

Perfil de virulência e resistência à antibióticos de amostras de Enterococcus SP. isolados de amostras clínicas e ambientais da comunidade do Lago do Limão no município de Iranduba- AM

Virulence and antibiotic resistance profile of Enterococcus SP. samples isolated from clinical and environmental samples from the Lemon Lake community in the municipality of Iranduba- AM

DOI:10.34117/bjdv7n5-596

Recebimento dos originais: 07/04/2021

Aceitação para publicação: 26/05/2021

Vitória Graziela Lopes Dutra

Biomédica, Universidade Paulista, Manaus – Amazonas

E-mail: vigraziela5@gmail.com

Maria Júlia Pessoa Brandão

Bióloga, Estácio Amazonas, Manaus – Amazonas

E-mail: maju.biol@gmail.com

Lirna Salvioni Silva de Souza

Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus - Amazonas

E-mail: lirasalvioni.s@gmail.com

Luciete Almeida Silva

Doutorado, Fundação Oswaldo Cruz , Rio de Janeiro – Rio de Janeiro

E-mail: luciete.silva@fiocruz.br

RESUMO

Os enterococos causam diversas infecções nosocomiais, infecções pós-operatórias e do trato urinário. Apesar de fazerem parte da flora normal dos seres humanos e de animais, tem surgido cepas com múltiplos fatores de virulência, adquiridas muitas vezes pela alta eficiência no mecanismo de transferência horizontal de genes. Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi detectar esses genes de virulência e de resistência nas amostras de *Enterococcus* spp. isoladas de amostras de água e de fezes diarreicas da comunidade Lago do Limão/AM. O perfil de virulência e de resistência a antimicrobianos foi realizado utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR), identificando a presença ou ausência desses genes pelo gel de eletroforese. Foram encontradas cepas com fatores de virulência tanto na água quanto nas fezes diarreicas dos pacientes, estando esses fatores de virulência presentes nas diferentes espécies estudadas.

Palavras-chave: antibiograma, diversidade genética, atividade gelatinolítica.

ABSTRACT

Enterococci cause various nosocomial infections, post-operative and urinary tract infections. Despite being part of the normal flora of humans and animals, strains with multiple virulence factors have emerged, acquired many times due to their high efficiency in the horizontal gene transfer mechanism. In this sense, the objective of this study was

to detect these virulence and resistance genes in the samples of *Enterococcus* spp. isolated from water samples and diarrheal faeces from the Lago do Limão / AM community. The virulence and antimicrobial resistance profile was performed using the polymerase chain reaction (PCR), identifying the presence or absence of these genes by the electrophoresis gel. Strains with virulence factors were found both in the water and in the patients' diarrheal feces, these virulence factors being present in the different species studied.

Keywords: antibiogram, genetic diversity, gelatinolytic activity.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Enterococcus* spp. corresponde a um grupo de microrganismo gram positivos e anaeróbios facultativos. Possuem capacidade de crescimento e sobrevivência em condições adversas, sendo encontrados em solos, plantas, água e animais (GASPAR, 2012)

Os enterococos estão emergindo rapidamente como um dos principais patógenos nosocomiais e na comunidade em geral (Vankerckhoven et al., 2004). Normalmente colonizante do trato intestinal, os enterococos podem ser encontrados ainda, embora com menos frequência, na cavidade oral. E também na água, onde já foram isolados em água de poço, em que as cepas continham genes resistentes à vancomicina, eritromicina e tetraciclina e também genes de virulência responsáveis pela formação de biofilme e produção de toxinas (ROBERTO et al., 2015)

Gaspar (2012) destaca que esse gênero possui características que permite se adaptar ao ambiente, permitindo uma vantagem de sobrevivência, incluindo diversos genes que podem ser facilmente transferidos devido à alta transferência genômica dos enterococos. Os genes que possuem um papel na virulência das diferentes fases da infecção incluem a adesão, colonização, invasão, evasão ao sistema imunológico e disseminação através dos tecidos dos hospedeiros.

