

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E
BIOLOGIA MOLECULAR

Suelen Scarpa de Mello

**Estudo de vias alternativas aos sistemas LiaFSR e YycFGHIJ que levam à
diminuição da sensibilidade à daptomicina em *Enterococcus faecium***

Orientadora: Profa. Dra. Ilana Lopes Baratella da Cunha Camargo

São Carlos- SP

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E
BIOLOGIA MOLECULAR

Suelen Scarpa de Mello

**Estudo de vias alternativas aos sistemas LiaFSR e YycFGHIJ que levam à
diminuição da sensibilidade à daptomicina em *Enterococcus faecium***

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos para obtenção do título de Doutora em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Orientadora: Profa.Dra. Ilana Lopes Baratella da Cunha Camargo

São Carlos- SP

2018

Mello, Suelen Scarpa de

Estudo de vias alternativas aos sistemas LiaFSR e YycFGHIJ que levam à diminuição da sensibilidade à daptomicina em *Enterococcus faecium* / Suelen Scarpa de Mello. -- 2018.
59 f. : 30 cm.

Tese (doutorado)-Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Carlos

Orientador: Ilana Lopes Baratella da Cunha Camargo

Banca examinadora: Ilana Lopes Baratella da Cunha Camargo, Paulo Teixeira Lacava, Iran Malavazi, Ricardo De Marco, Ana Paula Ulian de Araujo

Bibliografia

1. *E. faecium*. 2. supersensibilidade à daptomicina. 3. mecanismo de resistência à daptomicina. I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Ronildo Santos Prado – CRB/8 7325



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

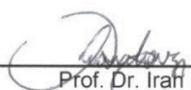
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Suelen Scarpa de Mello, realizada em 21/08/2018:



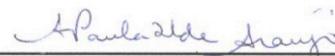
Profa. Dra. Ilanã Lópès Baratella da Cunha Camargo
USP



Prof. Dr. Irah Malavazi
UFSCar



Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava
UFSCar



Profa. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo
USP



Prof. Dr. Ricardo de Marco
USP

Aos meus pais, meu irmão, minha avó e ao meu noivo.

Por todo amor, paciência e confiança.

E por serem a razão da minha vida. Meu porto seguro!

Agradecimentos

À Profa. Dra. Ilana L. B. C. Camargo, não só pela dedicada orientação, mas acima de tudo, por ser uma grande incentivadora e por todas as horas prazerosas discutindo os dados. Sua confiança me deu forças para trilhar meu crescimento profissional, e sob sua valiosa tutela guiei meus passos! Seus valores e princípios serão lições levadas para toda vida;

Ao Prof. Dr. Michael S. Gilmore (Harvard Medical School) por me receber em seu laboratório, pelo apoio e orientação. Obrigada também por todos os conselhos sábios, oportunidades e por me permitir viver em Boston, cidade incrível, onde pude me sentir em casa.

Aos grandes amigos que fiz em Boston: Amanda Alves, Elaine Canelas, Lara Almeida, Paulo Bispo e Katharina Schaufler, que tornaram minha experiência mais valiosa e memorável.

Em especial à Dra. Daria Van Tyne que muito me ensinou e auxiliou nas análises de bioinformática e clonagens e por ter me recebido tão bem no Laboratório do Prof. Michael S. Gilmore.

Aos meus pais, Sidnei e Suselaine, pelo amor, pelo exemplo de dignidade e perseverança, pela confiança na minha capacidade, meus eternos agradecimentos.

Ao meu irmão Diego, pelo incentivo recebido ao longo destes anos, obrigada pelo amor, atenção sem reservas e seu exemplo de determinação que me motiva a lutar pelos meus sonhos.

À minha avó Maria Scarpa, pelo amor que me dedica e ao meu avô querido (Domingos Scarpa - in memoriam), que sempre torceu por mim e acreditou que tudo isso se tornaria possível.

Ao meu noivo, Wanderson, companheiro de todas as horas, pela sua compreensão, respeito, tolerância e principalmente por sempre me ajudar a ver o lado positivo das situações, mesmo nos momentos mais difíceis;

Às minhas amigas Andrei Nicoli Dabul e Nathalya Mesquita, pela amizade ao longo destes anos, pelos momentos e conhecimentos compartilhados.

Aos companheiros do Laboratório de Epidemiologia e Microbiologia Molecular (LEMiMo), pela amizade, paciência, convivência e momentos de descontração: Alexandre Oliveira, Gabriela Righetto, Luíza Zuzanov, Rosineide Souza, Janaína Valerini e Geovana Vieira;

Aos funcionários do IFSC: Rafael Panhota e Isabel de Moraes, pela ajuda, amizade e convivência.

Aos professores do PPGGev pelos ensinamentos e formação;

À secretária Ivanildes, pela amizade, atenção e dedicação;

À CAPES pela concessão da bolsa;

Agradeço à Deus, por iluminar meus caminhos e me dar forças para continuar;

Por fim, o meu mais sincero agradecimento aos meus amigos e familiares que, de alguma forma, contribuíram para finalizar esta etapa e torceram pelo sucesso da minha jornada.

