UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

RENATA PEREIRA LIMA DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO FENOTIPICA E MOLECULAR EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Enterococcus faecium* E O EFEITO DA VANCOMICINA E DA LINEZOLIDA SOBRE O BIOFILME

Recife

2023

RENATA PEREIRA LIMA DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO FENOTIPICA E MOLECULAR EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Enterococcus faecium* E O EFEITO DA VANCOMICINAE DA LINEZOLIDASOBRE O BIOFILME

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia (PPGBioqF) do Centro de Biociências (CB), Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco(UFPE) como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia.

Orientadora: Profª. Drª. Maria Betânia Melo de Oliveira

Co-orientadora: Drª. Bárbara de Azevedo Ramos

Recife

2023

Catalogação na Fonte
Bibliotecário:Marcos Antonio Soares da Silva
CRB4/1381

Silva,Renata Pereira Lima da .
Caracterização fenotipica e molecular em isolados clínicos de *Enterococcus faecium* e o efeito da vancomicina e da linezolida sobre o biofilme. / Renata Pereira da Silva. – 2023.

57 f. : il., fig.; tab.

Orientadora: Maria Betânia Melo de Oliveira.
Coorientadora: Bárbara de Azevedo Ramos.

.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco, 2023.

Inclui referências.

1. Gram positivas. 2. Resistência antimicrobiana. 3. Matriz exopolissacarídica. 4. Infecções bacterianas. I. Oliveira, Maria Betânia Melo de (Orient.). II. Ramos, Bárbara de Azevedo (Coorient.). III.Título.

572 CDD (22.ed.) UFPE/CB – 2024-038

RENATA PEREIRA LIMA DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO FENOTIPICA E MOLECULAR EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Enterococcus faecium* E O EFEITO DA VANCOMICINA E DA LINEZOLIDA SOBRE O BIOFILME

Dissertação apresentada ao PPGBioqF do CB, Departamento de Bioquímica da UFPE como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia.

Aprovada em: 27 / 07 / 2023

BANCA EXAMINADORA

_____

Profª. Drª. Maria Betânia Melo de Oliveira – Orientadora
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

_____

Profª. Drª. Emmanuel Viana Pontual – Membro interno
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

_____

Drª. Bruna Maria Pereira da Costa Cordeiro – Membro externo
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

_____

Drª. Sivoneide Maria da Silva – Membro externo
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dedico a meus pais,

Lenil Barbosa e Secundino Pereira

E, ao meu irmão, Filipe

AGRADECIMENTOS

Sou imensamente grata a Deus, doador de luz e vida, por ter me proporcionado a realização do sonho de concluir uma pós-graduação que me trouxe, aprendizado, amadurecimento e boas amizades.

Agradeço de todo coração a minha família, em especial a minha amada mãe, Lenil Barbosa, por não medir esforços em me apoiar no que lhe era possível, por suas orações benditas e amor sublime. Agradeço ao meu namorado, Filipe Luiz, por todo apoio, compreensão e carinho que tornaram mais leve essa jornada.

Minha profunda gratidão e respeito à minha orientadora, Dra. Maria Betânia Melo de Oliveira, por ter me dado a honra de ser orientada por ela, sempre com sua dedicação, generosidade, delicadeza e humanidade incomparáveis e, principalmente, por não ter desistido de mim. Guardarei para sempre nossas conversas na minha memória. Igualmente, agradeço à minha co-orientadora Dra. Bárbara Ramos pelo apoio, paciência e empatia no momento necessário.

Meu mais sincero agradecimento ao colaborador do meu projeto, Rafael Arthur, por ter me passado seus conhecimentos e, principalmente, por ter estimulado o desenvolvimento da minha autoconfiança. Também agradeço ao querido professor Dr. Armando Marsden, por acreditar no meu potencial.

Toda gratidão a Dra. Sivoneide Maria, pela paciência, sinceridade e disposição em ajudar, sem ela tudo seria muito mais difícil. Agradeço às minhas amigas: Julie e Maria Ellen, por tornarem os dias mais divertidos, por me ouvirem e aconselharem. Sem vocês, seria mais penoso.

Todo amor, carinho e gratidão à boa vontade de Amanda Vieira e Elisa Santiago na difícil jornada até aqui, a ajuda de vocês foi essencial para eu aprender e evoluir como cientista. Agradeço aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular (BioMol) e de outros laboratórios do Departamento de Bioquímica e Fisiologia que tornaram essa experiência inesquecível.

Gratidão ao Centro Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo apoio financeiro que possibilitou a realização de todo este percurso junto ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da UFPE.

“Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes.”

(Isaac Newton)

RESUMO

Os enterococos são bactérias gram-positivas distribuídas de forma ubíqua. Este grupo de microrganismos são comensais de humanos e animais que podem se comportar como patógenos oportunistas e causar graves infecções. São resistentes a diversas drogas, possui a capacidade de formar biofilme, fator responsável pela cronicidade das infecções. O presente estudo teve como objetivo caracterizar fenotípica e molecularmente isolados clínicos de *Enterococcus faecium* e verificar o efeito de dois fármacos (vancomicina e linezolida) sobre o biofilme. Para isso, foram utilizadas 15 isolados de *E. faecium* provenientes de diferentes sítios de infecção de pacientes internados em um hospital público da Região Metropolitana do Recife (RMR), Pernambuco, nordeste do Brasil. Estas bactérias foram caracterizadas fenotípica (sistema automatizado VITEK) e molecularmente (MALDI-TOF MS) para confirmação da sua identidade molecular. O perfil de resistência fenotípico também foi avaliado, bem como a análise molecular por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) direcionada aos respectivos genes (*vanA, vanB, vanN, cfr, optrA* e *poxtA*) de resistência. Adicionalmente, foi verificado o potencial dos isolados para formação de biofilme e o efeito da vancomicina e da linezolida sobre a matriz polimérica extracelular de *E. faecium* (14872) e do isolado UFPEDA 09 (controle). Os resultados revelaram que todos os isolados correspondem à espécie *E. faecium*, sendo estes resistentes à vancomicina e a maioria sensíveis à linezolidae formadores de biofilme. Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI) da vancomicina e da linezolida não foram suficientes para impedir a formação do biofilme bacteriano. Concentrações a partir 2x CMI da vancomicina e da linezolida até 32x CMI de cada fármaco foram utilizadas para desestabilizar o biofilme formado. Os resultados aqui apresentados reforçam o elevado desafio do enfrentamento para tratamento de infecções causadas por esse patógeno e demonstram a necessidade de ações de monitoramento e vigilância nas unidades hospitalares como medidas preventivas, uma vez que para desestabilizar e/ou erradicar o biofilme deste patógeno são necessárias concentrações altas dos fármacos testados o que poderia gerar consequências de intoxicação para os pacientes.

Palavras-chave: Gram positivas; resistência antimicrobiana; matriz exopolissacarídica; infecções bacterianas.

ABSTRACT

Enterococci are ubiquitously distributed gram-positive bacteria. This group of microorganisms are commensals of humans and animals that can behave as opportunistic pathogens and cause serious infections. They are resistant to several drugs and have the ability to form biofilm, a factor responsible for the chronicity of infections. The present study aimed to characterize phenotypically and molecularly clinical isolates of Enterococcus faecium and verify the effect of two drugs (vancomycin and linezolid) on the biofilm. For this, 15 isolates of E. faecium were used from different infection sites of patients admitted to a public hospital in the Metropolitan Region of Recife (RMR), Pernambuco, northeastern Brazil. These bacteria were characterized phenotypically (VITEK automated system) and molecularly (MALDI-TOF MS) to confirm their molecular identity. The phenotypic resistance profile was also evaluated, as well as molecular analysis using the Polymerase Chain Reaction (PCR) directed to the respective resistance genes (vanA, vanB, vanN, cfr, optrA and poxtA). Additionally, the potential of the isolates for biofilm formation and the effect of vancomycin and linezolid on the extracellular polymeric matrix of E. faecium (14872) and the UFPEDA 09 isolate (control) were verified. The results revealed that all isolates correspond to the species E. faecium, being resistant to vancomycin and the majority sensitive to biofilm-forming linezolid. Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) of vancomycin and linezolid were not sufficient to prevent the formation of bacterial biofilm. Concentrations from 2x MIC of vancomycin and linezolid to 32x MIC of each drug were used to destabilize the biofilm formed. The results presented here reinforce the high challenge of facing the treatment of infections caused by this pathogen and demonstrate the need for monitoring and surveillance actions in hospital units as preventive measures, since destabilizing and/or eradicating the biofilm of this pathogen is necessary. high concentrations of the drugs tested, which could lead to intoxication consequences for patients.

Keywords: Gram positive; antimicrobial resistance; exopolysaccharide matrix; bacterial infections.

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de *Enterococcus sp*.....18
Figura 2 - Esquema dos mecanismos de ação dos antimicrobianos sobre as células bacterianas.....22
Figura 3 - Etapas do desenvolvimentos dos biofilmes.....27

Artigo Científico

Figura 1 - Crescimento dos isolados bacterianos em meio específico Pfize Selective Enterococcus Agar.....39

Figura 2 - (A) Anti-formação de biofilme com vancomicina. (B) Anti-iformação de biofilme com linezolida.....52

Figura 2 - (C) Erradicação de biofilme com vancomicina. (D) Erradicação de biofilme com linezolida.....53

LISTA DE TABELAS

Artigo Científico

Tabela 1 - Condições de PCR utilizadas para cada gene investigado.….....39

Tabela 2 - Características gerais dos isolados.....43

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

IRAS - Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde

PYR - pirrolidonil-β-naftilamida

pH - potencial hidrogeniônico

NaCl - Cloreto de Sódio

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

OMS - Organização Mundial da Saúde

RMR - Região Metropolitana do Recife

VRE - Enterococcus Resistente à Vancomicina

MDR - Microrganismos Multi-droga Resistentes

ITU- Infecção do Trato Urinário

NHSN - National Healthcare Safety Network

FDA - Federal Drug Administration

CNPq - Conselo Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico.

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

UFPEDA - Universidade Federal de Pernambuco Departamento de Antibióticos

CMI - Concentração Mínima Inibitória

MDR - Multi-droga Resistente

rRNA – Ácido Ribonucléico ribossômico

ESKAPE - *Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp*

QS – *Quorum – Sensing*

ESP – Proteína de Superície de Enterococcus

GelE - Gelatinase

VREfm – *Enterococcus faecium* Resistentes a Vancomicina

BHI - Brain Heart Infusion Agar

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

ATCC - American Type Culture Collection

OD – Densidade óptica

VSE – *Enterococcus* Sensíveis a Vancomicina

BrCAST - *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

EMA - European Medicines Agency

EI – Evidências Insuficientes

AgNPs – Nanopartículas de Prata

TSB - *Trypticase Soy Broth*

MALDI –TOF - Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight

VRE - Enterococcus Resitentes a Vancomicina

VBNC - Células Viáveis Não – Cultiváveis

THG- TransferênciaHorizontal de Gene

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....**15**

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....**17**

2.1. GÊNERO *ENTEROCOCCUS*.....**17**

2.1.1. Características fisiológicas e bioquímicas.....**17**

2.1.2. Características morfológicas e taxonômicas do gênero *Enterococcus*.....**18**

2.2. CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS ESPÉCIES *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*.....**19**

2.3. RESISTÊNCIA BACTERIANA.....**20**

2.3.1. Resistência de *Enterococcus* a vancomicina e linezolida.....**24**

2.4. FATORES DE VIRULÊNCIA.....**25**

2.4.1. Características gerais de biofilme.....**26**

3. OBJETIVOS.....**28**

3.1. GERAL.....**28**

3.2. ESPECÍFICOS.....**28**

4. REFERÊNCIAS.....**29**

5. ARTIGO CIENTÍFICO.....**34**

6. CONCLUSÃO GERAL.....**57**

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Enterococcus* corresponde a bactérias gram-positivas pertencentes ao filo Firmicutes. Atualmente, este gênero engloba 60 espécies que apresentam morfologia ovóide ou de cocos. São microrganismos ubíquos que possuem capacidade de resistir a alterações ambientais extremas e estão presentes na microbiota humana e animal. Algumas bactérias deste grupo podem se comportar como patógenos oportunistas, destacando-se *E. faecalis* e *E. faecium*, as quais podem ser classificadas como Multidroga-Resistentes (MDR), especialmente os *Enterococcus* Resistentes à Vancomicina (VRE) constituindo uma ameaça à saúde pública mundial (RAMSEY, HARTKE, HUYCKE, 2014; CATTOIR, 2022).