Segundo Murray (2004), a infecção originada por *Enterococos* pode acontecer pela microbiota normal do paciente, e também pode ter sido transferido entre pacientes ou pelo consumo de água e alimentos contaminados por esse microrganismo.

Diante do exposto, esse estudo se propôs a estudar os fatores de virulência que podem estar presentes nas cepas de *Enterococcus* encontradas nas amostras da comunidade rural do Lago do Limão, localizado no município de Iranduba, Amazonas, uma vez que essas bactérias podem servir na propagação de genes de virulência para outras bactérias presentes no mesmo meio.

2 DESENVOLVIMENTO

Foram utilizadas todas as cepas de *Enterococcus* sp. depositadas no acervo da Coleção de Bactérias da Amazônia – CBAM do Instituto Leônidas e Maria Deane, isoladas de amostras clínicas e da água de consumo, provenientes do projeto interdisciplinar do PROEP, que analisou o ecossistema da Comunidade Lago do Limão, do município de Iranduba/AM. Sendo no total 17 cepas isoladas (Tabela 1), onde 9 são *Enterococcus faecium*, 5 *Enterococcus faecalis*; 2 *Enterococcus durans* e 2 *Enterococcus gallinarum*.

2.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O trabalho intitulado “Aspectos socioambientais, epidemiológicos e avaliação microbiológica de amostras clínicas e ambientais na comunidade rural do limão, município de Iranduba/AM”, do qual este trabalho é parte integrante, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), com Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) de no 41067414.6.0000.5020 e parecer consubstanciado no 1016748

3 TESTE DE ATIVIDADE GELATINOLÍTICA

As cepas foram inoculadas em caldo BHI suplementado com 4% de gelatina como substrato. Os tubos foram incubados a 37°C por pelo menos 48 horas. Em seguida, os tubos foram colocados na posição vertical no gelo por pelo menos 30 minutos, a fim de reduzir a temperatura abaixo de 28° C (ponto de gelatina). A reação positiva apresenta o meio líquido após os 30 minutos, o resultado negativo apresenta o gel sólido. Se apresentar resultado negativo, reincubar por mais 7 dias (Gama et al., 2008).

Tabela 1. Identificação das cepas

ID	Amostras	
	Espécie	Fonte
147	<i>E. faecium</i>	diarréia
248	<i>E. faecium</i>	diarréia
450	<i>E. faecium</i>	diarréia
545	<i>E. faecium</i>	diarréia
969	<i>E. faecium</i>	diarréia
1085	<i>E. faecium</i>	diarréia
1302	<i>E. faecium</i>	diarréia
1407	<i>E. faecium</i>	diarréia
687	<i>E. faecalis</i>	diarréia
745	<i>E. faecalis</i>	diarréia
47	<i>E. faecalis</i>	água

52	<i>E. faecalis</i>	água
87	<i>E. faecalis</i>	água
885	<i>E. gallinarum</i>	diarréia
85	<i>E. gallinarum</i>	água
1294	<i>E. durans</i>	diarréia
94	<i>E. durans</i>	água

3.1 SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (ANTIBIOGRAMA)

O teste foi realizado pelo método de disco-difusão, descrito por Kirby e Bauer (1966). Trata-se de um teste que consiste em parear discos impregnados com antimicrobianos em concentrações fixas, sobre a placas de ágar Mueller Hinton, após a semeadura do inóculo bacteriano feito a 0,5 na escala de McFarland. O processo descrito acima foi realizado em placas incubadas a 37°C por 24h. Após esse período, foi realizada a medição dos halos e o resultado foi comparado a uma tabela padrão. O antibiótico utilizado foi Vancomicina.

3.2 EXTRAÇÃO DO DNA

Para extração do DNA genômico foi utilizado Qiamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Alemanha), onde cada cultura de *Enterococcus* pura foi incubada em tubos contendo 2 mL de caldo TSB por 12 horas aos 35°C. Após esse período, as culturas no caldo foram transferidas para um microtubo de 1,5 mL e assim centrifugadas por 5000g por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante e obtendo-se um precipitado. Esse processo de centrifugação e descarte do sobrenadante foi feito com todo o conteúdo do tubo (Chapaval et al., 2008).