*"Foi o tempo que dedicaste a tua rosa que fez tua rosa tão importante."
(Antoine de Saint-Exupéry)*

*"Para conquistar coisas importantes, devemos não apenas agir mas também sonhar, não apenas planejar mas também acreditar."
(Anatole France)*

RESUMO

Enterococcus spp. são um dos mais importantes patógenos nosocomiais multirresistentes. As infecções por enterococos resistentes à vancomicina (VRE, do inglês, *Vancomycin Resistant Enterococci*) estão cada vez mais difíceis de se tratar, geralmente com surtos hospitalares prolongados que são verdadeiros desafios. Daptomicina (DAP) é uma das últimas alternativas de tratamento para infecções causadas por VRE, principalmente *E. faecium* do complexo clonal 17, denominados “de alto risco”. Neste estudo, amostras de *E. faecium* do Hospital de Base de São José do Rio Preto foram analisadas por tipagem molecular e foi determinado o perfil de sensibilidade a diversos antimicrobianos. Um clone de alto risco resistente à vancomicina e com sensibilidade reduzida à daptomicina foi identificado se disseminando no hospital. O mecanismo de resistência à DAP ainda não está completamente elucidado. Com a finalidade de estudar o mecanismo de resistência à DAP nas amostras clínicas deste hospital e descobrir novas vias para esta resistência, a amostra *E. faecium* HBSJRP18 supersensível à DAP isolada neste hospital foi utilizada para realizar seleções *in vitro* até que se obtivesse linhagens mutantes resistentes. Posteriormente, os genes com mutação nestas amostras selecionadas, bem como aqueles já descritos na literatura, foram analisados nas amostras clínicas. Para isso, os genomas destes mutantes foram sequenciados e comparados com a supersensível HBSJRP18 para detectar a presença de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) em genes que podem estar relacionados à resistência a DAP. Os genes mutados/integros foram superexpressos na linhagem supersensível/resistente para que a CIM de DAP fosse determinada para investigar seus papéis na resistência a esse antibiótico. Os genes que apresentaram mutações nas três seleções em BHI foram *lafB-like*, uma glicosiltransferase possivelmente envolvida na biossíntese de LTA, e *dhaK*, uma dihidroxiacetona quinase possivelmente envolvida no metabolismo do glicerol. Clonagem e superexpressão dos genes de interesse foram realizadas, o que possibilitou a comprovação do papel do *lafB-like* na supersensibilidade à daptomicina. *dhaK* ainda permanece sem definição se realmente está envolvido com a resistência, pois a superexpressão do gene intacto na linhagem onde ele estava truncado não resultou em diminuição expressiva da CIM. Mutação nestes genes também foram encontradas em todas as amostras clínicas, bem como os genes *liaFSR* já descritos na literatura. Os resultados deste estudo têm uma importância particular, considerando que as infecções por *E. faecium* resistentes à vancomicina têm crescido assustadoramente nos dias atuais. O gene *lafB-like* pode ser um potencial alvo terapêutico e deve ser melhor estudado para tal.

Palavras-chave: *E. faecium*, supersensibilidade à daptomicina, mecanismo de resistência à daptomicina

ABSTRACT

Enterococcus is one of the most important multi-drug resistant nosocomial pathogens. Infections caused by vancomycin resistant Enterococci (VRE) are becoming increasingly difficult to treat, often with prolonged hospital outbreaks that are real challenges. Daptomycin (DAP) is a drug of last resort for treating infections caused by VRE; mainly *E. faecium* belonged to clonal complex 17, called "high risk" clone. In this study, samples of *E. faecium* from the Hospital de Base de São Jose do Rio Preto were analyzed by molecular typing and the susceptibility profile to several antimicrobials was determined. A high-risk vancomycin-resistant clone with reduced susceptibility to daptomycin has been identified spreading in the hospital. The mechanism of DAP resistance is not fully elucidated. For the purpose of studying the mechanism of resistance to DAP in the clinical isolates of this hospital and to identify new pathways to resistance, DAP hyper-susceptible *E. faecium* HBSJRP18 clinical isolate was used to perform *in vitro* selections until resistant mutants were obtained. Subsequently, genes with mutation in these selected isolates, as well as those already described in the literature, were analyzed in the clinical samples. Genomes of these mutants were sequenced and compared to the DAP hyper-susceptible *E. faecium* HBSJRP18 to detect the presence of single nucleotide polymorphism (SNP) in genes that may be related to resistance to DAP. The mutated/intact genes were overexpressed in the hyper-susceptible/resistant strain, thus DAP MIC was determined to investigate their roles in resistance to that antibiotic. The genes that showed mutations in the three BHI selections were *lafB*-like, a glycosyltransferase possibly involved in the LTA biosynthesis, and *dhaK*, a dihydroxyacetone kinase possibly involved in the metabolism of glycerol. Cloning and overexpression of the genes of interest were performed, which enabled the evidence of the role of *lafB*-like in hyper-susceptibility to DAP. *dhaK* still remains unclear if it is actually involved in resistance. Mutations in these genes were also found in all clinical samples, as well as the *liaFSR* genes already described in the literature. The findings of this study have a particular importance considering that vancomycin-resistant *E. faecium* infections have grown frighteningly in the present day. The *lafB*-like gene may be a potential therapeutic target and should be better studied for this.