A resistência intrínseca desses isolados e a capacidade de adquirir resistência a diversas classes de antibióticos tornam as infecções difíceis de serem tratadas, pois normalmente o paciente apresenta um período da internação prolongado aumentando os riscos a infecções secundárias e elevando os custos para os órgãos de saúde. Desde 1980 os enterococos passaram a adquirir resistência à vancomicina de forma crescente e global. A espécie *E. faecalis*, por muitos anos, foi indicada como o patógeno principal responsável pelas infecções em ambientes hospitalares. Recentemente, estudos vêm mostrando um crescimento considerável do número de infecções hospitalares causadas pela outra espécie patogênica do gênero, *E. faecium* (PIEZZI et al., 2022; RAMOS et al., 2023; SUGAI., 2023). Esses dados demonstram a necessidade do enfrentamento destas infecções e a busca imediata por alternativas terapêuticas eficazes para seu controle. As principais opções de tratamento para os VRE são a linezolida e a daptomicina. Embora a daptomicina tenha indicação para tratamento de outras espécies gram-positivas, este fármaco é uma alternativa terapêutica aplicada na clínica para tratar as infecções enterocócicas (GAO et al., 2018; GÖK et al., 2019).

Além dos elevados perfis de resistência observados nos enterococos, estes possuem fatores de virulência que contribuem na sua patogenicidade, principalmente na formação, adesão e dispersão do biofilme bacteriano presentes no estágio crônico da infecção dificultando, ainda mais, o enfrentamento e controle das infecções causadas por estes patógenos no ambiente hospitalar (ALZAHRANI et al., 2022).

Biofilmes são um conjunto de microrganismos envolvidos por uma matriz polimérica extracelular produzidos por eles que permite a aderência em superfícies bióticas e abióticas, e que variam tanto na expressão gênica quanto na taxa de crescimento em relação à forma planctônica. A formação do biofilme permite a sobrevivência dos microrganismos em ambientes hostis e contribui para o desenvolvimento da resistência a antibióticos, fatores que são essenciais para a persistência de infecções bacterianas (RATHER, 2021).

Sendo assim, o objetivo principal deste trabalho foi caracterizar fenotípica e molecularmente, os isolados clínicos de *E. faecium* obtidos em um hospital público da RMR, Pernambuco, nordeste do Brasil e verificar o efeito da vancomicina e linezolida sobre o biofilme.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 GÊNERO *ENTEROCOCCUS*

2.1.1. Características fisiológicas e bioquímicas

Os *Enterococcus* são microrganismos presentes no ambiente e na microbiota intestinal de humanos e animais vertebrados e invertebrados. Algumas espécies são utilizadas na composição e produção de probióticos em alimentos fermentados. Algumas bactérias podem ser utilizadas como indicadores de contaminação da água, da qualidade de alimentos e bioconservantes. Algumas espécies possuem a capacidade de atuar como agentes oportunistas sendo responsáveis por graves infecções relacionadas a biofilmes em humanos suscetíveis, tanto na comunidade quanto em ambientes hospitalares (BRAÏEK; SMAOUNI, 2019; FIORE; TYNE; GILMORE, 2019; GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019; LEE et al., 2019).

Estes microrganismos são bactérias anaeróbias facultativas, oxidase e catalase negativos, produtoras de ácido lático, capazes de tolerar altas variações de temperatura (10 - 45 °C), com temperatura ótima entre 30 - 35 ºC. Suportam amplos gradientes de pH (4,5 - 9,6), sobrevivem a dessecação e fazem a hidrólise da esculina na presença de 40% de sais de bile, fator importante para sua identificação fenotípica. Diferem-se de outros gêneros pela hidrólise do Pirrolidonil-β-naftilamida (PYR) e suportam meios hipersalinos com concentrações altas de NaCl (TORRES et al., 2018; BRAÏEK; SMAOUNI, 2019; LEE et al., 2019; FIORE; TYNE; GILMORE, 2019; GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019).

O gênero *Enterococcus* geralmente compõe uma porção pequena da microbiota intestinal. Por serem consideradas bactérias que produzem ácido lático, foram inicialmente subestimadas quanto a sua potência metabólica e quanto à sua patogenicidade. O aumento da densidade dessas populações no trato gastrointestinal parece ser essencial para o surgimento de infecções enterocócicas, acompanhado da exposição de pacientes hospitalares a antimicrobianos. Além de alterações substanciais na microbiota do indivíduo, facilitando a colonização de VRE, permitindo a troca de genes de resistência/virulência e possibilitando, portanto, uma maior adaptabilidade destas bactérias (ARIAS; MURRAY, 2012). Outra característica importante de algumas espécies de *Enterococcus* é sua habilidade em persistirem no *habitat* em que estão inseridos como Células Viáveis Não-Cultiváveis (VBNC). Nesse estado (VBNC), as células bacterianas mantêm

resistência aos antibióticos, mas não se dividem, nem crescem em laboratório ou ambiente hospitalar, porém não estão mortas e possuem a capacidade de voltar a se reproduzirem. Esse processo metabólico é provocado pelas condições extremas de temperatura, déficit nutricional, radiação solar e concentração osmótica no meio em que estão submetidas (RAMADHAN; HEGEDUS, 2005; RAMSEY; HARTKE; HUYCKE, 2014).

2.1.2. Características taxonômicas e morfológicas do gênero *Enterococcus*

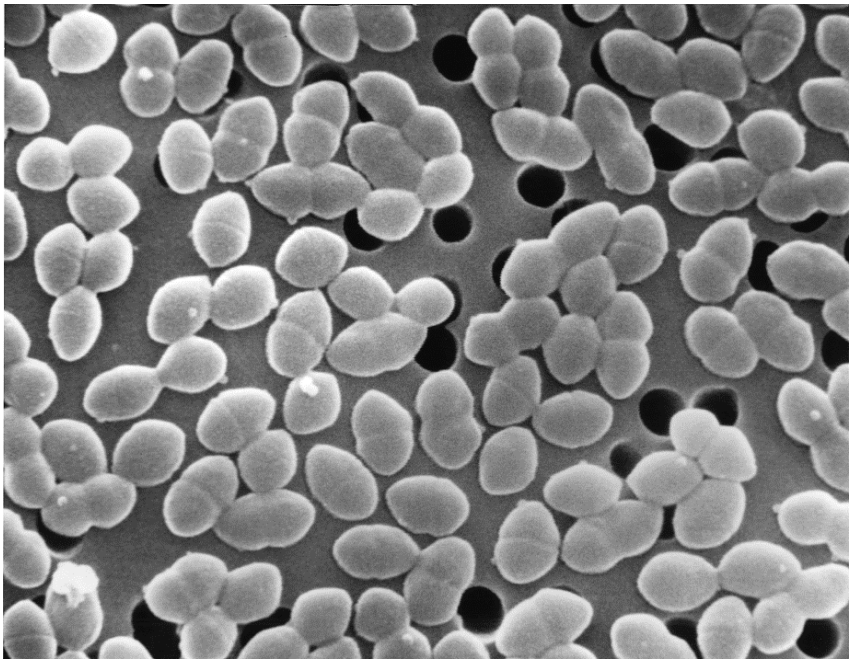
Em 1899, Thiercelin descreveu pela primeira vez um diplococo, gram-positivo. Em 1906, Andrewes e Harder classificaram os enterococos como *Streptococcus faecalis*, baseados em sua habilidade de formar cadeias longas ou curtas. No entanto, foi só a partir de 1933, que os cientistas, no caso, Lancefild introduziu um sistema para identificar e classificar os estreptococos baseados em grupos sorológicos. Todos os enterococos conhecidos da época foram classificados como estreptococos do grupo D, mas devido às características bioquímicas, morfológicas e moleculares essas bactérias foram reunidas em um gênero próprio denominado, então, de *Enterococcus* (THIERCELIN, 1899; DEVRIESE; POT, 1995).

As bactérias deste gênero pertencem à família Enterococcaceae, ordem Lactobacillales, classe Bacilli e filo Firmicutes. Atualmente, existem aproximadamente 60 espécies confirmadas, a maioria descoberta no século XXI e de fontes não humanas, como *E. plantarum* e *E. ureilyticus* (ocorrência em vegetais), *E. quebecensis, E. rivorum, E. ureasiticus* (ocorrência em água) e *E. canis, E. phoeniculicola* e *E. devriesei* (ocorrência em animais) (TORRES et al., 2018; RŮŽIČKOVÁ et al., 2020; DAPKEVICIUS et al., 2021; KRAWCZYK et al. 2021). Outras espécies são responsáveis por infecções em hospedeiros suscetíveis, como *E. casseliflavus, E. gallinarum*e e *E. raffinosus*. No entanto, *E. faecalis* e *E. faecium* são responsáveis pela maioria das infecções em humanos (CH'NG *et al*., 2018; GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019; RŮŽIČKOVÁ et al., 2020; DAPKEVICIUS et al., 2021).

Os microrganismos pertencentes a este gênero não possuem lipídeos ou proteínas em sua parede celular, a qual é formada por uma camada única e espessa constituída basicamente por peptídeoglicano. O ácido teicóico é o antígeno principal encontrado nesta estrutura. As espécies de *Enterococcus* possuem morfologia celular ovóide ou de cocos, não formam esporos, podendo

existir de forma isolada, aos pares, cadeias curtas ou formando grupos, ver figura 1 (GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019).

Figura 1: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de *Enterococcus sp*.



Fonte:https://phil.cdc.gov/details.aspx?pid=209. Site acessado em 03/03/2023.

2.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS ESPÉCIES *E. faecalis* e *E. faecium*

Estudos de genômica e genética populacional mostram que existem duas subpopulações de *E. faecium*: a primeira, comporta os comensais do trato gastrointestinal e geralmente não estão relacionados às infecções clínicas; enquanto que a segunda, corresponde a linhagens causadoras de surtos hospitalares e infecções oportunistas em pacientes hospitalizados, além de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde, as conhecidas IRAS (RŮŽIČKOVÁ et al., 2020; ZHOU et al., 2020).

As IRAS mais comuns causadas por esses patógenos são infecções intra-abdominais, Infecções do Trato Urinário (ITU), bacteremias, infecções dos tecidos moles, infecções associadas a dispositivos, endocardites hospitalares e adquiridas na comunidade. Isso se deve a capacidade desse gênero resistir a diversas condições ambientes, permitindo a colonização de novos hospedeiros. Esses microrganismos aparecem na microbiota de bebês saudáveis, não

causando doenças nesses pacientes. Em indivíduos suscetíveis, comprometidos imunologicamente, essas bactérias são capazes de sobreviverem nos ambientes com a presença de antibióticos e causarem infecções (CH'NG et al., 2019; GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019; RŮŽIČKOVÁ et al., 2020).

Os enterococos aparecem como principais causas de infecções hospitalares. Desde os anos de 1970 têm-se observado a predominância de *E. faecalis* e *E. faecium* responsáveis por essas infecções, sendo *E. faecalis* o representante deste gênero mais frequentemente citado na literatura como causador de doenças infecciosas (RAMOS et al., 2023). No entanto, nas duas últimas décadas houve um aumento significativo também da presença de *E. faecium* como responsável pelas infecções dentro do ambiente hospitalar e na comunidade (RAMOS et al., 2023; GOLOB *et al.*, 2019), o que despertou ainda mais o interesse da comunidade acadêmica pelas infecções causadas por estes patógenos.

Enterococcus faecium possuem a capacidade de adquirir genes de resistência e virulência, contribuindo com o aumento das infecções. Faz parte de um grupo de patógenos multirresistentes responsáveis pela maioria das IRAS em todo mundo chamado ESKAPE, representados pelas seguintes espécies: *Enterococcus spp, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter sp*. Este grupo apresenta resistência a vários antibióticos, devido ao uso inadequado desses medicamentos. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), os patógenos ESKAPE estão entre os microrganismos que possuem prioridade na necessidade de novas abordagens terapêuticas (CH'NG *et al*., 2019; DAPKEVICIUS *et al.,* 2021; RŮŽIČKOVÁ *et al.,* 2020; TASKEEN, *et al*.,2022).

2.3 RESISTÊNCIA BACTERIANA

A resistência a antimicrobianos é um grave e desafiador problema de saúde pública no mundo inteiro. Segundo dados da OMS, as bactérias resistentes causam anualmente 700 mil mortes em todo o mundo, e estima-se que em 2050 esses números cheguem a 10 milhões de mortes por ano (OMS, 2018; TEIXEIRA; FIGUEIREDO; FRANÇA, 2019; HASSOUN-KHEIR et al., 2020; NWOBODO et al, 2022).