No precipitado foi acrescentado 160 µL do tampão de lise enzimática (ATL) e homogeneizado em vórtex. Esse material foi incubado por 30 minutos a 37°C. Em seguida, foi adicionado à suspensão 25 µL de proteinase K e acrescentado 180 µL do tampão AL, e foi incubado por 30 minutos aos 56°C. Após o período de incubação, foi adicionado 200 µL de etanol, a fim de, precipitar o DNA, e foi agitado em vórtex. A seguir, a mistura foi transferida para QIAamp Mini spin column (capaz de reter o DNA) e centrifugado a 6.000g por 1 minuto. O líquido coletado foi descartado e 500 µl de solução de extração (buffer AW1) foi adicionado à coluna e centrifugado a 6.000g por 1 minuto. Após a centrifugação e descarte do líquido coletado, 500µl da solução de lavagem (buffer AW2) foi adicionado à coluna, a fim de remover interferentes que não se ligaram

à membrana, e esta foi submetida à centrifugação a 20000g por 3 min. A seguir, a coluna foi transferida para um tubo de 1,5 mL e adicionado 50 uL de tampão de eluição (buffer AE), que retirou o DNA contido na membrana de sílica. Os tubos foram incubados por 1 minuto e centrifugados a 8.000 rpm por 1 minuto.

3.3 ESTUDO DAS ESTRUTURAS GENÉTICAS

Os marcadores de resistência a antimicrobianos em *Enterococcus* sp. foi determinado pela técnica de PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para os genes VanA, VanB, que conferem resistência à vancomicina. Para detecção de virulência, foram utilizados nove genes: o gene gelE, que codifica o fator de virulência da gelatinase; o gene Ace, que codifica a produção de um proteína envolvida na aderência da bactéria nas células do hospedeiro; e os genes Agg que estão relacionados à ligação específica ao epitélio intestinal, células epiteliais renais, neutrófilos humanos e macrófagos; o gene Asa que codifica uma substância de agregação; o gene Esp que codifica a proteína de superfície de enterococos, feromônio sexual, Cpd; e os genes CylA, CylM e CylB também fazem parte do operão da citolilisina, o CylM e CylB com relevância do componente lisina (L) e o CylA é necessário para a expressão do componente ativador (A) (RICH *et al.*, 1999; Vankerkhoven *et al.*, 2004) (Tabela 2).

Tabela 2. Sequências dos *primers* utilizados na técnica de PCR

Gene locus	Primer forward (5'-3') ¹	Primer reverse (5' – 3') ¹
<i>Asa</i>	GCACGCTATTACGAACTATGA	TAAGAAAGAACATCACCACGA
<i>gelE</i>	TATGACAATGCTTTTTGGGAT	AGATGCACCCGAAATAATATA
<i>esp</i>	AGATTTTCATCTTTGATTCTTGG	AATTGATTCTTTAGCATCTGG
<i>cpd</i>	TGGTGGGTTATTTTTCAATTC	TACGGCTCTGGCTTACTA
<i>ace</i>	GGAATGACCGAGAACGATGGC	GCTTGATGTTGGCCTGCTTCCG
<i>vanA</i>	CATGAATAGAATAAAAAGTTGCAATA	CCCCTTTAACGCTAATACGATCAA
<i>vanB</i>	GTGACAAACCGGAGGCGAGGA	CCGCCATCCTCCTGCAAAAAA
<i>Agg</i>	AAG AAA AAG AAG TAG ACC AAC	AAA CGG CAA GAC AAG TAA ATA
<i>cylB</i>	ATT CCT ACC TAT GTT CTG TTA	AAT AAA CTC TTC TTT TCC AAC
<i>cylM</i>	CTG ATG GAA AGA AGA TAG TAT	TGA GTT GGT CTG ATT ACA TTT
<i>cylA</i>	TGG ATG ATA GTG ATA GGA AGT	TCT ACA GTA AAT CTT TCG TCA

