Liq.																												
1123	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
Wound																												
324	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
391	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
Anal Swab																												
884	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
1089	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
Bile																												
327	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red

For antibiogram tests: (green) susceptible, (red) resistant; to others test: (green) positive, (red) negative. AMK, amikacin; AMP, ampicillin; CHL, chloramphenicol; CLI, clindamycin; ERY, erythromycin; GEN, gentamicin; PEN, penicillin; RIF, rifampicin; STR, streptomycin; TET, tetracycline.

APÊNDICE B (comprovante de submissão do artigo)

Microbes and Infection

Hospital-adapted strains of *E. faecalis* and *E. faecium* harboring virulence genes show the concomitant presence of CRISPR loci and antibiotic resistance determinants.

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	MICINF-D-22-00011
Article Type:	Original article
Keywords:	CRISPR; Enterococcus; antibiotic resistance; Virulence factors
Corresponding Author:	Aline Dias Paiva, Ph.D Universidade Federal do Triangulo Mineiro Uberaba, Minas Gerais BRAZIL
First Author:	Isabela Sguilla Rotta, Master
Order of Authors:	Isabela Sguilla Rotta, Master Wellington Francisco Rodrigues, Ph.D Celso Tadeu Barbosa dos Santos Hilario Cuquetto Mantovani, PhD Adriana Gonçalves Oliveira, Doctor Alessandra Barbosa Ferreira-Machado, Ph.D Aline Dias Paiva, Ph.D
Manuscript Region of Origin:	BRAZIL
Abstract:	<p>In this study, we evaluated the antimicrobial susceptibility, the presence of gene- encoding virulence factors and CRISPR systems, as well as the ability to produce lytic enzymes among clinical <i>E. faecalis</i> and <i>E. faecium</i> isolates (n=44). All enterococci isolates showed phenotypes of multi-drug resistance. Half of the <i>E. faecalis</i> isolates exhibited high-level gentamicin resistance phenotype, several of them harboring the <i>aac(6')Ie-aph(2'')</i>Ia gene. The gene <i>vanA</i> was the most frequent among vancomycin-resistant <i>E. faecium</i>. High prevalence of the virulence genes <i>esp</i> and <i>efaA</i> were observed; <i>hyl</i> gene was more associated with <i>E. faecium</i>, while <i>ace</i> and <i>efaA</i> genes were more frequently detected in <i>E. faecalis</i>. Caseinase activity was frequently detected among the isolates. Gelatinase and DNase activities predominated among <i>E. faecalis</i>, while hemolytic capability was frequent among <i>E. faecium</i> isolates. Twenty-nine isolates showed at least one CRISPR system investigated.</p> <p>Several <i>E. faecalis</i> isolates harbored the <i>aac(6')-Ie-aph(2'')</i>-Ia gene and a CRISPR loci. CRISPR loci were positively correlated to <i>efaA</i> and <i>gelE</i> genes, and gelatinase and DNase activities, while CRISPR loci absence was related to <i>hyl</i> gene presence. These results show that hospital-adapted strains of <i>E. faecalis</i> and <i>E. faecium</i> harboring virulence genes show the concomitant presence of CRISPR loci and</p>

	antibiotic resistance determinants.
Suggested Reviewers:	<p>TIAGO ANTONIO OLIVEIRA MENDES, PhD Professor, Universidade Federal de Vicosatiagoaomendes@ufv.br Expertise in the research field.</p> <p>Lucia Martins Teixeira, PhD Professor, Universidade Federal do Rio de Janeiro lmt2@micro.ufrj.br Expertise in the research field.</p>

APÊNDICE C (lista de participação de coautores)

Adriana Gonçalves Oliveira – responsável pela coleção de culturas de *Enterococcus* no Laboratório de Microbiologia da UFTM; revisão do manuscrito.

Alessandra Barbosa Ferreira Machado – concepção do projeto, co-orientação, acompanhamento dos experimentos, análise dos resultados, revisão do manuscrito.

Celso Tadeu Barbosa Dos Santos - acompanhamento e auxílio na execução dos experimentos.

Hilario Cuquetto Mantovani – análise dos resultados, revisão do manuscrito.

Wellington Francisco Rodrigues – análise estatística, análise dos resultados.