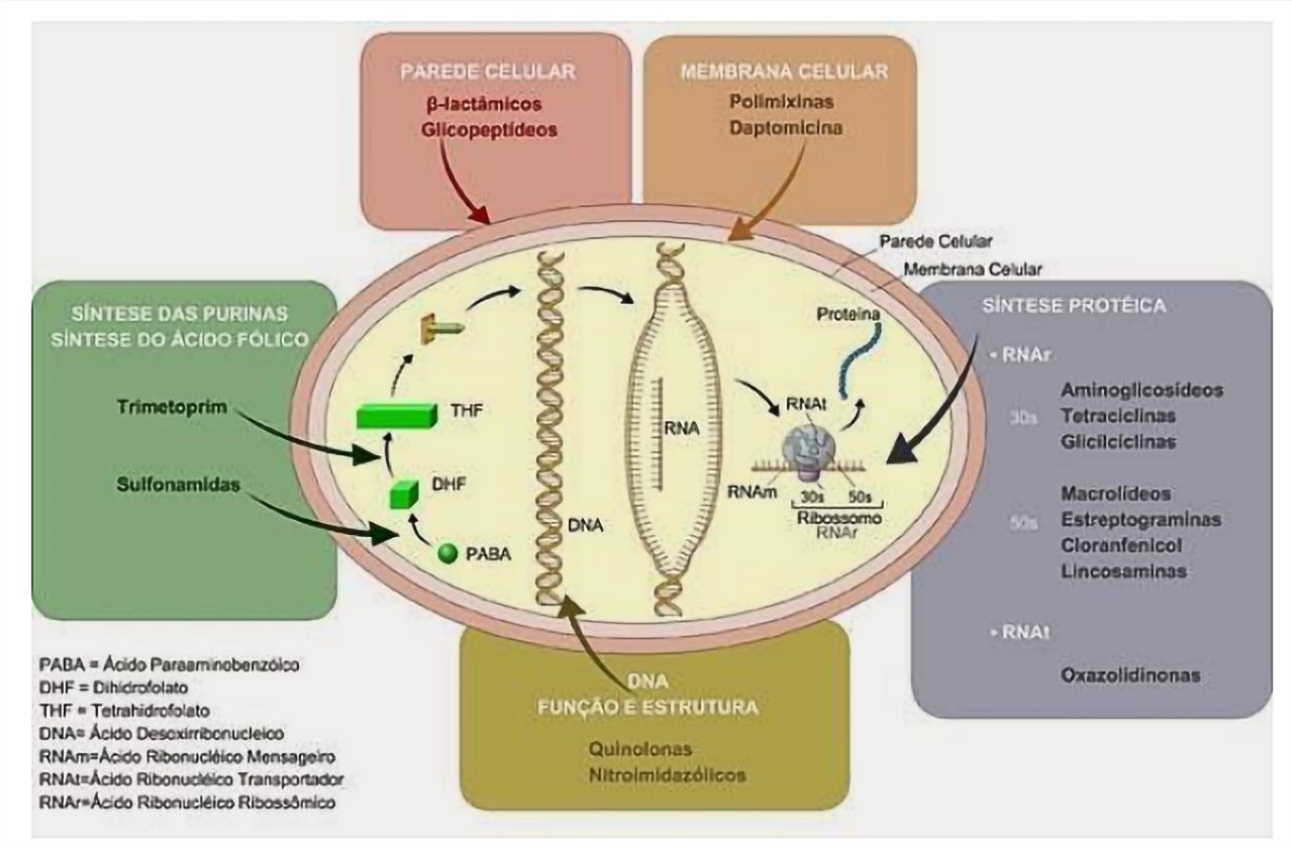
Essa problemática de saúde global deve-se principalmente ao uso excessivo de antimicrobianos prescritos para profilaxia de possíveis infecções microbianas e o uso incorreto

por parte dos pacientes. Além disso, a exposição a baixas doses tornaram estas drogas ineficazes contra vários agentes infecciosos. No ambiente hospitalar e comunitário, a falta de higienização e inspeção inadequadas favorece a disseminação de bactérias resistentes, sendo este um dos grandes desafios a serem superados nestes ambientes (ABADI et al., 2019).

As drogas naturais ou sintéticas são capazes de inibir o crescimento do microrganismo ou causar a sua morte. Diferem entre si física e quimicamente, por meio de mecanismos de ação distintos, tais como: inibição ou prejuízo na formação de membrana celular, inibição da síntese da parede celular, inibição de síntese protéica, alteração na síntese de ácidos nucléicos e alterações no metabolismo celular. Esta diversidade pode diversificar o alvo seletivo, com diferente teor de toxicidade e várias possibilidades de administração, ver Figura 2 (TEIXEIRA; FIGUEIREDO; FRANÇA, 2019).

A resistência em bactérias é um evento fisiológico que ocorre por meio de mutações, transdução e seleção, em resposta ao uso de antibióticos e sua presença no ambiente. Os patógenos possuem e recebem genes de resistência que agem mediando mecanismos bioquímicos capazes de inibir a ação dos fármacos que podem ocorrer por meio de mutações espontâneas no DNA ou por plasmídeos, fato que agrava a evolução do desenvolvimento da resistência antimicrobiana (HASSOUN-KHEIR et al., 2020).

Figura 2: Esquema dos mecanismos de ação dos antimicrobianos sobre as células bacterianas.



Fonte: MOTA *et al.*, (2010).

Diversos fatores de risco podem favorecer o aparecimento de microrganismos Multidroga-Resistentes (MDR), dentre eles estão o uso indiscriminado na clínica, na pecuária e na agricultura, a precariedade na prevenção e controle de infecções e a falta de políticas públicas voltadas para a conscientização da população quanto ao uso e descarte correto desses medicamentos. As infecções causadas por esses organismos são responsáveis pelo aumento da morbidade, mortalidade e necessidade de prolongar o tempo de internação de pacientes, aumentando os custos hospitalares e tornando ineficazes algumas classes de medicamentos. As IRAS no ambiente hospitalar, segundo o *National Healthcare Safety Network* (NHSN), aumenta quando o paciente tem a necessidade de fazer uso de cateteres, ventilação mecânica e quando apresentam infecções da corrente sanguínea (ABADI et al., 2019; TEIXEIRA; FIGUEIREDO; FRANÇA, 2019; HASSOUN-KHEIR et al., 2020; LIU; DICKTER, 2020).

As bactérias possuem dois tipos de resistência: intrínseca e adquirida. A intrínseca quando sua resistência genética é codificada pelo DNA cromossômico. Já a adquirida, corresponde a uma alteração no DNA bacteriano expressando, assim, uma nova característica fenotípica. Este tipo de resistência é frequente e preocupante, porque os microrganismos transferem genes de resistência entre si, os quais podem integrar ao cromossomo e assim serem passados de geração em geração ou podem ser adquiridos e mantidos em um estado extracromossômico, em um plasmídeo bacteriano, o qual pode atuar como um vetor na disseminação destes genes de resisência (MCMANUS, 1997). Outro fator que favorece consideravelmente a propagação de genes de resistência corresponde a Transferência Horizontal de Genes (THG), esta é dividida em três mecanismos básicos: Conjugação, Transdução e Transformação. Na conjugação, os plasmídeos são transferidos via *pili* sexual, podendo ocorrer entre espécies diferentes. Na transdução, os genes de resistência são transferidos por meio de bacteriófagos, e na transformação, as bactérias conseguem captar genes de resistência do ambiente no qual estão inseridas. Um dos meios utilizados pelas bactérias para transferência gênica corresponde aos transposons que são sequências de inserção de DNA da bactéria que podem saltar de cromossomo para plasmídeo e vice-versa, bem como de plasmídeo para plasmídeo transferindo genes de resistência (MCMANUS, 1997; LARMINAUX; CAMERON, 2019).

As bactérias expressam os genes de resistência fenotípicamente interferindo bioquimicamente contra o antimicrobiano para o qual apresenta resistência. Esses microrganismos são capazes de hiper produzir uma enzima capaz de inativar a droga e podem, assim, restringir o acesso do antibiótico em virtude de sua membrana celular, bem como removendo a substância do meio celular. Também podem alterar o sítio de ligação para que o antimicrobiano não possa mais acessá-lo (LIU; DICKTER, 2020).

2.3.1 Resistência de Enterococos à vancomicina e linezolida

Inicialmente, os enterococos tiveram sua relevância clínica subestimada. Por estarem presentes na microbiota humana, foram considerados menos agressivos, inclusive inofensivos em indivíduos saudáveis. A utilização desenfreada de antibióticos de amplo espectro e de dispositivos implantáveis, bem como da ubiquidade dos enterococos possibilitaram que esses

organismos aumentassem sua importância médica, se tornando a segunda causa de morte em infecções hospitalares no mundo (RAZA et al., 2018).

Até 2017 este gênero aparece como o segundo agente principal de IRAS e o principal patógeno responsável por infecções da corrente sanguínea. O crescente aumento de enterococos resistentes à penicilina prejudicou o tratamento de endocardites e acendeu um alerta para os riscos de infecções por este grupo de bactérias. A necessidade de combinar terapias com outras classes de antibióticos foi uma alternativa empregada para o aumento no número de cura de até 80% dos pacientes tratados e, a cada nova terapia utilizada, os enterococos apresentavam mecanismos intrínsecos e adquiridos de resistência (MILLER et al., 2020).

Esses microrganismos são naturalmente resistentes a alguns aminoglicosídeos e cefalosporinas. O gênero possui, ainda, a capacidade de adquirir resistência a outros antimicrobianos, como os glicopeptídeos e aminoglicosídeos de alto nível. Os primeiros VRE surgiram na década de 1980 e se tornaram uma ameaça à saúde mundial. Tem-se observado o aumento do surgimento de resistência a alternativas terapêuticas mais recentes, como oxazolidinonas e daptomicina dificultando e limitando, portanto, o tratamento das infecções causadas por essas espécies (GÖK et al., 2020; MILLER et al., 2020; TIBÚRCIO, 2022).

O antibiótico vancomicina que, pertence a classe dos glicopeptídeos, é utilizado em infecções graves em humanos. Os glicopeptídeos atuam inibindo a síntese da parede celular das bactérias, ligando se ao terminal D alanina D alanina do precursor do peptidoglicano, bloqueando as etapas subseqüentes da formação da parede celular bacteriana. Os enterococos, por sua vez, modificam a síntese do pentapeptídeo, como mecanismo de resistência, o terminal para D – alanina – D – lactato ou D – alanina – D – serina. Esses terminais dos precursores alterados são determinados pelo gene responsável pela resistência e se ligam com menor afinidade aos glicopeptídeos (CATTOIR et al., 2014; TORRES et al., 2018). Já o linezolida faz parte da classe dasoxazolidinonas e é o único fármaco desta classe aprovado pela *United States Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de bacteremia em VRE. Esta droga é bacteriostático que age no ribossomo da bactéria e impede o acoplamento do complexo aminoacilRNA e, desta forma, inibe a síntese da cadeia de polipeptídeo. A resistência ocorre quando há mutação no *rRNA 23S*, modificando o sítio de ligação deste antimicrobiano e, consequentemente, diminuindo sua afinidade pela droga, causando um aumento no valor da Concentração Mínima Inibitória

(CMI). A resistência também ocorre se houver aquisição dos genes *cfr* ou *optrA*. Uma informação importante corresponde ao número de alelos mutantes nos isolados os quais serão determinantes para a eficácia do antibiótico (MILLER *et al.*, 2020; PINCUS *et al.*, 2022).

2.4 FATORES DE VIRULÊNCIA

Este gênero é capaz de viver em condições extremas por possuírem a capacidade de se adaptarem a partir do desenvolvimento de mecanismos de virulência (DUTKA-Malen et al., 1995; GOLOB et al., 2019; MARGHMALEK et al., 2021; TIBÚRCIO et al., 2022). Os enterococos possuem elementos na superfície de suas membranas capazes de reconhecer moléculas de adesão, antígenos de superfície, substâncias de agregação e proteínas que facilitam sua adesão aos tecidos dos hospedeiros infectados. Esses fatores de virulência estão diretamente envolvidos na formação de biofilme, essencial na cronicidade das infecções (TIBÚRCIO et al., 2022). Outro agravante é a administração de concentrações subinibitórias de fármacos no tratamento de pacientes com infecções por biofilmes. Essas concentrações baixas de antimicrobianos funcionam como moléculas sinalizadoras e mediadoras de uma série de processos celulares que resultam no estímulo à formação de biofilme, esse processo é denominado como *Quorum-Sensing* (QS) (CHAJECKA-WIEERZCHOWSKA et al. 2016; TIBÚRCIO et al. 2022).

Não são apenas os fatores de resistência que são transmitidos entre os microrganismos. Os fatores de virulência são também transmissíveis entre as espécies, tais como: proteína de superfície extracelular, adesinas da parede bacteriana, substância de agregação, *operon* citolisina, gelatinase, hialuronidase, ácido lipoteicóico, toxina citolisina e a formação de biofilme (CHAJECKA-WIEERZCHOWSKA et al. 2016; ZHONG et al. 2021). Estes fatores de virulência são somados aos de resistência e participam diretamente das etapas da infecção.

Dentre os fatores de virulência está a Proteína de Superfície do Enterococos (ESP), codificada pelo gene *esp*, que participa da adesão e formação de biofilme;,aumenta a sobrevivência da bactéria e a resistência a antimicrobianos. Outro fator de virulência muito importante é a gelatinase (GelE), codificada pelo gene *gelE*, capaz de desintegrar colágeno, hemoglobina e caseína, favorecendo o desenvolvimento do biofilme. A produção de biofilme é mais intensa em isolados que apresentam esses genes, mas não são dependentes de sua presença.