A amplificação dos genes foi realizada em volume final de 25 µL contendo: 0,5 µM de cada *primer*, 0,2 mM de dNTPs, 1 X de tampão de PCR, 2,0 mM MgCl₂, 1,25 U Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 2 µl do DNA alvo (30ng/µL). A reação foi realizada

em um termociclador (Applied Biosystems ProFlex) seguindo os protocolos de Vankerckhoven et al.(2004), sob as condições de desnaturação a 95°C por 15 minutos; seguido por 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, anelamento por 1 minuto, extensão 72°C por 1 minuto; por fim 72°C por 10 minutos.

Tabela 3. Temperatura de anelamento da técnica de PCR dos genes trabalhados.

Genes	Temperaturas
VanA	55.5°C
VanB	58°C
Ace	58°C
Asa	51°C
Esp	51°C
Cpd	50°C
cylM	48.2°C
cylA	48.2°C
gelE	51°C
cylB	50.2°C
Agg	50.2°C

3.4 VISUALIZAÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS

Para a visualização dos fragmentos amplificados, 4 uL do produto da PCR adicionado de 1 µL de loading buffer foram separados por eletroforese a 100 volts, por 60 minutos a temperatura ambiente, em gel de agarose a 1,5% adicionado de 1,5µL de gel redTM (Biotium), em cuba de eletroforese horizontal, utilizando tampão TAE 1X. Os fragmentos de DNA foram visualizados sobre luz UV (254 nm).

4 RESULTADOS

4.1 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (ANTIBIOGRAMA)

As tabelas 4 e 5 apresentam os resultados da susceptibilidade aos antibióticos das amostras da água de consumo e fezes diarreicas, respectivamente.

Tabela 4: Susceptibilidade ao antibiótico das amostras provenientes da água para consumo.

Antibiótico	<i>E. faecalis</i> N = 3	<i>E. durans</i> N = 1	<i>E. gallinarum</i> N = 1
Vancomicina	0	0	0

Tabela 5: Susceptibilidade ao antibiótico das amostras provenientes de fezes diarreicas.

Antibiótico	<i>E. faecium</i> N = 8	<i>E. faecalis</i> N = 2	<i>E. durans</i> N = 1	<i>E. gallinarum</i> N = 1
Vancomicina	0	0	0	0

4.2 TESTE DA ATIVIDADE GELATINOLÍTICA.

Das 17 espécies submetidas à atividade gelatinolítica (fenotípica), 6 cepas (35,29%) apresentaram resultados positivos, 2 cepas de *E. faecium* coletadas de fezes diarreicas, 2 cepas de *E. gallinarum* coletadas de fezes diarreicas e água, 1 cepa de *E. durans* coletada da água e 1 cepa de *E. faecalis* coletada da água. 6 cepas (35,29%) não apresentaram atividade fenotípica mas apresentaram o genótipo gelE, 5 cepas de *E. faecium* de amostras coletadas de fezes diarreicas e 1 cepa de *E. faecalis* coletada da água, 5 cepas (29,41%) apresentaram resultados negativos para o genótipo e para a atividade fenotípica. 70,58% dos enterococcus apresentaram o gene gelE que codifica a gelatinase, uma extraendopeptidase de zinco celular que hidrolisa colágeno, gelatina, e os pequenos peptídeos e que tem sido mostrado para exacerbar endocardite num modelo animal (VANKERCKHOVEN *et al.*, 2004).

4.3 ANÁLISE DAS ESTRUTURAS GENÉTICAS

Das 17 amostras de *Enterococos* spp. estudadas, 8 (50%) apresentaram resultados positivos para o gene **cylB**, 4 (25%) de *E. faecium* coletadas de fezes diarreicas, 3 (18,75%) cepas de *E. faecalis* coletadas de água e de fezes diarreicas, 1 (6,25%) de *E. durans* coletada da água. Para o gene **cylM**, 4 (25%) cepas foram positivas, entre elas 2 (12,5%) cepas *E. faecium* coletadas de fezes diarreicas, 1 (6,25%) cepa de *E. faecalis* coletada da água, e 1 (6,25%) cepa de *E. durans* coletada da água.