Key words: *E. faecium*, hyper-susceptibility to daptomycin, mechanism of resistance to daptomycin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos propostos para a ação da daptomicina.	18
Figura 2. Evolução dirigida <i>in vitro</i> à daptomicina.	25
Figura 3. Dendrograma de similaridade genética de <i>E. faecium</i> isolados de infecções em pacientes hospitalizados durante o período estudado.....	34
Figura 4. Curva de crescimento comparando o crescimento da amostra supersensível em BHI com e sem a presença de ácido oleico.	36
Figura 5. Figura representativa dos géis demonstrando o perfil clonal obtido por macrorrestrição do DNA com SmaI seguido de PFGE das amostras da evolução dirigida em meio BHI.....	39
Figura 6. Figura representativa dos géis demonstrando o perfil clonal obtido por macrorrestrição do DNA com SmaI seguido de PFGE das amostras da evolução dirigida em meio BHI com ácido oleico a 20 µg/mL.	39
Figura 7. Enzimas requeridas para a síntese de glicolípídeos e LTA em diferentes bactérias Gram-positivas.	45
Figura 8. Via de biossíntese de fosfolipídios, glicolipídios e LTA em <i>B. subtilis</i>	46
Figura 9. Gráfico normalizado com a porcentagem de crescimento em piperacilina.	49
Figura 10. Crescimento das amostras HBSJRP18 e HBSJRP18-2.7 na concentração de 1000µg/mL de piperacilina.	50
Figura 11. Crescimento das amostras HBSJRP18 e HBSJRP18-2.7 na concentração de 2000 µg/mL de piperacilina.	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Pontos de corte de diversos antibióticos para <i>Enterococcus</i> spp.....	23
Tabela 2. Sequência de <i>primers</i> para a confirmação dos SNPs por sequenciamento pelo método de Sanger.	27
Tabela 3. Sequência de <i>primers</i> para a clonagem dos genes e utilizados para confirmar que o gene foi inserido no plasmídeo.	28
Tabela 4. CIM das amostras da evolução dirigida à daptomicina em meio BHI.	37
Tabela 5. CIM das amostras da evolução dirigida à daptomicina em meio BHI e ácido oleico.	38
Tabela 6. Análise dos genomas quanto à cobertura e número de <i>contigs</i>	40
Tabela 7. Resultado da comparação entre o genoma obtido da HBSJRP18 e os genomas dos seus respectivos derivados obtidos na evolução dirigida com meio BHI.....	42
Tabela 8. Comparação da CIM da daptomicina após superexpressão dos genes clonados em pAT28.....	44
Tabela 9. CIM realizada para comparar a sensibilidade da supersensível em relação aos seus mutantes.....	48
Tabela 10. CIM realizada para comparar a sensibilidade da supersensível em relação ao seu mutante que possui a reversão da mutação em <i>lafB</i> -like gene.	48
Tabela 11. Análise dos genomas quanto à cobertura e número de <i>contigs</i>	51
Tabela 12. Mutações não-sinônimas encontradas na evolução dirigida com ácido oleico.	52
Tabela 13. Polimorfismos encontrados em genes conhecidos por afetar a resistência à daptomicina em <i>E. faecium</i>	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	Infusão de Cérebro e Coração, do inglês, “ <i>Brain and Heart Infusion</i> ”
CaCl₂	Cloreto de cálcio
CIM₅₀	Concentração Inibitória Mínima para inibir 50% da população
CIM₉₀	Concentração Inibitória Mínima para inibir 90% da das isolados
DNA	Ácido desoxirribonucleico (deoxyribonucleic acid)
dNTP	desoxirribonucleotídeos trifosfatados (deoxynucleotide triphosphates)
DO₆₀₀	Densidade óptica a 600 nm
Kb	Kilobase
KCl	Cloreto de potássio
LB	Meio Luria-Bertani
Mg	Miligrama
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MgSO₄	Sulfato de magnésio
MHCA	Caldo Mueller-Hinton cátion-ajustado
mL	Mililitro
mV	Millivolts
NaCl	Cloreto de sódio
nm	Nanômetros
ORF	Fase aberta de leitura (open reading frame)
Pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
Rpm	Rotação por minute
ST	Tipo de Sequência, do inglês, “ <i>Sequence Type</i> ”
mg	Micrograma
μL	Microlitro
LTA	Ácido lipoteicóico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 <i>Enterococcus</i>	15
1.2 <i>Enterococcus faecium</i>	15
1.3 Resistência aos antimicrobianos.....	16
1.4 Daptomicina.....	17
2. OBJETIVOS.....	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1 Amostras.....	22
3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima	22
3.3 Tipagem molecular por macrorrestrição do DNA seguido de eletroforese em gel de agarose com campos pulsados (PFGE)	23
3.4 Extração do DNA dos isolados.....	23
3.5 Detecção dos genes <i>van</i>	24
3.6 Evolução dirigida de <i>E. faecium</i> à daptomicina em caldo BHI.....	24
3.7 Curva de crescimento	25
3.8 Evolução dirigida à daptomicina em caldo BHI com adição de ácido oleico.	26
3.9 Sequenciamento e análise do genoma	26
3.10 Determinação do ST das amostras clínicas	27
3.11 Clonagem e superexpressão.....	27
3.11.1 Amplificação dos genes a serem clonados no vetor de expressão pAT28	27
3.11.2 Ligação com T4 DNA ligase	28
3.11.3 Preparo de células competentes de <i>E. coli</i> DH5 α	28
3.11.4 Transformação em <i>E. coli</i> DH5 α	29
3.11.5 PCR de colônia	29
3.11.6 Extração de plasmídeo.....	29
3.11.7 Confirmação do inserto com fragmento de interesse	29
3.11.8 Preparo de células competentes de <i>E. faecium</i>	30
3.11.9 Eletroporação em <i>E. faecium</i>	30
3.12 Investigação de como a amostra com supersensibilidade à daptomicina foi selecionada no hospital.....	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1 Análises do PFGE, ST, prevalência de VRE e genes <i>van</i> genes nas amostras clínicas.....	31
4.2 Sensibilidade aos antimicrobianos.....	35
4.3 Análise do crescimento bacteriano	35