2.4.1 Características gerais de biofilme

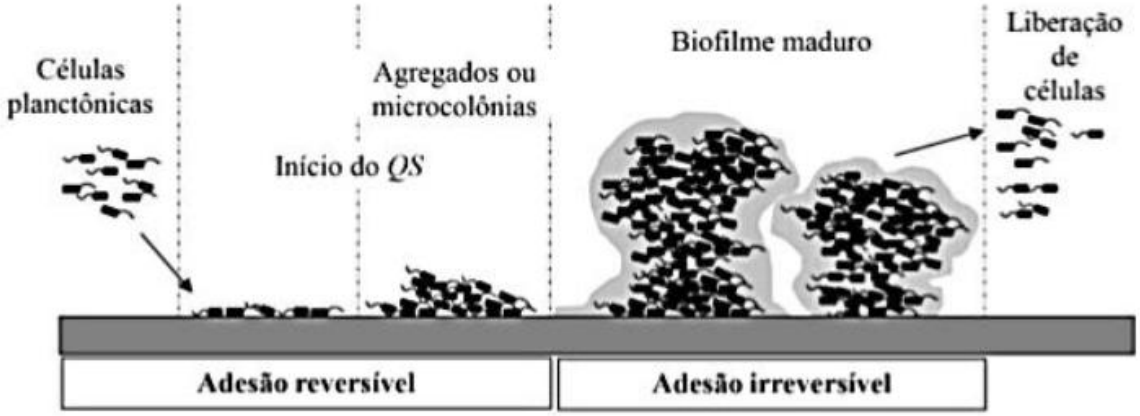
Grande parte dos microrganismos patogênicos possui a capacidade de desenvolver mecanismos de defesa para sobreviver em situações hostis, em que são submetidos à ação do sistema imunológico do hospedeiro, somado à ação de antimicrobianos. Esses organismos são capazes de formar biofilmes dificultando o tratamento de pacientes (TRENTIN et al., 2013; ZHANG et al., 2020).

As bactérias se apresentam em duas formas básicas de vida: o modo planctônico ou livre ou na forma de células sésseis, o biofilme. As células planctônicas se proliferam, se propagam para novos territórios, se agrupam e formam o biofilme. Esta fase caracteriza a infecção crônica. Assim, o biofilme é definido como uma comunidade de microrganismos mergulhados numa matriz exopolissacarídica ou também conhecida como matriz polimérica extracelular (TRENTIN et al., 2013; SINGH et al., 2017; TIBÚRCIO et al., 2022).

Em sua forma planctônica, estes microrganismos se ligam à superfície biótica ou abiótica de maneira aleatória por meio do movimento browniano e forças gravitacionais, mas também podem se unir a ela por meio de *pili* e/ou de flagelos. Esse primeiro estágio de formação, chamado de adesão reversível, é regido por interações físico-químicas, eletrostáticas e hidrofóbicas e forças hidrodinâmicas e de van der Waals. Nessa etapa, há constante comunicação entre essas células, havendo reconhecimento célula – a – célula e liberação de moléculas auto indutoras capazes de transcrever genes responsáveis por diversas funções na formação do biofilme, ou seja, o QS (TRENTIN *et al.*, 2013; SINGH *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2023).

No segundo estágio ou etapa irreversível, as bactérias fortalecem a adesão com a crescente produção de matriz exopolissacarídica no decorrer do tempo. O biofilme maduro tem formato estrutural de um cogumelo, contendo as bactérias de mesma espécie ou de várias, matriz exopolissacarídica e os canais de água que servirão para obtenção de nutrientes e remoção de metabólitos. Quando houver a necessidade de colonização de novos locais mais favoráveis para a sobrevivência dos microrganismos ocorre a dispersão das células planctônicas e reinício de todo processo. Ver figura 3 (TRENTIN et al., 2013; SINGH et al., 2017; TIBÚRCIO et al., 2022; LIU et al., 2023).

Figura 3: Etapas do desenvolvimento dos biofilmes.



Fonte: Adaptado de (TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar fenotípica e molecularmente isolados clínicos de *Enterococcus faecium* e verificar o efeito da vancomicina e da linezolida sobre o biofilme destes isolados.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar fenotípica e molecularmente 15 isolados clínicos de *E. faecium*;
- Encontrar as Concentrações Mínimas Inibitórias (CIM) da vancomicina e linezolida nestes isolados;
- Identificar genes de resistência à vancomicina e linezolida nos isolados investigados;
- Avaliar o efeito da vancomicina e linezolida no biofilme deste patógeno.

4. REFERÊNCIAS

ALZAHRANI, Othman M. et al. Antimicrobial resistance, biofilm formation, and virulence genes in Enterococcus species from small backyard chicken flocks. **Antibiotics**, v. 11, n. 3, p. 380, 2022.

ARIAS, Cesar A.; MURRAY, Barbara E. The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 266-278, 2012.

BEN BRAIEK, Olfa; SMAOUI, Slim. Enterococci: between emerging pathogens and potential probiotics. **BioMed research international**, v. 2019, 2019.

CATTOIR, Vincent. The multifaceted lifestyle of enterococci: genetic diversity, ecology and risks for public health. **Current Opinion in Microbiology**, v. 65, p. 73-80, 2022.

CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA, Wioleta; ZADERNOWSKA, Anna; ŁANIEWSKA-TROKENHEIM, Łucja. Virulence factors, antimicrobial resistance and biofilm formation in Enterococcus spp. isolated from retail shrimps. **LWT-Food Science and Technology**, v. 69, p. 117-122, 2016.

CHINEMEREM NWOBODO, David et al. Antibiotic resistance: The challenges and some emerging strategies for tackling a global menace. **Journal of clinical laboratory analysis**, v. 36, n. 9, p. e24655, 2022.

CH'NG, Jun-Hong et al. Biofilm-associated infection by enterococci. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 82-94, 2019.

DA SILVA TRENTIN, Danielle; GIORDANI, Raquel Brandt; MACEDO, Alexandre José. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 213-236, 2013.

DAPKEVICIUS, Maria de Lurdes Enes et al. Current trends of enterococci in dairy products: A comprehensive review of their multiple roles. **Foods**, v. 10, n. 4, p. 821, 2021.

DEVRIESE, LA; POTE, Bruno. O gênero enterococcus. In: **Os gêneros de bactérias lácticas** . Springer, Boston, MA, 1995. p. 327-367.

DUTKA-MALEN, Sylvie; EVERS, Stefan; COURVALIN, Patrice. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. **Journal of clinical microbiology**, v. 33, n. 1, p. 24-27, 1995.

FIORE, Elizabeth; VAN TYNE, Daria; GILMORE, Michael S. Patogenicidade dos enterococos. **Espectro de microbiologia** , v. 7, n. 4, pág. 7.4. 9 de 2019.

GAO, Wei; HOWDEN, Benjamin P.; STINEAR, Timothy P. Evolution of virulence in Enterococcus faecium, a hospital-adapted opportunistic pathogen. **Current opinion in microbiology**, v. 41, p. 76-82, 2018.

GARCÍA-SOLACHE, Mónica; RICE, Louis B. The Enterococcus: a model of adaptability to its environment. **Clinical microbiology reviews**, v. 32, n. 2, p. e00058-18, 2019.

GÖK, ŞerifeMerve et al. Investigation of antibiotic resistance and virulence factors of Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis strains isolated from clinical samples. **Mikrobiyolojibulteni**, v. 54, n. 1, p. 26-39, 2020.

GOLOB, Majda et al. Antimicrobial resistance and virulence genes in Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis from humans and retail red meat. **BioMed research international**, v. 2019, 2019.

HASSOUN-KHEIR, Nasreen et al. Comparison of antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes abundance in hospital and community wastewater: A systematic review. **Science of the Total Environment**, v. 743, p. 140804, 2020.

KRAWCZYK, Beata et al. The many faces of Enterococcus spp.—commensal, probiotic and opportunistic pathogen. **Microorganisms**, v. 9, n. 9, p. 1900, 2021.

LEE, Terence et al. Antimicrobial-resistant CC17 Enterococcus faecium: The past, the present and the future. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 16, p. 36-47, 2019.

LERMINIAUX, Nicole A.; CAMERON, Andrew DS. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. **Canadian journal of microbiology**, v. 65, n. 1, p. 34-44, 2019.

LIU, Jia-Yia; DICKTER, Jana K. Nosocomial infections: a history of hospital-acquired infections. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics**, v. 30, n. 4, p. 637-652, 2020.

LIU, Yanbo et al. The characteristic evolution and formation mechanism of hybrid microalgae biofilm and its application in mariculture wastewater treatment. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 11, n. 3, p. 109645, 2023.

MARGHMALEK, Saba Asgharzadeh et al. Survey on antimicrobial resistance and virulence-related genes in Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis collected from hospital environment in the north of Iran. **Gene Reports**, v. 24, p. 101233, 2021.

MCMANUS, M. Claire. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 54, n. 12, p. 1420-1433, 1997.

MILLER, William R. et al. Resistance in vancomycin-resistant enterococci. **Infectious Disease Clinics**, v. 34, n. 4, p. 751-771, 2020.

RAHIMI, Nematolah et al. Presence of virulence factor genes (gelE and esp) and biofilm formation in clinical Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium isolated from urinary tract infection in Isfahan, Iran. **Gene Reports**, v. 13, p. 72-75, 2018.

PIEZZI, Vanja et al. Nosocomial outbreak of vancomycin-resistant Enterococcus faecium (VRE) ST796, Switzerland, 2017 to 2020. **Eurosurveillance**, v. 27, n. 48, p. 2200285, 2022.

PINCUS, Nathan B. et al. Breakthrough daptomycin-, linezolid-, vancomycin-resistant Enterococcus faecium bacteremia during protracted daptomycin therapy: A case report. **IDCases**, v. 29, p. e01593, 2022.

RAMADHAN, A. A.; HEGEDUS, E. Survivability of vancomycin resistant enterococci and fitness cost of vancomycin resistance acquisition. **Journal of clinical pathology**, v. 58, n. 7, p. 744-746, 2005.

RAMSEY, Matthew; HARTKE, Axel; HUYCKE, Mark. The physiology and metabolism of enterococci. **Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection [Internet]**, 2014.

RATHER, Muzamil Ahmad; GUPTA, Kuldeep; MANDAL, Manabendra. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1-18, 2021.

RAZA, Taskeen et al. Vancomycin resistant Enterococci: A brief review. **J Pak Med Assoc**, v. 68, n. 5, p. 768-772, 2018.

RŮŽIČKOVÁ, Michaela; VÍTĚZOVÁ, Monika; KUSHKEVYCH, Ivan. The characterization of Enterococcus genus: resistance mechanisms and inflammatory bowel disease. **Open medicine**, v. 15, n. 1, p. 211-224, 2020.

SINGH, S. et al. Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents. Open Microbiol J 11: 53–62. 2017.

SUGAI, Motoyuki et al. An Economic Evaluation Estimating the Clinical and Economic Burden of Increased Vancomycin-Resistant Enterococcus faecium Infection Incidence in Japan. **Infectious Diseases and Therapy**, p. 1-19, 2023.

TALEBI BEZMIN ABADI, Amin et al. World Health Organization report: current crisis of antibiotic resistance. **BioNanoScience**, v. 9, p. 778-788, 2019.

TASKEEN, Shumaila et al. ESKAPE pathogens and their potential in antimicrobial resistance: A Review. 2022.

TEIXEIRA¹, Alysson Ribeiro et al. Resistência bacteriana relacionada ao uso indiscriminado de antibióticos. 2019.

TIBÚRCIO, Aline Andréia Caixeta Magalhães et al. Effect of sub-inhibitory concentrations of antibiotics on biofilm formation and expression of virulence genes in penicillin-resistant, ampicillin-susceptible Enterococcus faecalis. **Heliyon**, v. 8, n. 10, 2022.

THIERCELIN, M. E. Morphologie et modes de reproduction de l'enterocoque. **ComptesRendusdesSeances de la Societe de Biologie et dessesFiliales**, v. 11, n. 11, p. 551-553, 1899.

TORRES, Carmen et al. Antimicrobial resistance in Enterococcus spp. of animal origin. **Antimicrobial resistance in bacteria from livestock and companion animals**, p. 185-227, 2018.

ZHANG, K. et al. Promising therapeutic strategies against microbial biofilm challenges. Front Cell Infect Microbiol 10: 359. 2020.

ZHONG, Rui et al. Antimicrobial resistance and virulence factor gene profiles of spp. isolated from giant panda oral cavities. **Journal of Veterinary Research**, v. 65, n. 2, p. 147-154, 2021.

ZHOU, Xuewei et al. Enterococcus faecium: from microbiological insights to practical recommendations for infection control and diagnostics. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2020.

ZHU, Ying; HUANG, Wei E.; YANG, Qiwen. Clinical perspective of antimicrobial resistance in bacteria. **Infection and drug resistance**, p. 735-746, 2022.

5 RESULTADOS

Os resultados desta dissertação serão apresentados em formato de artigo científico.