10 (62,5%) cepas foram positivas para o gene **cylA**, 5 cepas (31,25%) de *E. faecium* das amostras de fezes diarreicas, 5 (31,25%) cepas de *E. faecalis* coletadas de fezes diarreicas e da água. Para os genes **vanA** e **vanB**, as 17 (100%) amostras apresentaram resultados negativos, confirmando o teste de susceptibilidade ao antibiótico Vancomicina. Apenas 1 (6,25%) cepa apresentou resultado positivo para o gene **Esp**, cepa da espécie *E. faecalis* coletada da água.

Para o gene **gelE**, 11 cepas (68,75%) foram positivas, 6 (37%) de *E. faecium* provenientes de fezes diarreicas, 2 (12,5%) de *E. faecalis* coletadas da água, 2 (12,5%) de *E. gallinarum* coletadas de fezes diarreicas, e 1 (6,25%) cepa de *E. durans*, coletada da água. Um total de 10 (62,50%) cepas foram positivas para o gene **Asa**, 8 (50%) da espécie *E. faecium*, coletadas de fezes diarreicas, 2 (12,5%) cepas de *E. faecalis*, coletadas da água.

Foram positivas para o gene **Cpd** 8 (50%) cepas, apenas da espécie *E. faecium* coletadas de fezes diarreicas. Para o gene **Ace** 5 (31,25%) cepas foram positivas, 3 (18,75%) de *E. faecium* de amostras de fezes diarreicas, e 2 (12,5%) de *E. faecalis*, coletadas da água. 9 (52,94%) cepas foram positivas para o gene **Agg**, 7 (41,17%) *E. faecium* e 2 (11,77%) *E. faecalis*.

5 DISCUSSÃO

Giazzi et al., (2020) relataram sensibilidade das 8 cepas de enterococcus a Vancomicina, porém as mesmas apresentaram resistência a outros antibióticos como a estreptomicina, visto que estas cepas são oriundas de queijos e não de amostras clínicas, um dos fatores que conferem resistência antimicrobiana é a presença de genes de resistência no cromossomo. (GUEIMONDE et al. 2013). As cepas do município do Lago do Limão também foram sensíveis a Vancomicina, e não apresentaram genes de resistência no teste molecular.

As características que tornam certas bactérias patogênicas são conhecidas como fatores de virulência. Esse termo refere-se às substâncias produzidas pelos microorganismos, que podem causar danos ao hospedeiro. Toxinas bacterianas, por exemplo, são referidas com fatores de virulência. O termo passou a significar, qualquer componente do microorganismo que seja exigido para provocar doença ou potencialize sua capacidade para isso. Características que determinam virulência em linhagens de enterococos são, entre outros: a adesão ao tecido do hospedeiro, invasão e desenvolvimento de abscesso, resposta inflamatória modulada e eliminação de produtos tóxicos. O arranjo desses fatores determinam o nível de virulência da cepa (JETT et al., 1994; JOHNSON et al., 1994; EATON & GASSON, 2001).

A resistência aos antimicrobianos são relatados como fatores de virulência mais comuns, estão inclusos no tratamento de doenças e, é de grande importância entender a habilidade que estes microorganismos possuem ao receber genes que garantem elevada resistência aos antimicrobianos (MUNDY et al., 2000). Há diversos fatores de virulência que também podem ser adquiridos por trocas genéticas dentre eles: substância de agregação (Agg), gelatinase (GeIE), proteína de superfície de enterococos (esp), citolisina e adesinas (LEAVIS et al., 2004; FURUMURA et al., 2006).