4.4 Sensibilidade à daptomicina das duas seleções de resistentes.....	36
4.5 Análise do perfil clonal das amostras provenientes das seleções de resistentes	38
4.6 Análise de genoma.....	40
4.7 Verificação do papel das mutações encontradas na resistência à daptomicina por superexpressão dos genes	43
4.8 Dose Resposta aos antibióticos.....	48
4.9 Análise de genoma das amostras selecionadas <i>in vitro</i> em BHI e ácido oleico	51
4.10 Análise de genoma das amostras clínicas.....	54
5. CONCLUSÕES	56
6. PERSPECTIVAS.....	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS CONSULTADAS	57

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Enterococcus*

As bactérias do gênero *Enterococcus* são cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos que formam cadeias de comprimentos variados; possuem habilidade de sobreviver em condições adversas, incluindo pH e alterações osmóticas, mudanças de temperatura, limitação de nutriente e dessecação (FISHER e PHILLIPS, 2009), características essas que favorecem sua persistência no ambiente, o que é importante para a transferência de linhagens resistentes entre os hospedeiros (SAITO et al., 2014).

Apesar de serem comensais no trato gastrointestinal de humanos e outros mamíferos, pássaros, insetos e répteis, surgiram como uma das principais causas de infecções hospitalares resistentes a múltiplos fármacos na década de 1970, por motivos ainda não totalmente compreendidos (LEBRETON et al., 2014).

Enterococcus é um dos mais importantes patógenos multirresistentes, e que afetam geralmente os pacientes debilitados por outras doenças e submetidos à hospitalização prolongada (ARIAS e MURRAY, 2012), causando infecções do trato urinário, bacteremia e endocardite (GOLD, 2001).

O aumento do uso de antibióticos de amplo espectro e do número de pacientes gravemente enfermos em parte contribuiu para o aumento da aquisição de infecções relacionadas a assistência à saúde (IRAS) causadas por *Enterococcus* spp.. O sucesso na disseminação no ambiente hospitalar é, pelo menos em parte, consequência da sua notável resistência intrínseca a vários antibióticos, mas também devido a uma aptidão poderosa e única em adquirirem e disseminarem determinantes de resistência aos antimicrobianos, sendo uma das principais razões para o rápido aumento da resistência, resultando em opções terapêuticas limitadas (GIRAFFA, 2002; SIMJEE et al., 2002).

1.2 *Enterococcus faecium*

Enterococcus faecium é uma das espécies bacterianas do grupo de patógenos chamado “ESKAPE”: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, e espécies de *Enterobacter* para as quais novas terapias são urgentemente necessárias (RICE, 2008; ARIAS e MURRAY, 2012). A denominação deste grupo enfatiza os patógenos que mais causam infecções hospitalares nos Estados Unidos e em vários países e “escapam” facilmente dos antibióticos existentes e aprovados para uso (BOUCHER et al., 2009).

E. faecium possui uma capacidade excepcional de sobreviver às condições adversas, devido em parte à plasticidade do seu genoma, o que lhe permitiu adaptar-se no ambiente hospitalar (CATTOIR e LECLERCQ, 2013). Nos Estados Unidos (EUA) na década de 1990, *E. faecium* resistentes à vancomicina se disseminaram em ambientes hospitalares e na virada do século se tornaram endêmicos. A estrutura da população de *E. faecium* foi elucidada com base na tipagem de sequências de multilocus (MLST) e revelou a existência de um complexo clonal (CC) 17 ou chamado de “Clade A1”, denominados “de alto risco” por serem multirresistentes e extremamente virulentos, como também por terem se adaptado facilmente ao ambiente hospitalar causando infecções em pacientes de hospitais de todo o mundo, inclusive no Brasil (LEBRETON et al., 2013, MERLO et al., 2015, DE MELLO et al., 2016).

O aumento da prevalência e da disseminação de *E. faecium* multirresistente resultou na redução das opções terapêuticas uma vez que a maioria dos isolados *E. faecium* são resistentes à ampicilina e à vancomicina, com resistência às altas concentrações de aminoglicosídeos, três antibióticos tradicionalmente utilizados (ARIAS et al., 2010).

1.3 Resistência aos antimicrobianos

Enterococcus spp. mostram habilidades em desenvolver resistência aos antibióticos, uma vez que podem adquirir mutações e genes exógenos que conferem resistência a medicamentos adicionais. Especialmente em ambiente hospitalar, em que há um uso generalizado de antibióticos, essa vantagem seletiva conferida pela resistência aos antibióticos podem ser enormes (ARIAS e MURRAY, 2012).

No que se refere a infecções nosocomiais com resistência adquirida a antimicrobianos, enterococos resistentes à vancomicina (VRE, do inglês *Vancomycin Resistant Enterococci*) são, provavelmente, a maior preocupação que já surgiu (GIRAFFA, 2002). Infecções por VRE estão cada vez mais triviais e difíceis de tratar, geralmente com surtos hospitalares duradouros que são verdadeiros desafios (RUBINSTEIN e KEYNAN, 2013). Além da daptomicina (DAP) há poucos antimicrobianos disponíveis como alternativas de tratamento, são eles: Tigeciclina (WERNER et al., 2008; DA SILVA e NUNES SALGADO, 2010; SEPUTIENE et al., 2010), Linezolida (MOELLERING, 2003; LEACH et al., 2007; ARIAS e MURRAY, 2012; RUBINSTEIN e KEYNAN, 2013) e Tedizolida que foi recentemente aprovada no Brasil (ANVISA, 2017).