5.1 ARTIGO: Efeito da Vancomicina e Linezolida no Biofilme de *Enterococcus faecium* Resistentes

Autores: Renata Pereira Lima da Silva[1], Rafael Artur de Queiroz Cavalcanti de Sá[1], Sivoneide Maria da Silva[1], Carlos Alberto das Neves de Andrade[2], Sérgio Dias da Costa Junior[3], Bárbara de Azevedo Ramos[1], Maria Betânia Melo Oliveira[1]

Instituições:

1 Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil

2 Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil

3 Universidade Federal da Paraíba, Pernambuco, Brasil

RESUMO

Enterococcus faecium é uma bactéria gram-positiva presente em diversos habitats, que possui potencial para causar infecções graves em indivíduos imunocomprometidos, causando taxas elevadas de mortalidade. Os *E. faecium* Resistentes à Vancomicina (VREfm) são um problema de saúde pública global, pois possuem resistência a diversos antimicrobianos, inclusive, a fármacos utilizados como novas opções terapêuticas. Além disso, possuem mecanismos de virulência, como a formação de biofilme, que contribuem para a cronicidade de suas infecções. O objetivo deste estudo foi caracterizar fenotípica e molecularmente 15 isolados clínicos de *E. faecium* e avaliar o efeito de dois fármacos (vancomicina e linezolida) sobre o biofilme bacteriano. Os resultados confirmaram que os isolados correspondem à espécie *E. faecium* e são resistentes a vancomicina e, a maioria, sensíveis a linezolida e formadores de biofilme. Quando submetidos a concentrações inibitórias destes fármacos, *E. faecium* formou biofilme moderadamente. Para diminuir ou erradicar o biofilme, observou-se redução de formação de biofilme a partir de 2x a Concentração Mínima Inibitória (CMI) da linezolida (CMI 4mg/L) até 32x, ou seja, (128mg/L) e da vancomicina (CMI 512mg/L), a partir de 2x a CMI até 32x, ou seja, (16384mg/L). Os resultados encontrados revelam a gravidade do enfrentamento para o tratamento de infecções causadas por esse patógeno e demonstram a necessidade de ações de monitoramento e vigilância nas unidades hospitalares como medidas preventivas, uma vez que, para desestabilizar e erradicar o biofilme formado é essencial concentrações elevadas destes fármacos o que podem gerar consequências de intoxicação para os pacientes.

Palavras-chave: Gram positivas; Resistência antimicrobiana; Infecções bacterianas; Erradicação.

Introdução

Enterococcus faecium é uma bactéria gram-positiva ubíquoa que ocorre na microbiota humana (ALI et al, 2022). Em indivíduos imunocomprometidos esse microrganismo se comporta como patógeno oportunista capaz de provocar infecções graves com altas taxas de mortalidade. Na década de 1980, foram detectados os primeiros *E. faecium* Resistentes à Vancomicina (VREfm), os quais tornaram-se nos anos seguintes um problema de saúde pública global. Os VREfm, também apresentam resistência a outras classes de antimicrobianos como os aminoglicosídeos, as cefalosporinas e as penicilinas e vem adquirindo resistência a novas opções terapêuticas, como linezolida e daptomicina, representando um problema significativo a ser enfrentado pelos serviços de saúde em todo o mundo (OMS, 2018; GORRIE et al. 2019; OMS, 2019; STOGIOS; SAVCHENKO, 2020).

Bactérias desta espécie são capazes de sobreviver em condições ambientais extremas devido ao elevado arsenal genético que possuem,contendo vários genes de resistência e virulência dificultando, assim, o tratamento e gerando a cronicidade das infecções (TASKEEN et al, 2022). O gênero *Enterococcus* é integrante do grupo "ESKAPE", composto pelas espécies: *Enterococcus* spp*, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa e Enterobacter sp*. Este grupo é considerado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como grupo prioritário na necessidade de novas abordagens terapêuticas para enfrentamento das infecções causadas por estas bactérias (OMS, 2018; GEORGES et al. 2022; TASKEEN et al. 2022).

De acordo com esta organização, a Resistência Antimicrobiana (RAM) é um grave problema de saúde pública global e a estimativa é que até 2050 bactérias resistentes provoquem aproximadamente 10 milhões de mortes. Um dos fatores que contribuem para o aumento destas infecções se deve a prescrição e ao uso indiscriminado dessas substâncias pelas populações em todo o mundo (OMS, 2018).

Quando se analisa as infecções hospitalares causadas pelos VREfm observa-se que estas são, cada vez mais, comuns e que as bactérias encontram-se mais resistentes e produtoras de biofilmes, retardando a cura dos pacientes infectados e sinalizando para a necessidade urgente de

alternativas terapêuticas que eliminem ou diminuamestas infecções (SOLTANI et al., 2018; TIBÚRCIO et al. 2022).

Uma das alternativas descritas na literatura para inibir, desestabilizar ou erradicar o biofilme formado é o uso de antimicrobianos, utilizados rotineiramente na prática clínica(SILVA et al., 2020; GUPTA et al. 2017; QI et al. 2016; KWIECINSKA-PIROG et al. 2016). Concentrações variadas de diferentes fármacos vêm sendo utilizadas para este fim na tentativa de dificultar a sobrevivência dos patógenos no ambiente hospitalar, uma vez que a matriz de Substâncias Poliméricas (EPS), ou seja, o biofilme é utilizado como uma das estratégias de permanência destes agentes nestes locais e/ou em condições adversas (GRANDE; PUCA; MURARO, 2020; HEMMATI et al., 2021).

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar fenotípico e molecularmente isolados clínicos de *E. faecium* e avaliar o efeito da vancomicina e linezolida em seu biofilme, com o intuito de fornecer informações aos setores responsáveis sobre a eficácia desses fármacos no combate aos biofilmes de infecções enterocócicas.

Metodologia

Material biológico e condição de cultivo

Foram analisados 15 isolados de *E. faecium* (n=15) oriundos de um hospital público da Região Metropolitana do Recife (RMR), de três diferentes sítios de infecção (urina, *swab* retal e sangue). Estes foram cultivados em meio Brain Heart Infusion (BHI), incubados a 37 °C por 24h e armazenados em óleo mineral a temperatura ambiente e em glicerol (15%) a 80 °C negativos. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, (número do parecer: 1.480.085).

Identificação Fenotípica dos Microrganismos

Para caracterização bioquímica foi utilizado o meio específico *Pfizer Selective Enterococcus Agar* (Himedia), no qual as bactérias foram crescidas a 37 °C por 24h.

Identificação Molecular dos Microrganismos

Para confirmar a identidade taxonômica dos isolados foi utilizada a técnica de Espectrometria de Massas com Fonte de Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz e Analisador de Tempo-de-voo (MALDi-TOF MS). Para isso, as colônias bacterianas foram suspendidas em 300 µL de água Milli-Q e depois adicionados 900 µL de etanol absoluto. As suspensões foram centrifugadas a 15.600 *g* por 2 min, o sobrenadante removido e o sedimento foi seco em *SpeedVac* por 20 min. Em seguida, foram adicionados 50 µL de ácido fórmico a 70% e 50 µL de acetonitrila. A mistura foi homogeneizada em agitador vórtex, centrifugada a 15.600 *g* por 2 min e o sobrenadante transferido para um novo microtubo. A matriz preparada com ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (10 mg/mL), acetonitrila 50% e ácido trifluoroacético 0,3% foi aplicada na placa de MALDi com a amostra em temperatura ambiente para cristalização. A aquisição dos espectros de massas, em modo linear positivo (Voltagem de aceleração: 20 kV e Faixa de detecção - m/z: 2.000 – 20.000), foi realizada pelo Programa Flex ControlVersion 3.0 em Espectrômetro de Massa MALDi-TOF Autoflex III (BrukerDaltonics, Billerica, MA, USA). Os espectros de massa obtidos foram comparados com o Banco de Dados MALDi BiotyperVersion 3.1.

Perfil Fenotípico de Sensibilidade/Resistência

O perfil de sensibilidade/resistência dos isolados foi investigado para os antibióticos: vancomicina e linezolida. Para a vancomicina foram utilizadas as concentrações 1024 - 2 µg/mL e para linezolida nas concentrações de 128 - 0,25 µg/mL. O ajuste de inoculo foi a 0,5 na escala MacFarland diluído 10^8 células por mL. Em seguida, o inoculo foi diluído mil vezes para ajuste a 10^5 células. Foram utilizados 50µL de meio *Mueller Hinton* laborclin), em cada poço da placa de microdiluição adicionado a 50µL de inoculo bacteriano. Estes foram incubados a 37 °C e monitorados durante um período de 48h. Por fim, foi adicionado o corante resazurina (50µL) e incubado por 1h. O primeiro poço foi utilizado como padrão de leitura, onde não houve crescimento bacteriano. Foi utilizado controle negativo contendo apenas meio de cultura e controle positivo contendo meio e bactéria. As cepas sensíveis *E. faecalis* ATCC® 29212 e resistentes *E. faecium* ATCC® 700221 (cultura de coleção) foram utilizadas como controles.

Todo experimento foi realizado em triplicata. A classificação do perfil de resistência dos isolados foi baseada no *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCAST, 2023).

Perfil Molecular de Sensibilidade/Resistência

Para extração do DNA genômico foi utilizado o kit comercial GenEluteTM Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma®) de acordo com as orientações do fabricante. A qualidade do DNA extraído foi avaliada a partir da técnica de eletroforese em gel de agarose (1%), observado em transiluminador UV e fotodocumentado. A concentração do DNA foi determinada pela Densidade Óptica DO em Espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA) nos comprimentos de onda 260 e 280 nm, obtendo-se a estimativa da quantidade de DNA presente na amostra e seu grau de pureza.

Foram investigados genes de resistência à vancomicina e linezolida utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Para a vancomicina, foram utilizados os *primers vanA*: F-GGGAAAACGACAATTGC e R-GTACAATGCGGCCGTTA (Depardieu; Perichon; Courvalin, 2004); *vanB*: F-ACGGAATGGGAAGCCGA e R-TGCACCCGATTTCGTTC(Depardieu; Perichon; Courvalin, 2004) e *VanN*:F-CCTCTGCCATTTGTATGAAT e R-TTGACGCTTGATTTCTCTAC (Lebreton et al., 2011) seguindo as recomendações do PCR Supermix (Invitrogen®). As condições de PCR foram otimizadas e foram diferentes para cada gene: Para *vanA***,** o ciclo de desnaturação inicial foi de 94 °C por 2 min, em 34 ciclos (30s a 94°C, 30s a 62°C, 1 min a 72°C) e uma etapa final de extensão de 5 min a 72°C. Já para o *VanB,* as condições de PCR foram: ciclo de desnaturação inicial de 94 °C por 3min., 30 ciclos de 94 °C por 30s, 62 ºC por 30s, 72 °C por 30s e uma etapa final de extensão de 72 °C por 5 min. E para o *VanN,* as condições foram: ciclo de desnaturação inicial de 94 °C por 2min., 30 ciclos de 94 °C por 30s, 58 ºC por 30s, 72 °C por 1 min., e uma etapa final de extensão de 72 °C por 5 min. Os *amplicons*, uma vez obtidos, foram avaliados por eletroforese em gel de agarose (1,2 %), corado com SYBR Green (Sigma®), utilizando o marcador DNA Ladder 100 pb (Invitrogen) e fotodocumentados.

Para linezolida foram utilizados os seguintes *primers*:*cfr*: F-TGCTACAGGCGACATTGGAT e R- GACGGTTGGCTAGAGCTTCA. *optr*A F-ACCGGTGTCCTCTTTGTCAG e R-TCAATGGAGTTACGATCGCCTT e *poxt*A F-TCAGAGCCGTACTGAGCAAC e R- CGTTTCTGGGTCAAGGTGGT(Egan et al., 2020)

seguindo as recomendações do PCR Supermix (Invitrogen ®). As condições de PCR para o gene *cfr* foram as seguintes: ciclo de desnaturação inicial de 94 ºC por 30s., 30 ciclos (94 ºC por 30s, 57,6ºC por 30s, 72 ºC por 1min.) e uma etapa de extensão final de 72 ºC por 5 min. Para o gene *optr*A as condições foram: ciclo de desnaturação inicial de 95 °C por 2min. 25 ciclos (95 °C por 15s, 53 °C por 15s, 68 °C por 90s) e uma etapa final de extensão de 68 °C por 5 min. Já para o gene *poxt*A as condições foram: 40 ciclos (95 °C por 2 min, 50 °C por 3 min, 95 °C por 30s. 68°C por 5min). A tabela 1 apresenta as condições utilizadas para cada gene investigado.

Tabela 1: Condições de PCR utilizadas para cada gene investigado.