Todas as amostras estudadas apresentaram resultado negativo para vancomicina. O gene VanA é responsável por expressar resistência elevada à Vancomicina (MI 64

$\mu\text{g/mL}$) e teicoplanina (MI 16 $\mu\text{g/mL}$) comumente adquirido pelo transposon Tn1546 ou membros da família relacionados como Tn3 (ARTHUR et al., 1993). O vanB é responsável por induzir níveis variados de resistência à vancomicina (MIC 4-4000 $\mu\text{g/MI}$), no entanto não é capaz de induzir resistência a teicoplanina, localiza-se no cromossomo bacteriano, mas podendo ser carregado por plasmídeos (POOTOOLAL et al., 2002; FRANZ et al., 2003; REMONATTO et al., 2005).

A citolisina está presente em 60% dos enterococcus, é descrita principalmente na espécie *E. faecalis*, possui atividade hemolítica (MUNDY et al., 2000). Apesar de possuir atividade antimicrobiana contra os grupos de bactérias gram positivas (estafilococos e estreptococos) e apresentar atividade hemolítica contra hemácias de cavalo, coelho e humano, esta toxina não tem ação em hemácia de carneiro nem contra bactérias gGram negativas (SEMEDO et al., 2003). Oito genes formam um operon que codificam esse fator de virulência: *cylR1*, *cylR2*, *cylLL*, *cylLS*, *cylM*, *cylB*, *cCylA*, *cylI*. Este operon pode ser encontrado em plasmídeos autotransmissíveis e induzíveis por feromônio ou ainda integrados ao cromossomo (JETT et al., 1994; MUNDY et al., 2000). As linhagens de *E. faecalis* produtoras de hemolisinas possuem papel importante em modelos animais na primeira etapa dos processos infecciosos humanos, quando o processo ainda é assintomático, pois estes penetram nos tecidos intestinais humanos (VELASCO et al., 2000).

A citolisina desempenha funções patogênicas importantes, esta toxina tem capacidade de romper a membrana dos glóbulos vermelhos e diversas outras células humanas (VELASCO et al., 2000). Vários fatores de adesão executam papel importante na ligação do micorganismo à mucosas e a outros epitélios, facilitam a colonização e a formação de vegetações (KOCH et al., 2004). Portanto a substância de agregação (Asa) possui características capazes de medir a ligação específica ao epitélio intestinal, células epiteliais renais, neutrófilos humanos e macrófagos (SUSSMUTH et al., 2000)

A substância de agregação é uma proteína de superfície codificada por um plasmídeo de *E. faecalis* (em raros casos por *E. faecium*) e expressa em resposta a indução por feromônios, o soro humano também induz a produção da substância de agregação, sugerindo que células que possuem a capacidade de expressar esta substância podem formar agregações maiores do que células que não expressam (MUNDY et al., 2000) Expressa pelo gene *Ace*, a adesina de colágeno de *E. faecalis* está envolvida na adesão da bactéria às células do hospedeiro. Essa adesina media a ligação ao colágeno, fibronectina

e laminada matrix extracelular do hospedeiro e aparenta ter papel importante na patogênese da endocardite (KOCH et al., 2004; NALLAPAREDY et al., 2000).

A Esp é constituída por 1873 aminoácidos, sendo assim uma proteína de alto peso molecular, apresenta um domínio N- terminal sem significativa semelhança com outras proteínas nos bancos de dados. Ainda não é conhecida a função da região N-terminal, ma há possibilidade que esta região esteja relacionada na interação com tecido do hospedeiro, a mesma tem sido relatada em diversos enterococos isolados de processos infecciosos. Essa proteína foi estudada por (Waar et al., 2002), onde observaram que é um possível fator de virulência, pois a presença da mesma foi relacionada com o aumento do número de bactérias aderidas a materiais de drenagem biliar (TOLEDO ARANA et al., 2001; WAAR et al., 2002)

Codificada pelo gen *GeIE* a gelatinase é uma protease classificada como uma metaloendopeptidase extracelular. Possui resíduos de histidina, os quais servem de sítios de ligação para íon zinco. Seu pH varia entre 6 e 8 é uma enzima que possui a capacidade de hidrolisar colágeno, gelatina, hemoglobina caseína e outros pequenos peptídeos biologicamente ativos (KAYAOGLU & amp; ORSTAVIK, 2004)