1.4 Daptomicina

Daptomicina é um lipopeptídeo cíclico que age na membrana celular bacteriana com efeito bactericida, sendo um dos poucos antibióticos que podem ser usados contra VRE. A daptomicina foi aprovada como uma alternativa de tratamento para infecções causadas por *Staphylococcus aureus*, mas que tem sido usada “off-label” como última alternativa de tratamento para infecções causadas por outras bactérias Gram-positivas como VRE. Apesar do importante papel clínico, o mecanismo de ação da daptomicina ainda não é bem compreendido (MILLER et al., 2016).

1.4. 1. Mecanismo de ação da Daptomicina

A daptomicina tem como alvo o fosfatidilglicerol (PG) na membrana bacteriana através de um mecanismo que requer cálcio, formando pequenas micelas. Entretanto, há duas hipóteses sobre o efeito que isso tem sobre a membrana (Figura 1). Uma hipótese propõe que a daptomicina forma uma estrutura oligomérica semelhante a poros na membrana, o que resulta em vazamento de íons e subsequente dissipação do potencial de membrana. Uma segunda hipótese sugere que a daptomicina interrompe a integridade da membrana por meio da extração de lipídios e leva ao vazamento iônico temporário. As duas hipóteses não são mutuamente exclusivas porque ambas podem desempenhar o mesmo papel, explicando os diversos efeitos do antibiótico na permeabilização bacteriana, divisão celular e metabolismo (MILLER et al., 2016).

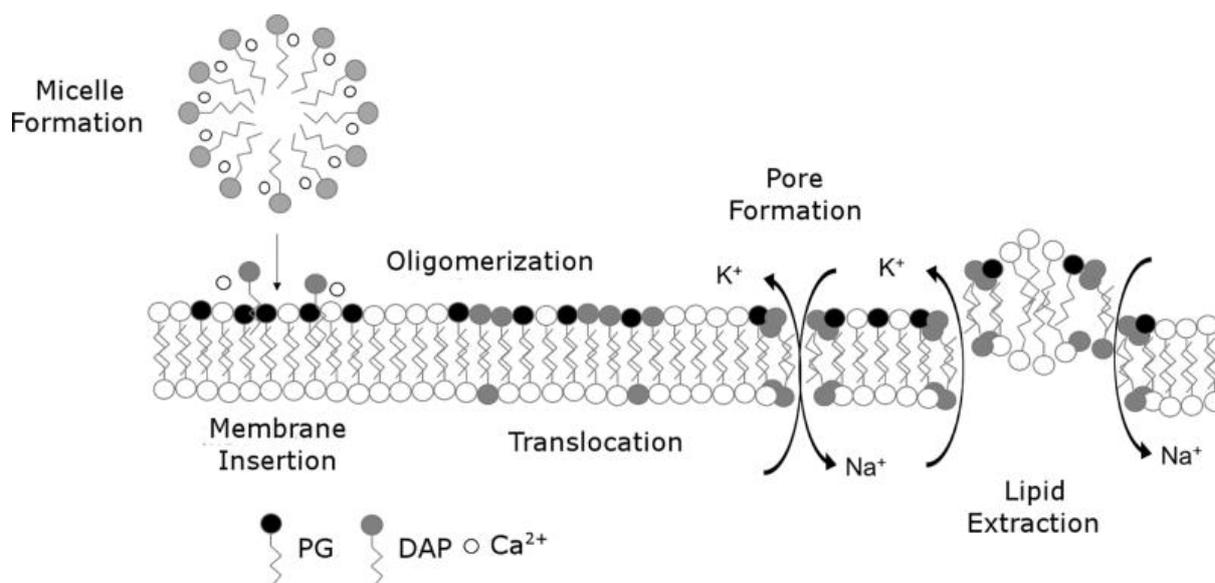


Figura 1. Mecanismos propostos para a ação da daptomicina. Em solução, a DAP complexa-se com cálcio para formar micelas pequenas e a subsequente inserção na membrana depende da presença de cálcio e fosfatidilglicerol (PG). Uma vez inserida, a DAP oligomeriza e transita para o folheto da membrana interna. Esses complexos então se alinham em lados opostos da membrana para formar um canal de poros permeável a pequenos cátions, ou interrompem a integridade da membrana por meio da extração de lipídios e levando ao vazamento iônico transitório. Fonte: MILLER et al, 2016.

1.4. 2. Resistência à daptomicina em *Enterococcus faecium*

A Daptomicina se tornou um antibiótico chave para o tratamento de *E. faecium* multirresistentes, sendo utilizado como primeira opção para tratar infecções severas (TRAN et al., 2015). Entretanto, foram observados alguns casos de resistência e falha terapêutica durante o tratamento e ainda há uma discussão quanto ao ponto de corte definido, o qual descreve o isolado como sendo sensível quando CIM ≤ 4 mg/L (ARIAS et al., 2010; MUNITA et al., 2014; TRAN et al., 2015).

As vias descritas até o momento apontadas como as mais importantes para a resistência à daptomicina em *E. faecium* envolvem os genes *liaFSR* que auxiliam na resposta ao estresse da parede celular e os genes *yycFGHIJ* que controlam a homeostase da parede celular (ARIAS et al., 2011; DIAZ et al., 2014; SINEL et al., 2016).

O sistema de três componentes LiaFSR (homólogo do sistema VraSR em *S. aureus*) é conservado em bactérias Gram-positivas com baixo conteúdo G+C (Firmicutes) (JORDAN et al., 2006). É formado pelos genes: LiaF que age inibindo a ativação da expressão de LiaR por meio de interação com LiaS, na ausência de estresse de membrana (JORDAN et al., 2007;

MILLER et al., 2016); LiaS, que tem função de proteína sensora chamada histidina quinase, responde à estressores induzidos pela daptomicina ou outros agentes ativos de membrana. LiaS fosforila LiaR, regulador de resposta que altera a expressão de genes alvos (MILLER et al., 2016).