Antibiótico	Genes	Sequência 5' → 3'	Condições da PCR
Vancomicina	*vanA*	GGGAAAACGACAATTGC GTACAATGCGGCCGTTA	94 °C por 3min. 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 54 °C por 1min. 72 °C por 7 min.
Vancomicina	*vanB*	ACGGAATGGGAAGCCGA TGCACCCGATTTCGTTC	94 °C por 3min. 30 ciclos de 94 °C por 30s, 62 ºC por 30s, 72 °C por 30s. 72 °C por 5 min.
Vancomicina	*vanN*	CCTCTGCCATTTGTATGAAT TTGACGCTTGATTTCTCTAC	94 °C por 2min. 30 ciclos de 94 °C por 30s, 58 ºC por 30s, 72 °C por 1 min. 72 °C por 5 min.
Linezolida	*cfr*	TGCTACAGGCGACATTGGAT GACGGTTGGCTAGAGCTTCA	94 °C por 30s. 30 ciclos de 94 °C por 30s, 57,6 °C por 30s, 72 °C por 1 min. 72 °C por 5min.
Linezolida	*optrA*	ACCGGTGTCCTCTTTGTCAG TCAATGGAGTTACGATCGCCTT	95 °C por 2min. 25 ciclos de 95 °C por 15s, 53 °C por 15s, 68 °C por 90s. 68 °C por 5min.
Linezolida	*poxtA*	TCAGAGCCGTACTGAGCAAC CGTTTCTGGGTCAAGGTGGT	95 °C por 3 min. 40 ciclos de 95 °C por 2 min, 50 °C por 3 min, 95 °C por 30s. 68 °C por 5min.

Fonte: A autora (2023).

Ensaio Formação de Biofilme

A formação de biofilme foiinvestigada em microplacas de poliestireno pelo método de Cristal Violeta em meio BHI descrito por Stepanovic et al. (2007). Após incubação a 37 ºC por 48h neste meio o inoculo foi retirado, as microplacas lavadas (3×) com solução salina estéril a 0,9% e o biofilme fixado a 55 ºC por 60 min. Na sequência, foi acrescentado Cristal Violeta (0,4 %) em temperatura ambiente por 15 minutos, seguido de três lavagens para retirar o excesso do corante e adicionado etanol absoluto por 30 minutos. A partir das leituras da OD a 570 nm, foi determinada a média dos valores da absorbância de cada amostra (DOa) em comparação com a absorbância do controle de esterilidade (ODc). As amostras foram classificadas como fortes (4× ODc<ODa), moderadas (2× ODc<ODa ≤ 4× ODc) e fracas (ODc<ODa ≤ 2× ODc) formadoras de biofilme.

Anti- formação do biofilme

Para este experimento foram selecionados o isolado 14872 e a cepa controle UFPEDA 09.

Foram utilizadas as seguintes concentrações: 1.024-4µL/mL para os dois antibióticos (vancomicina e linezolida). As microplacas foram, então, incubadas a 37 °C por 48 h. Foi realizada a revelação do biofilme conforme descrito no tópico anterior.

Erradicação do biofilme

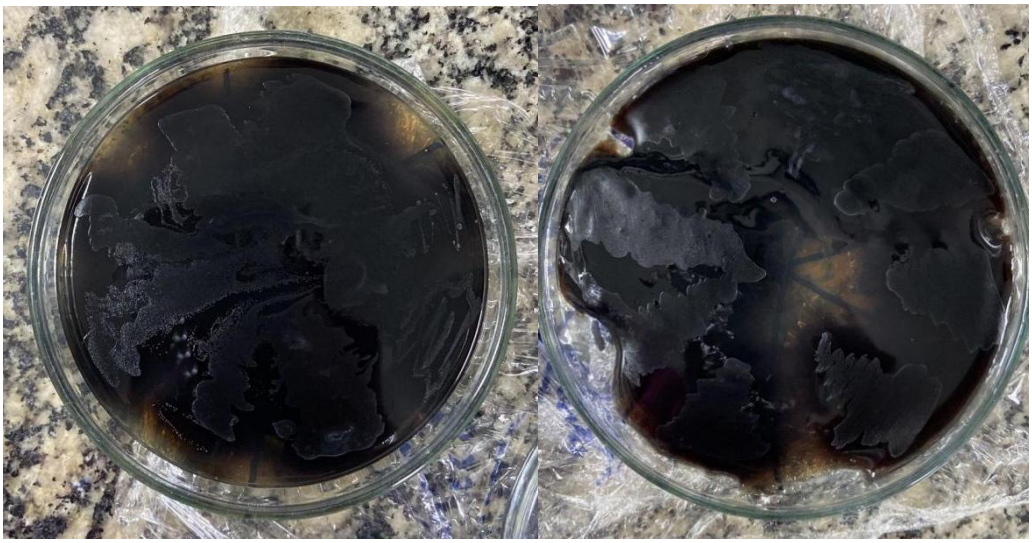
Para avaliar a eficácia dos antimicrobianos na eliminação do biofilme dos isolados 14872 e UFPEDA 09, foram utilizados, como as concentrações iniciais, os valores de CMI da vancomicina e linezolida. Em seguida, a formação de biofilme foi induzida usando o meio BHI de acordo com o procedimento anteriormente descrito. Após a etapa de fixação, cada antibiótico foi adicionado nas concentrações variando de seus respectivos CMIs até 32× CMI. Da seguinte forma: 150 µL do meio e 50 µL de vancomicina CMI (512µg/mL) nas concentrações CMI, 2xCMI, 4xCMI, 8xCMI, 16xCMI, 32xCMI e as microplacas foram incubadas a 37 °C por 48 h. Igualmente ocorreu para o segundo fármaco; foi adicionado 150 µL do meio e 50 µL de

linezolida CMI (4µg/mL), nas CMIs citadas acima, seguindo da coloração com Cristal Violeta e das leituras de OD.

Resultados e Discussão

Todos os isolados foram confirmados como pertencentes ao gênero *Enterococus* pelo meio seletivo específico, Agar Seletivo Pfizer *Enterococcus*. Esse meio de cultivo contém esculina, e as espécies de enterococos quando exposta a ele são capazes de hidrolisá-las, resultando na formação de esculetina e dextrose (QADRI, FLOURNOY, QADRI, 1987; CAMARGO et al., 2014). A esculetina, por sua vez, reage com o citrato de amônio férrico, resultando no escurecimento do meio (Figura 1). Outras bactérias gram-positivas, como os estreptococos, não possuem a capacidade de hidrolisar a esculina. Embora essa coloração seja eficiente para caracterização fenotípica dos isolados, ela não permite uma identificação em nível de espécie, sendo necessárias técnicas complementares.

Figura 1: Crescimento dos isolados bacterianos em meio específico *Pfizer Selective Enterococcus Agar*. A coloração enegrecida é um indicativo do crescimento de *Enterococcus*.



Fonte: A autora (2023).

Para realizar a caracterização dos isolados em nível de espécie, foi empregada a técnica de Espectrometria de massa MALDI-TOF, que proporcionou a identificação molecular de todos os isolados como pertencentes a *E. faecium*, com *scores* que variaram de 2.346 a 2.614 (Tabela 2). Esses resultados quando avaliados e comparados aos espectros de massa presentes no banco de dados, confirmaram a eficácia da técnica para identificação molecular dos isolados. Cada espectro de massa gerado é exclusivo para cada microrganismo analisado, tornando esse método confiável para distinguir bactérias em termos de gênero e espécie. A espectrometria de massa MALDI-TOF, foi introduzida na década de 1980 e é amplamente reconhecida como uma abordagem fundamental na identificação de microrganismos na pesquisa biomédica. Este método oferece uma alta especificidade e excelente relação custo-benefício, fornecendo resultados em um curto período de tempo. Além disso, possui um extenso banco de dados que abrange várias espécies, facilitando a identificação precisa dos microrganismos (OVIAÑO e RODRÍGUEZ-SANCHÉZ, 2020).

ID	*SCORE*	ESPECIE	SÍTIO DE COLETA	RESISTÊNCIA A VANCOMICINA (µg/mL)	RESISTÊNCIA A LINEZOLIDA(µg/mL)	GENES VANCOMICINA **	FORMAÇÃO DE BIOFILME)
15088	2461	*E. faecium*	Urina	R	S	*van*A	+
12455	2484	*E. faecium*	Swab retal	R	S	-	++
14872	2430	*E. faecium*	Urina	R	S	*van*A	++
02089	2533	*E. faecium*	Swab retal	R	S	*van*A	_
17281	2430	*E. faecium*	Urina	R	S	*van*A	_
15353	2384	*E. faecium*	Swab retal	R	S	*van*A	+
18008	2563	*E. faecium*	Sangue	R	S	*van*A	++
11170	2454	*E. faecium*	Swab retal	R	R	*van*A	+
10964	2575	*E. faecium*	Swab retal	R	S	*van*A	_
12805	2533	*E. faecium*	Swab retal	R	R	*van*A	+
16184	2346	*E. faecium*	Swab retal	R	S	*van*A	++
16206	2614	*E. faecium*	Swab retal	R	S	-	_
16598	2466	*E. faecium*	Swab retal	R	S	-	_
18300	2361	*E. faecium*	Sangue	R	S	-	++
00931	2463	*E. faecium*	Swab retal	R	*	-	+

Tabela 2: Características gerais dos isolados investigados, apresentando: identidade molecular (MALDi-TOF); sítio de coleta, perfil de resistência fenotípico; perfil de resistência molecular (apenas para o gene encontrado) e a formação de biofilme. *Não suficiente. **Apesas o gene *vanA* foi identificado. R=resistente; S=sensível. + (fraco formador de biofilme) ++ (moderado formador de biofilme). Fonte: A autora (2023).

O antibiograma dos 15 isolados de *E. faecium* está descrito na tabela 2. Todos foram resistentes à vancomicina e sensíveis a linezolida, exceto 11170 e 12805 apesar dos vários testes realizados. O isolado 00931 não apresentou valor suficiente para determinar seu perfil de susceptibilidade. Em um estudo realizado por Zerrouki et al (2021) em um hospital argelino com isolados de *Enterococcus* spp, os autores mostraram que 48 isolados da UTI eram *E. faecium* e apresentavam predominância de multirresistência, incluindo resistência a vancomicina e sensibilidade a linezolida. A resistência observada pode ser atribuída à exposição demasiada a esta classe de fármacos bem como à sua capacidade de transferência genética entre os isolados (HUANG et al, 2023).

A opção para o tratamento de VREfm, vem sendo utilizado o linezolida como fármaco de última escolha, aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) para *Enterococcus* e o daptomicina para endocardites enterocócicas, com a necessidade de mais estudos para estabelecimento de concentrações séricas a serem utilizadas contra bacteremias (BENDER et al. 2018). Embora o linezolida e daptomicina sejam as principais alternativas terapêuticas aos VREfm comumente utilizadas, alguns isolados mostram resistência a estas novas drogas, constituindo um desafio clínico, pois não existem muitas opções para tratar infecções por VREfm (O'TOOLE et al., 2023).

Para classificação de sensibilidade/resistência de cepas bacterianas é utilizada como referência a última atualização na tabela de cortes clínicos para interpretação de CMI e diâmetros de halo do BrCAST, (2023). Esta classificação estabelece novos parâmetros de sensibilidade/resistência para os microrganismos e, determina uma espécie como sendo sensível a uma droga, quando submetida à dose padrão do antimicrobiano, com alta probabilidade de sucesso terapêutico. Algumas espécies podem ser sensíveis, se houver um aumento na exposição ao antimicrobiano. Adicionalmente, determina-se como resistente, quando há alta probabilidade de falha terapêutica mesmo se houver um aumento da exposição à droga. Essas categorias são adotadas pelo BrCAST para qualquer espécie. Por fim, quando não há evidências suficientes de que uma espécie seja um bom alvo terapêutico para a droga testada em questão, o BrCAST designa apenas que as evidências são insuficientes para determinação de valores de sensibilidade ou resistência (BrCAST, 2023).

Nossos resultados reafirmam a necessidade de uma alternativa terapêutica eficaz para os VREfm. O linezolida, em nosso estudo, pareceu ser uma boa opção, já que a maioria dos isolados se mostrou sensíveis a ele. Estudos realizados comparando o resultado clínico do linezolida com a daptomicina no tratamento de infecções sanguíneas enterocóccicas, mostraram melhores resultados com o linezolida para tratar essas infecções (HUANG et al, 2023; SHI, et al, 2020). No entanto, esses dados ainda são inconclusivos e estão sendo investigados.

Segundo a nova classificação do BrCAST, possivelmente o isolado 00931 que não apresentou valor suficiente para determinar sua susceptibilidade ou resistência ao linezolida, poderia se apresentar como sensível se houvesse maior tempo de exposição ao fármaco investigado e/ou um aumento da dosagem do mesmo. Isolados VREfm são a espécie mais frequente em surtos hospitalares se comparados a *E. faecalis*, segundo a OMS (2018). E isto se deve a habilidade que esta espécie possui em adquirir genes de resistência e virulência, conforme pode ser visto nos trabalhos de Cattoir et al, (2014) e Ramos et al. (2023).

No presente estudo, todos os 15 isolados correspondem a VREfm oriundos de diferentes sítios de coleta, confirmando que essa espécie infecta diversos órgãos e tecidos, fator este preocupante principalmente quando considerados os pacientes imunocomprometidos, já que os VRE podem estar presentes em diversos órgãos, inclusive na microbiota intestinal dos pacientes hospitalizados podendo ser mecanismos de infecção e transmissão hospitalar como alerta a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2019).