Dentre as amostras estudadas, Aa cepa 248 (*E. faecium*) isolada de amostra clínica apresentou o maior perfil de virulência, no qual foram identificados 7 genes (*cylM*, *cylA*, *cylB*, *Agg*, *cpd*, *Asa*, *gelE*). Vankerckoven (2004), analisou 5 genes (*Asa1*, *gelE*, *CylA*, *Esp* e *H*.) em 271 cepas de *E. faecium* oriundas de amostras clínicas e fezes diarreicas. *Asa1*, *gelE*, *CylA* não foram identificados e 176 foram positivos para *Esp*.

6 CONCLUSÃO

As cepas estudadas apresentaram potencial de virulência, comparados a outros estudos em modelo animal. Foram encontradas cepas com fatores de virulência tanto na água para o consumo, quanto nas fezes diarreicas dos pacientes, salientando uma porcentagem superior em amostras de fezes diarreicas, principalmente na espécie *E. faecium*. Os fatores de virulência estão presentes nas diferentes espécies estudadas, mas com a mínima porcentagem em *E. gallinarum*, apontando possíveis conjugações entre as espécies, visto que o potencial de virulência das cepas são fatores determinantes para a análise do processo saúde-doença dos pacientes que habitam a região em estudo.

AGRADECIMENTOS

Esse estudo recebeu financiamento da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas/FAPEAM através do Programa de Excelência em Pesquisa Básica e Aplicada em Saúde (PROEP).

REFERÊNCIAS

Azevedo, Maria Ermelinda Filgueiras de Azevedo. – Botucatu 2013 **Identificação de Enterococcus spp. E avaliação da ocorrência de genes de resistência à vancomicina em amostras de pacientes de hospitais de Manaus, AM**

Bauer, A.W. et al. **Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method.** Am. J. Clin. Microbiol., 40: 2413-5, 1966.

CHAPAVAL, L.; MOON, D. H.; GOMES, J. E.; DUARTE, F. R.; TSAI, S. M. **An Alternative method for Staphylococcus aureus DNA isolation.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 60, n. 2, p. 299-306, 2008.

EATON TJ, Gasson MJ. **Molecular screening of Enterococcus virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates.** Appl Environ Microbiol 2001; 67: 1628-35.

FRANZ, C. M. A. P.; HOLZAPFEL, W. H. & STILES, M. E. **Enterococci at the crossroads of food safety?** International Journal of Food Microbiology, 47(1):1-24, 1999

FURUMURA, M.T.; CARBONELL, G. V.; LEMES- MARQUES, E. G.; DARINI, A. L. & YANO, T. **Virulence-associated characteristics of Enterococcus Faecalis strains isolated from clinical sources.** Brazilian Journal of Microbiology, 37(3): 230-236, 2006.

Gama, B. A. (2008). **Análise da resistência antimicrobiana e de genes de virulência de Enterococcus spp.** (pp. 1–73)

Gaspar, F. B. (2012). **Non-clinical isolates bring new findings on enterococcal virulence.** In PQDT - Global.

Giazzi, A., Tosoni, N. F., Moraes, M. L., Furlaneto-Maia, L., & Katsuda, M. S. (2020). **Propriedades tecnológicas das bactérias ácido lácticas isoladas na região norte do Paraná.** Brazilian Journal of Development, 6(4), 18861–18877. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n4-162>

GUEIMONDE, M.; BORJA SÁNCHEZ, C. G. R. ; MARGOLLES, A. **Antibiotic resistance in probiotic bacteria.** Front. Microbiol., v.18, p.1-6, 2013.

Jett, BD, MM Huycke, e MS Gilmore. 1994. **Virulencia of enterococci.** Clin. Microbiol. Ver. 7(4): 462-478, 1994

Johnson, AP. **A patogenicidade de enterococos.** J. Antimicrobial Chemotherapy 33(6):1083-1089, 1994.