O sistema YycFG (incluindo os genes acessórios *yycHIJ*), também conhecido como WalRK em *S. aureus*, é o segundo sistema regulatório envolvido na homeostase da parede celular e essencial em bactérias Gram-positivas (DIAZ et al., 2014). YycG (também conhecido como WalK) é a histina quinase e YycF (WalR) é o regulador de resposta (SZURMANT et al., 2007).

No estudo realizado por Munita e colaboradores (2012), as mutações mais comuns identificadas no sistema LiaFSR em *E. faecium* foram no gene LiaR (Trp73Cys) acompanhada por uma substituição em LiaS (T120A), mutações anteriormente relacionadas à resistência à daptomicina em isolados clínicos de *E. faecium* (ARIAS et al, 2011). A deleção do gene *liaR* em isolados clínicos de *E. faecium* que continham mutações nos dois sistemas LiaFSR e YycFG (PANESSO et al., 2015), promoveu um fenótipo de supersensibilidade à daptomicina. A deleção de *liaR* em *E. faecalis* também foi capaz de causar o mesmo fenótipo de supersensibilidade à daptomicina (REYES et al., 2015).

Análises de 19 genomas de isolados clínicos de *E. faecium* com CIM entre 3 e 48 mg/L revelaram que a maioria dos isolados possuíam mutações em LiaFSR ou YycFG, sendo que ambas as vias podem levar à resistência à daptomicina. Contudo, dois isolados apresentaram mutações nos dois sistemas (LiaFSR e YycFGHIJ), portanto mutações nesses sistemas podem não ser exclusivas, o que sugere uma complexidade nas mudanças genéticas que levam à resistência à daptomicina (DIAZ et al. 2014).

Por outro lado, ao analisar o genoma de um par de isolados de *E. faecium* de um mesmo paciente (antes e após o tratamento com daptomicina), foram observadas 19 mutações não sinônimas, mas nenhuma nos genes *liaFSR* e *yycFGHIJ* (MATONO et al., 2016). Notou-se dois genes mutados, ambos relacionados com proteínas de reparo ao DNA, o que pode ter contribuído para que mais mutações ocorressem nestes isolados. Contudo, não foi possível chegar à uma conclusão de qual foi a via que acarretou a resistência à daptomicina (MATONO et al., 2016). Este estudo evidencia que não são somente estas duas vias que contribuem para a resistência, como também há um relato de isolados com CIM dentro da faixa de sensibilidade à daptomicina que continham mutações nos genes *liaFSR* (MUNITA et al, 2014).

Além dos mecanismos acima mencionados, estudos recentes mostraram que *E. faecalis* podem mudar a composição da sua membrana celular incorporando ácidos graxos da bile (estado comensal) ou do soro (estado patogênico), o que resulta em uma tolerância induzida à agentes prejudiciais da membrana (SAITO et al., 2014; HARP et al., 2016; SAITO et al., 2018). Uma maior proteção às células contra a daptomicina foi observada quando *E. faecalis* foi cultivado com bile, soro, ácido oleico ou linoleico (SAITO et al., 2014). Nada se sabe sobre a incorporação de ácidos graxos ou a mudança de composição e de características da membrana celular de *E. faecium* quando cultivados na presença de ácido oleico.

Portanto, a necessidade de se entender os mecanismos que levam à diminuição da sensibilidade à daptomicina em *E. faecium* através de vias alternativas se faz necessário tanto para melhor adequação de protocolos de tratamento das infecções, quanto para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo estudar *in vitro* vias alternativas aos sistemas LiaFSR e YycFGHIJ em *E. faecium* que levam à diminuição da sensibilidade à daptomicina.

2.2 Objetivos específicos

1. Identificar a amostra que apresenta mais sensibilidade à daptomicina entre as amostras clínicas provenientes do Hospital de Base de São José do Rio Preto-SP, e caracterizá-las.
2. A partir da linhagem com mais sensibilidade à daptomicina, realizar uma evolução dirigida e selecionar células com concentração inibitória mínima (CIM) maior em diferentes condições de crescimento;
3. Estudar as diferenças entre o par isogênico sensível e resistente selecionado através de comparações dos genomas sequenciados;
4. Avaliar as mutações encontradas através da superexpressão do gene mutado/parental na amostra sensível/resistente e determinar a CIM da daptomicina;
5. Observar nas amostras clínicas se há as mutações em genes já descritos na literatura e nos genes mutados durante a evolução dirigida proposta;
6. Determinar a sensibilidade a diferentes antimicrobianos para verificar possíveis opções de tratamento ou o impacto das mutações obtidas na ação de outros antimicrobianos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras

Um total de 26 linhagens de *E. faecium* de diferentes sítios de infecção estão depositadas no Laboratório de Epidemiologia e Microbiologia Molecular (LEMiMo) sob a supervisão da professora Ilana Camargo. As linhagens foram coletadas durante o período de Abril/2012 à Fevereiro/2013 no Hospital de Base de São José do Rio Preto – SP em colaboração com a Profa. Dra. Mara Correa Lelles Nogueira. Este hospital possui 889 leitos e atende cerca de 10.500 pacientes/mês em atendimentos no pronto socorro e 560 pacientes/mês na UTI. O hospital atende pacientes de diversas cidades e está localizado em uma área com uma população de 1,8 milhões de habitantes. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), com número 38402714.5.0000.5415.