Liu et al (2022) analisaram isolados hospital e encontraram VREfm infectando diversos órgãos e tecidos com o aumento da prevalência de VRE no hospital estudado. A pesquisa relata o crescente surgimento de VRE nesse país e principalmente dos isolados VREfm em ambientes hospitalares, chamando a atenção para o surgimento de surtos onde não havia a disseminação dos VREfm como responsáveis por infecções graves, comprovando seu caráter global.

No presente estudo, as análises moleculares da PCR positivaram apenas (n=10) para o gene *VanA*, sendo todos os isolados negativos para os demais genes relacionados a vancomicina (*VanB* e *VanN*) e a linezolida (*cfr*, *optrA, poxtA*), (Tabela 2). Em um

estudo realizado por Kamus et al (2022), os autores encontraram 16 isolados de *E. faecium* -2019. Todos os isolados resistentes a vancomicina portadores do gene *van*A e nenhum deles apresentava outro gene de resistência a esta droga. Em outro estudo, Maleki et al (2021), os autores identificaram que *E. faecium*, 10 apresentaram resistência à vancomicina e todos possuíam o gene *vanA*, mas nenhum o gene *vanB*, similarmente ao encontrado no presente estudo.

A resistência adquirida à vancomicina em *Enterococcus* é codificada por variantes do operon *van*. Dentre as diversas variações, o *van*A é o mais comum e é transportado geralmente no transposon Tn1546. Este transposon é muito frequente em plasmídeos, fato que facilita sua disseminação, principalmente nas amostras clínicas de *E. faecalis* e *E. faecium* (COURVALIN et al., 2006). Apesar do gene *van*A, ser o principal responsável pela resistência a vancomicina, ele não é exclusivo. Trabalhos como o de Terada et al (2019), identificou um isolado clínico de *E. faecium* resistente a vancomicina que negativou para os genes *van*A e *van*B e positivou para o gene *van*D5. Neste caso, os autores atribuíram esta resistência a presença deste último gene. Curiosamente, no presente trabalho, cinco isolados negativaram para todos os genes de vancomicina (*vanA, vanB e vanN*) testados, e ainda assim apresentaram-se resistentes fenotípicamente. Estes dados demonstram que fatores adicionais, possivelmente ainda não esclarecidos, são determinantes para resistência de *E. faecium* à vancomicina.

Por outro lado, quando avaliado o perfil de resistência fenotípico à linezolida, apenas dois isolados apresentaram valores de CMI maiores que o determinado pelo BrCAST (2023) sendo, portanto, considerados resistentes. A maioria apresentou valores menores, sendo, portanto sensíveis. A fim de confirmar os dados fenotípicos, foi realizada a análise molecular para verificar a existência, ou não, de genes de resistência a este fármaco. Todos os isolados negativaram para os três genes testados, inclusive àqueles considerados resistentes fenotipicamente. Estes resultados são interessantes e comprovam o uso da linezolida como uma alternativa terapêutica viável para as infecções enterocócicas, embora, já existam relatos da circulação de isolados de *E. faecium* resistentes a este fármaco, como pode ser visto no trabalho de Kamus et al (2022).

A resistência deste patógeno ao linezolida corresponde a uma resistência adquirida que surgiu devido à exposição excessiva de VREfm a esta droga, e a um consequente aumento do uso deste fármaco. O linezolida atua basicamente ligando-se

ao domínio V do 23S *rRNA* da subunidade ribossomal 50S, inibindo a síntese protéica. A resistência a esse fármaco em enterococos se deve a mutações G2576T ou G2505A, onde ocorre a ligação do *rRNA* 23S ou mutações em genes codificantes de proteínas ribossômicas L3 e L4 (EGAN et al, 2020).

Os resultados da CMI para os diferentes fármacos testados encontram-se na tabela 2, interpretados de acordo com o BrCAST (2023). Os isolados foram submetidos a diferentes concentrações de vancomicina que variaram de 32 μg/mL a 1024 μg/mL. O isolado 02089 apresentou a menor CMI, de 32 μg/mL e oito isolados (12455, 18008, 15353, 10964, 12805, 16184, 16206 e 00931) apresentaram a maior concentração (1024 μg/mL). Apesar dessas diferenças, os valores revelam que todos os isolados testados são resistentes à vancomicina, uma vez que o BrCAST estabelece valores de resistência dos *E. faecium* à vancomicina >4 μg/mL ou >4 mg/L, confirmando o antibiograma previamente estabelecido por Ramos et al (2023). Essa resistência a vancomicina é adquirida e é devida à produção de precursores do peptidoglicano na parede celular bacteriana que limitam a ligação da vancomicina e resulta em baixa afinidade em relação a esse fármaco, resultando na incapacidade da vancomicina de bloquear, de forma efetiva, a síntese da parede celular bacteriana (MILLER et al, 2020). Embora existam casos de *Enterococcus* Sensíveis ao Vancomicina (VSE), são os VRE a maioria dos responsáveis pelas infecções hospitalares graves (CATTOIR e GIARD, 2014).

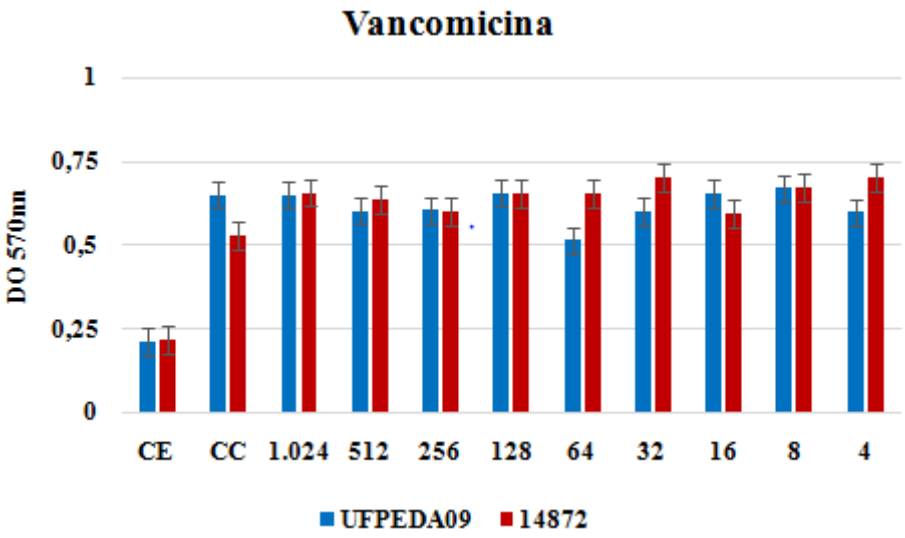
Quando analisados para linezolida as concentrações variaram de 0,25μg/mL a 128μg/mL. Para este fármaco não foi observado tanta variação nas concentrações quando comparado ao encontrado para vancomicina. Os isolados 02089, 16598, 18300 e 00931 foram os que apresentaram a menor CMI, diferentemente dos demais. Os dados revelam que a maiorida dos isolados testados são sensíveis ao linezolida, pois o BrCAST determina que os *E. faecium* são sensíveis a esse antimicrobiano quando apresentarem a CMI ≤ 4 μg/mL ou ≤ 4 mg/L. Os dados moleculares confirmam os resultados fenotípicos, pois todos os isolados foram negativos para os três genes (*cfr*, *optr*A, *poxt*A) testados. Dados similares foram encontrados no trabalho de Descourouez et al (2013), onde 32 isolados de VRE coletados de pacientes com rins transplantados e portadores de infecções urinárias foram sensíveis à linezolida.

Linezolida é uma opção terapêutica utilizada na clínica médica para infecções causadas por VRE, pois esta droga possui atividade bacteriostática *in vitro* comprovada

para estas bactérias (DESCOUROUEZ et al, 2013), apesar de ser comprovada atividade bactericida. Outra opção terapêutica para tratar infecções causadas por VRE pode ser o daptomicina, licenciado para uso apenas em caso de endocardites enterocócicas, o qual apresenta atividade em altas dosagens e necessita de estudos mais rigorosos, utilizado off – label, ou seja, "fora do rótulo", quando outras opções não apresentam ação sobre os VRE (TURNIDGE et al, 2020). A daptomicina é indicada e aprovada prioritariamente para o tratamento de infecções por *Staphylococcus aureus*, mas vem sendo utilizada, cada vez mais, como alternativa terapêutica para estes VRE, justamente por falta de opções, resultando numa exposição inadequada em alguns casos. O EUCAST considera que doses elevadas de daptomicina são necessárias para eficácia no tratamento de infecções enterocócicas da corrente sanguínea e endocardite, apesar da limitada experiência clínica com este fármaco. Sendo assim, não propõe ponto de corte clínico para daptomicina e denomina que as Evidências são Insuficientes (EI), porque o regime de dosagem utilizado para corrente sanguínea ultrapassa demasiadamente o valor licenciado pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA), conforme apresentado no trabalho de TURNIDGE et al., (2020). Por essas razões, o presente estudo se limitou a investigar apenas a ação da vancomicina e linezolida no biofilme dos 15 isolados de *E. faecium*.

Adicionalmente, o presente trabalho avaliou o efeito destes fármacos na anti-formação e erradicação do biofilme formado. No experimento para avaliar a anti-formação com a vancomicina foi utilizado o isolado que apresentou o potencial para formação do biofilme, ou seja, o 14872. Os resultados demonstraram que concentrações inferiores e superiores a CMI (512μ/mL) não foram suficientes para inibir completamente a formação do biofilme neste patógeno, indicando que para inibir a formação de biofilmes nestes enterococos resistentes seriam necessárias quantidade exorbitantes deste fármaco para desestabilizar o biofilme ou impedir sua formação. Quando avaliada a ação deste fármaco no isolado controle (UFPEDA 09), o resultado foi similar, demonstrando que este antibiótico é incapaz de agir impedindo a formação de biofilme tanto em isolados resistentes quanto sensíveis de *Enterococcus* (figura 2a).

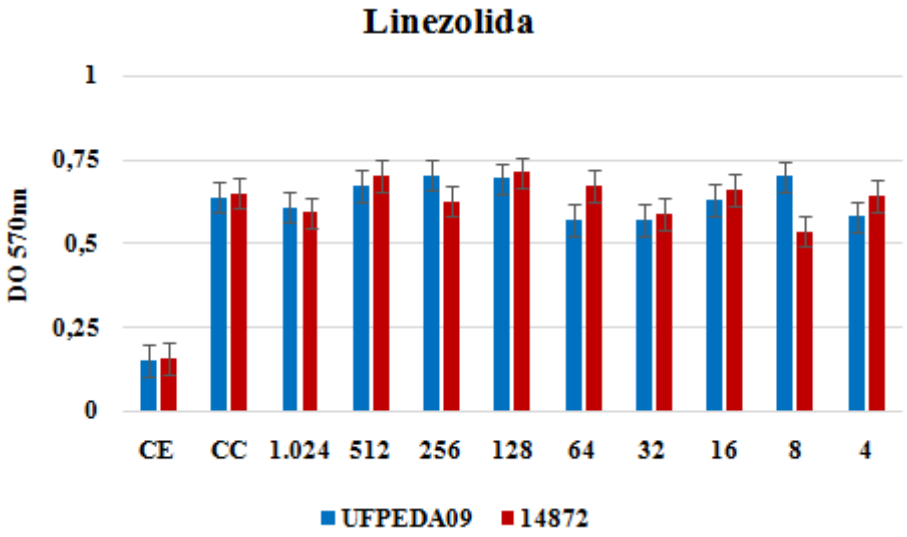
Figura 2a: Anti-formação de biofilme com vancomicina



Fonte: A autora (2023).

Para avaliar a anti-formação com a linezolida foi utilizado o isolado clínico 14872. Os resultados demonstraram que concentrações inferiores e superiores a CMI (4 μ/mL) não foram suficientes para inibir completamente a formação do biofilme neste patógeno, indicando que para inibir a formação de biofilmes nestes enterococos seriam necessárias quantidade exorbitantes deste fármaco para desestabilizar o biofilme ou impedir sua formação. Quando avaliada a ação deste fármaco no isolado controle (UFPEDA 09), o resultado foi similar, demonstrando que este antibiótico é incapaz de agir impedindo a formação de biofilme nos isolados sensíveis de *Enterococcus* (figura 2b).

Figura 2b: Anti-formação de biofilme com linezolida

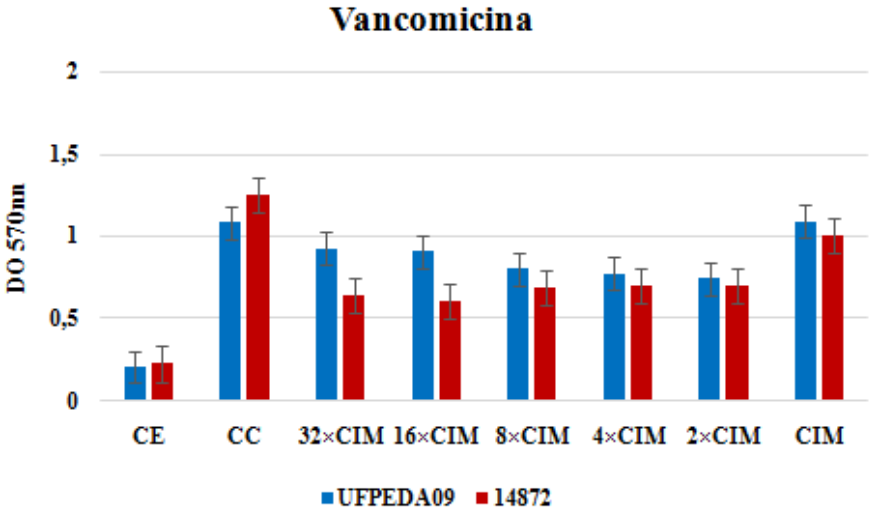


.