Kayaoglu G, Ørstavik D, **Virulence factors of Enterococcus faecalis: relationship to endodontic disease.** Crit Rev Oral Biol Med 2004; 15: 308-20.

Koch S, hufnagel M, Theilacker C, Huebner J. **Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities.** *Vaccine* 2004; 22: 822-30.

Leavis H, Top J, Shankar N, et al. **A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the esp virulence gene of Enterococcus faecium and associated with epidemicity.** *J bacterial* 2004; 186: 672-82.

MUNDY, L. M.; SAHM, D.F. & GILMORE, M. **Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance.** *Clinical Microbiology Reviews*, 13(4): 513-522, 2000.

Murray, P.R. *Microbiologia Médica*. Ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2000
Rebouças, A. **Uso inteligente da água.** São Paulo: Escrituras Editora, 2004, 207p.

Nallapareddy SR, Singh KV, Duh RW, Weinstock GM, Murray BE. **Diversity of ace, a gene encoding a microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules, from different strains of Enterococcus faecalis and evidence for production of Ace during human infections.** *Infecter Immun* 2000; 68: 5210-7.

POOTOOLAL, J.; NEU, J. & WRIGHT, G. D. **Glycopeptide antibiotic resistance.** *Annual Review of pharmacology and Toxicology*, 42: 381- 408, 2002.

Remonato, G. Bolzan, V. Zanchi, A.C e D'azevedo, P.A **Detecção Molecular da Resistência Bacteriana – Ênfase para Enterococcus e Streptococcus.** *NewsLab*, edição 70, p. 100-112. 2005.

Roberto, Sharise Beatriz. **Virulência e resistência antimicrobiana de Enterococcus sp. Isolados de amostras de água. Dissertação** (Mestrado). Universidade Federal do Paraná. Programa de Pósgraduação em Engenharia Ambiental. Londrina, 2015.

RICH, R. L.; KREIKEMEYER, B.; Perfil de virulência e resistência à antibióticos de amostras de Enterococcus sp. isolados de amostras clínicas e ambientais da comunidade do Lago do Limão no município de Iranduba- Am OWENS, R. T.; LABRENZ, S.; NARAYANA, S. V. L.; WEINSTOCK, G. M.; MURRAY, B. E. & HOOK, M. **Ace is a collagen-binding MSCRAMM from Enterococcus Faecalis.** *Journal of Biological Chemistry*, 274(38): 26939-26945, 1999

Semedo, SM Almeida, P.Martins, MF Silva Lopes, JJ Figueiredo Marques, R.Tenreiro e MT Barreto crespo. **Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the cyl operon in enterococci,** *JClin. Microbiol* 2003; 41: 2569-2576.

SUSSMUTH, S. D.; MUSCHOOLL- SILBERHORN, A.; WIRTH, R.; SUSA, M.; MARRE, R. & ROZDINSKY, E. **Aggregation substance promotes adherence, phagocytosis, and intracellular survival of Enterococcus faecalis with human macrophages and suppresses respiratory burst.** *Infection and Immunity*, 68(9):4900-4906.200.

Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, et al. **The enterococcal surface protein, Esp, is involved in Enterococcus faecalis biofilm formation.** Appl Environ Microbiol 2001; 67: 4538-45.

Vankerckhoven V, Van Autegarden T, Vael C, et al. **Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*,** J Clin Microbiol 2004; 42:4473-9.

VELASCO, R. G.; ACOSTA, K. H.; CHÁVEZ, M. A.G. **Los factores de virulencia y la actual importancia clínica de *Enterococcus faecalis*.** Laboratorio Acta, v. 14, n° 1pg. 9-10, 2002.

Waar K, Muschool-Silberhorn aab, Willems RJL, Slooff MJH, Harmsen HJM, Degener JE. **Genogrouping and incidence of virulence factors of *Enterococcus faecalis* in liver transplant patients differ from blood culture and fecal isolates.** J Infect Dis 2002; 185: 1121-7.