3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

A CIM dos seguintes antibióticos foram determinadas para cada isolado: vancomicina, teicoplanina, daptomicina, linezolida e tedizolida, de acordo com os métodos descritos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI Publishes New Antimicrobial Susceptibility Testing Standards - CLSI, 2016) e para tigeciclina, de acordo com EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) (2008, 2018). Para as amostras selecionadas *in vitro* também foram testadas ampicilina, vancomicina e polimixina B, de acordo com o CLSI e a linhagem *Staphylococcus aureus* ATCC29213 foi utilizada como controle. A fim de avaliar a resistência das amostras foram utilizados os pontos de corte disponíveis para *E. faecium* no CLSI (2018) exceto para tigeciclina que seguiu os pontos de corte do EUCAST (EUCAST, 2018). Os parâmetros de corte são apresentados na Tabela 1. Foram calculadas CIM₅₀ e CIM₉₀, ou seja, a concentração que inibiu 50% e 90% dos isolados, respectivamente, para cada antimicrobiano testado.

Tabela 1. Pontos de corte de diversos antibióticos para *Enterococcus* spp.

Antimicrobiano	Sensível (µg/mL)	Intermediário (µg/mL)	Resistente (µg/mL)	Referência
Vancomicina	≤ 4	16	≥ 32	CLSI, 2018
Teicoplanina	≤ 8	16	≥ 32	CLSI, 2018
Daptomicina	≤ 4	-	-	CLSI, 2018
Linezolida	≤ 2	4	≥ 8	CLSI, 2018
Tedizolida	≤ 0,5	-	-	CLSI, 2018
Tigeciclina	≤ 0,25	-	> 0,5	EUCAST, 2018

3.3 Tipagem molecular por macrorrestrrição do DNA seguido de eletroforese em gel de agarose com campos pulsados (PFGE)

Para a realização da tipagem molecular por macrorrestrrição do DNA seguido de eletroforese em gel de agarose com campos pulsados (PFGE, do inglês *Pulsed Field Gel Electrophoresis*) as amostras bacterianas foram cultivadas em caldo BHI e preparadas em gel de agarose para formação de plugues que foram digeridos com a endonuclease de restrição SmaI (TENOVER et al., 1995). Em seguida, as bandas de DNA genômico foram separadas em gel de agarose em um sistema de eletroforese de campos pulsados no equipamento CHEF Mapper system (Bio-Rad, Hercules, EUA). O gradiente da corrida de 26 horas foi de 6 V/cm sob ângulo de 120° com tempo inicial de 5 segundos e tempo final de 35 segundos e rampeamento linear. O perfil eletroforético foi analisado com o programa Bionumerics v6.5 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica) realizando agrupamento baseado nos coeficientes de Dice e utilizando o método da média aritmética não ponderada, onde otimização e tolerância foram ajustados para 0,5% e 1,25%, respectivamente. As bactérias foram consideradas do mesmo pulsotipo quando compartilhavam mais de 80% de similaridade no perfil de bandas (MCDUGAL et al., 2003).

O PFGE também foi realizado a fim de verificar a não contaminação durante a evolução dirigida *in vitro* e demonstrar que todas os isolados do experimento são isogênicos.

3.4 Extração do DNA dos isolados

DNA dos isolados foi extraído por método de lise mecânica (PALAZZO et al., 2007). Para tanto, uma colônia individual de cada isolado foi inoculada em 10 mL de caldo BHI e crescidas em banho aquecido a 37 °C em agitação durante 18 horas. Após este período, as células em suspensão foram centrifugadas e lavadas duas vezes com solução fisiológica estéril. Estas células passaram por método de lise mecânica, com agitação vigorosa com

pérolas de vidro tratadas com ácido nítrico e solução de lise. O DNA foi extraído com fenol-clorofórmio e precipitado utilizando isopropanol. Após a extração, o DNA foi quantificado no equipamento *NanoDrop* 2000 (Thermo Fisher Scientific Co., Waltham, Massachusetts, EUA), observando relação 260/280 nm. O DNA foi estocado a - 20 °C. Para o sequenciamento do genoma, o DNA foi extraído utilizando DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany).

3.5 Detecção dos genes *van*

A presença dos genes *vanA* e *vanB* foi detectada usando um protocolo de PCR multiplex modificado, com os primers descritos por Depardieu et al. (2004): (*vanA* [EA1 (+) e EA2 (-)] e *vanB* [EB3 (+) e EB3 (-)], e os genes *ddl E. faecalis* [DD13 (+) e DD3-2 (-)] e *ddl E. faecium* [FAC1-1 (+) e FAC2-1 (-)] foram pesquisados. O DNA genômico de *E. faecalis* V583 (SAHM et al., 1989) foi incluído como controle positivo para a amplificação de *vanB* e o isolado *E. faecium* VRE16 (DE MELLO et al., 2016) como um controle positivo para a amplificação de *vanA*.