Fonte: A autora (2023).

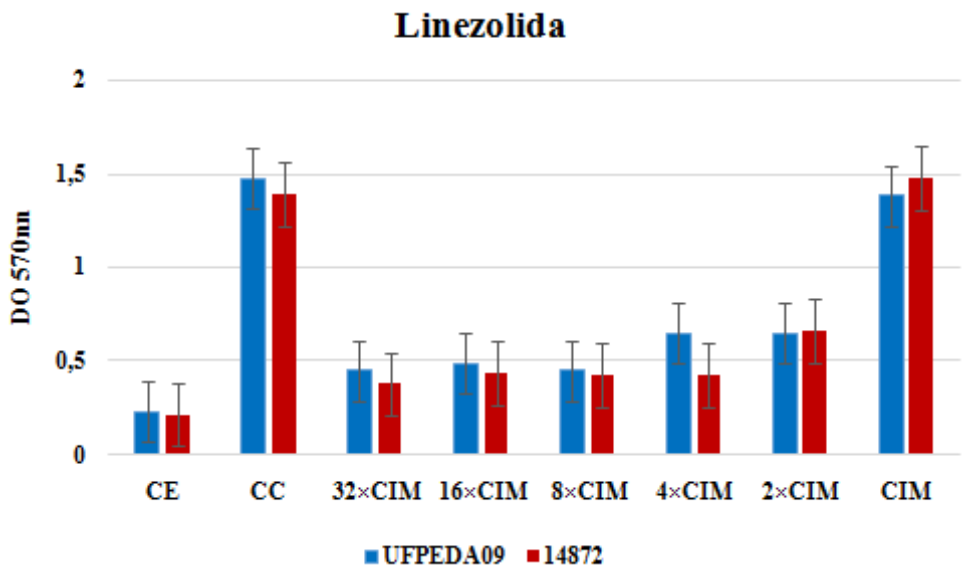
Adicionalmente, foi avaliada a ação destes fármacos na erradicação do biofilme formado (figura2c e 2d). Tanto o isolado clínico quanto o controle mostraram-se formadores de biofilme, nos controles de crescimento e nos valores de CMI para cada antibiótico. A CMI encontrada para vancomicina foi de 512 µg/mL e para linezolida foi de 4 µg/mL (14872), enquanto a cepa UFPEDA 09 era sensível aos dois antibióticos testados.

Figura 2c: Erradicação de biofilme com vancomicina.



Fonte: A autora (2023).

Figura 2d: Erradicação de biofilme com linezolida



Fonte: A autora (2023).

Para erradicar o biofilme formado utilizando o vancomicina, observou-se uma diferença pequena na erradicação do biofilme com este antibiótico. Provando que o fármaco não possui ação eficaz sobre os isolados de *E. faecium* dispostos em biofilmes. Adicionalmente, para erradicar o biofilme utilizando o linezolida foi observado que a partir da concentração de 2x CMI já houve uma erradicação maior do biofilme em relação ao vancomicina. Os valores de CMI para cada antibiótico são muito discrepantes, sendo o de vancomicina muito superior ao de linezolida. E apesar disso, percebe-se pelos resultados que linezolida é mais eficaz na erradicação dessa espécie em estado de biofilme.

Estes resultados demonstram que concentrações muito altas de vancomicina são necessárias para interferir nas bactérias em estado de biofilme, sendo impraticável seu uso clínico. Ao passo que concentrações menores de linezolida conseguem o mesmo resultado sendo, portanto, satisfatórias. Isso constata que a formação de biofilme é uma estratégia eficiente de sobrevivência de *E. faecium* que facilita a sua persistência no ambiente, independentemente do seu perfil de resistência.

A capacidade de formar biofilme é uma característica que promove proteção à bactéria e contribui para o desenvolvimento da doença, conferindo capacidade de persistir no ambiente hospitalar em diversas infecções diferentes (CH'NG et al, 2018). De acordo com o estudo de Ramos et al. (2023), isolados clínicos de *E. faecium* e E. *faecalis*, apresentaram capacidades distintas para formação de biofilmes (moderada a forte) e, apesar dos isolados de *E. faecium*f ormarem menos biofilme quando comparado aos de *E. faecalis* ainda assim corresponde a um importante e persistente patógeno no ambiente hospitalar.

Um estudo realizado por Fattah et al (2022) utilizou Nanopartículas de Prata (AgNPs) como alternativa para a antiformação de biofilmes de *E. faecalis* e foi observado que as AgNPs foram capazes de reduzir a formação de biofilme em 96%. Os resultados mostraram que mesmo em concentrações mais baixas de AgNPs foi possível inibir este biofilme. Outro estudo utilizando os antimicrobiano cefazolina e meropenem Silva et al (2020) conseguiram erradicar biofilmes formados de *Proteus mirabilis* similarmente aos nossos estudos. Os dados aqui apresentados enfatizam que o biofilme é uma estratégia de sobrevivência das bactérias e que são necessárias pesquisas adicionais para melhor compreender este mecanismo.

Conclusão

Os resultados aqui apresentados destacam a importância dos VREfm como agentes causadores de infecções hospitalares e o desafio no enfrentamento do controle destas infecções. Esses achados têm implicações clínicas importantes, fornecendo informações relevantes para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes contra infecções por VREfm e seus biofilmes associados.

REFERÊNCIAS

AHMAD, Iqbal et al. Environmental antimicrobial resistance and its drivers: a potential threat to public health. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 27, p. 101-111, 2021.

CAMARGO, Carlos Henrique et al. Prevalence and phenotypic characterization of Enterococcus spp. isolated from food in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 111-115, 2014.

CATTOIR, Vincent; GIARD, Jean-Christophe. Antibiotic resistance in Enterococcus faecium clinical isolates. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 12, n. 2, p. 239-248, 2014.

CH'NG, Jun-Hong et al. Biofilm-associated infection by enterococci. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 82-94, 2019.

Centers for Disease Control and Prevention (CDCP) (2013) Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013. Atlanta.

DAVIDO, B. et al. Fecal microbiota transplantation to eradicate vancomycin-resistant enterococci colonization in case of an outbreak. **Medecine Et Maladies Infectieuses**, v. 49, n. 3, p. 214-218, 2019.

DE AZEVEDO RAMOS, Bárbara et al. Virulence Factors and Biofilm Formation in Vancomycin Resistant Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium Isolates in Brazil. **Advances in Microbiology**, v. 13, n. 6, p. 299-314, 2023

DE INFECÇÃO, Controle. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde.

DESCOUROUEZ, Jillian L. et al. Fosfomycin synergy in vitro with amoxicillin, daptomycin, and linezolid against vancomycin-resistant Enterococcus faecium from renal transplant patients with infected urinary stents. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 3, p. 1518-1520, 2013.

DOS SANTOS, Márcia Alves; DE PAIVA, Isabel Cristina; DA SILVA ANDRADE, Erci Gaspar. Enterococcus Resistente à Vancomicina (VRE): perfil geral. **Revista JRG de Estudos Acadêmicos**, v. 4, n. 8, p. 127-139, 2021.

FATTAH, Bikhal; ARIF, Huner; HAMZAH, Haider. Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Biosynthesized Silver Nanoparticles Against Beta-lactamase-Resistant Enterococcus faecalis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 194, n. 5, p. 2036-2046, 2022.

GEORGES, Martin et al. Determination of enterococcus faecalis and enterococcus faecium antimicrobial resistance and virulence factors and their association with clinical and demographic factors in Kenya. **Journal of Pathogens**, v. 2022, 2022.

GORRIE, Claire et al. Genomics of vancomycin-resistant Enterococcus faecium. **Microbial genomics**, v. 5, n. 7, 2019.

HUANG, Szu-Ting et al. Risk factors for mortality after linezolid treatment of vancomycin-resistant Enterococcus bloodstream infection. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 129, p. 96-102, 2023.

https://brcast.org.br/wp-content/uploads/2022/09/Tabela-pontos-de-corte-BrCAST-15-03-2023.pdf

GRANDE, Rossella; PUCA, Valentina; MURARO, Raffaella. Antibiotic resistance and bacterial biofilm. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 30, n. 12, p. 897-900, 2020.

HEMMATI, Fatemeh et al. Novel strategies to combat bacterial biofilms. **Molecular biotechnology**, v. 63, n. 7, p. 569-586, 2021.

KAMUS, Laure et al. Investigation of a vanA linezolid-and vancomycin-resistant enterococcus faecium outbreak in the southwest Indian ocean (Reunion island). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 60, n. 5-6, p. 106686, 2022.

MALEKI, Dadras et al. Vancomycin-resistant Enterococcus species: Antimicrobial resistance and virulence genes profile. **Gene Reports**, v. 25, p. 101338, 2021.

O'TOOLE, Ronan F. et al. Vancomycin-resistant Enterococcus faecium and the emergence of new sequence types associated with hospital infection. **Research in Microbiology**, v. 174, n. 4, p. 104046, 2023.

OVIAÑO, Marina; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, Belén. MALDI-TOF mass spectrometry in the 21st century clinical microbiology laboratory. **Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica (English ed.)**, v. 39, n. 4, p. 192-200, 2021.

QADRI, S. M.; FLOURNOY, D. J.; QADRI, S. G. Sodium chloride-esculin hydrolysis test for rapid identification of enterococci. **Journal of clinical microbiology**, v. 25, n. 6, p. 1107-1108, 1987.

SHI, Changcheng et al. Efficacy and safety of daptomycin versus linezolid treatment in patients with vancomycin-resistant enterococcal bacteraemia: an updated systematic review and meta-analysis. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 21, p. 235-245, 2020.

SHRIVASTAVA, Saurabh RamBihariLal; SHRIVASTAVA, Prateek Saurabh; RAMASAMY, Jegadeesh. World health organization releases global priority list of

antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. **Journal of Medical Society**, v. 32, n. 1, p. 76-77, 2018.

SILVA, Sivoneide et al. Effects of Cefazolin and Meropenem in Eradication Biofilms of Clinical and Environmental Isolates of Proteus mirabilis. **Current Microbiology**, v. 77, p. 1681-1688, 2020.

SOLTANI, Saber et al. Prevalence of virulence genes and their association with biofilm formation in VRE faecium isolates from Ahvaz, Iran. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 12, n. 11, p. 970-977, 2018.

STEPANOVIĆ, Srdjan et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Apmis**, v. 115, n. 8, p. 891-899, 2007.

STOGIOS, Peter J; SAVCHENKO, Alexei. Molecular mechanisms of vancomycin resistance. **Protein Science**, v. 29, n. 3, p. 654-669, 2020.

TALEBI BEZMIN ABADI, Amin et al. World Health Organization report: current crisis of antibiotic resistance. **BioNanoScience**, v. 9, p. 778-788, 2019.

TASKEEN, Shumaila et al. ESKAPE pathogens and their potential in antimicrobial resistance: A Review. 2022.

TERADA, Satoko et al. First isolation and characterization of vancomycin-resistant Enterococcus faecium harboring vanD5 gene cluster recovered from a 79-year-old female inpatient in Japan. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 95, n. 4, p. 114883, 2019.

TURNIDGE, J. et al. Daptomycin in the treatment of enterococcal bloodstream infections and endocarditis: a EUCAST position paper. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 26, n. 8, p. 1039-1043, 2020.

WEBER, Sarah et al. Bloodstream infections with vancomycin-resistant enterococci are associated with a decreased survival in patients with hematological diseases. **Annals of Hematology**, v. 98, p. 763-773, 2019.

ZERROUKI, Hanane et al. High frequency and diversity of Vancomycin-resistant Enterococci (VRE) in Algerian healthcare settings. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 92, p. 104889, 2021.

6 CONCLUSÃO GERAL

Os resultados demonstram que os quinze isolados pesquisados são resistentes à vancomicina, mas apenas dez possuem gene de resistência correspondente a este fármaco, o *van*A. Nenhum isolado apresentou gene de resistência à linezolida e apenas dois se mostraram resistentes fenotípicamente. Os resultados mostraram que vancomicina e linezolida não são eficientes para inibir a formação de biofilme de *E. faecium*. Na erradicação do biofilme com vancomicina, os resultados mostraram que a partir de 2x (CMI) houve uma erradicação do biofilme formado, embora o resultado do efeito do linezolida na erradicação do biofilme a partir de 2x (CMI) foi melhor. Sendo assim, o linezolida é uma alternativa terapêutica para E. faecium.