3.6 Evolução dirigida de *E. faecium* à daptomicina em caldo BHI

A amostra *E. faecium* HBJSRP18 foi escolhida para gerar linhagens resistentes à daptomicina através de passagens seriadas devido ao fato dela ser a mais sensível encontrada neste período estudado com CIM = 0,06 µg/mL. Primeiramente, três colônias isoladas foram inoculadas em 3 tubos cada, contendo 3 mL de caldo BHI suplementado com 50 µg/mL de cálcio e os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C por 18 horas (pré-inóculo). Após 24 horas, o conteúdo de cada um dos tubos foi ajustado para $DO_{600nm} = 0,1$. Inoculou-se 30 µL de cada cultura ajustada em uma série de quatro tubos com concentrações crescentes de daptomicina. O primeiro tubo contendo uma diluição abaixo da CIM (0,03 µg/mL), o segundo com a mesma concentração da CIM (0,06 µg/mL), o terceiro com uma diluição acima da CIM (0,125 µg/mL) e o quarto com 2 diluições acima da CIM (0,25 µg/mL). Os tubos continham 3 mL de caldo BHI (totalizando 12 tubos), também foi suplementado com 50 µg/mL de cálcio e foram incubados ao abrigo da luz, sem agitação, a 37 °C por 20-24 horas. No terceiro dia, o tubo de cada um dos 3 experimentos com maior concentração de antibiótico que apresentou crescimento foi utilizado como pré-inóculo para a próxima etapa, e assim por diante (Figura 2). Após 10 dias consecutivos, obtivemos crescimento em concentração em níveis de resistência. As amostras deste último dia foram submetidas a um teste de estabilidade onde por três dias consecutivos elas foram inoculadas em caldo sem antibiótico e a CIM

permaneceu estável.

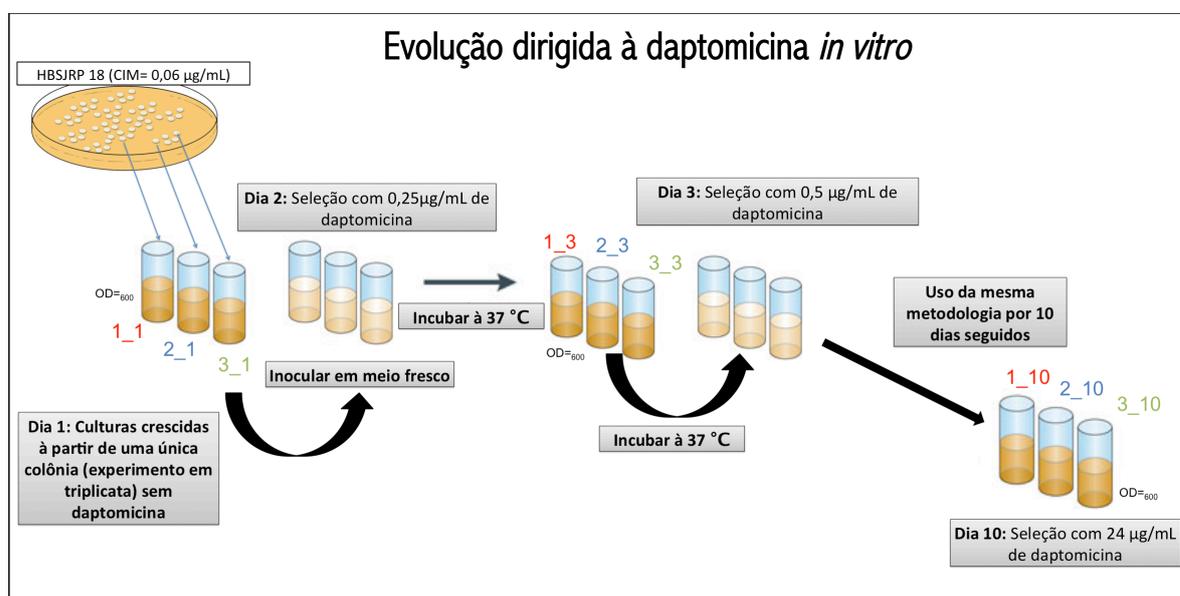


Figura 2. Evolução dirigida à daptomicina. À partir da amostra *E. faecium* HBSJRP18, três colônias individuais foram inoculadas em BHI, em seguida, passagens seriadas na presença crescente de daptomicina foram realizadas durante 10 dias consecutivos. Fonte: Elaborada pela autora.

3.7 Curva de crescimento

Além da evolução dirigida em meio BHI, houve o interesse de realizar a evolução dirigida em meio BHI com ácido oleico. Para averiguar se a presença de ácido oleico no meio BHI poderia interferir no crescimento do isolado em estudo, foi realizado experimento de curva de crescimento. O protocolo utilizado foi adaptado de Hall e colaboradores (2014). Resumidamente, a amostra supersensível *E. faecium* HBSJRP18 foi inoculada em meio BHI e BHI com 20 µg/mL de ácido oleico, por cerca de 18 horas. Após a incubação, a amostra foi ajustada para uma DO_{600nm} entre 0,05 a 0,1 em meio BHI no equipamento espectrofotômetro Spectramax M5 (*Molecular Devices*, Califórnia, EUA). Em seguida, foram inoculados 200 µL da cultura ajustada em microplaca de 96 poços e feita a medida de DO_{600nm} , a cada 5 minutos, por tempo total de 10 horas e agitação da placa durante 5 segundos, antes e depois de cada medida. O gráfico do tempo versus DO_{600nm} foi traçado utilizando software Excel. O experimento foi realizado em triplicata técnica.

3.8 Evolução dirigida à daptomicina em caldo BHI com adição de ácido oleico.

A abordagem de realizar a evolução dirigida com ácido oleico foi baseada em estudos (SAITO et al., 2014; HARP et al., 2016; SAITO et al., 2018) que demonstram que *E. faecalis*, comensal do trato gastrointestinal humano, é capaz de incorporar ácidos graxos da bile e do soro em sua membrana, resultando em uma tolerância induzida a agentes que danificam a membrana. Como exemplo, a suplementação com ácido oleico foi capaz de promover proteção contra a daptomicina. Existe uma falta de compreensão do porque algumas vias evolutivas *in vitro* diferem daquelas *in vivo*. Para enterococos, pode ser porque suas membranas são diferentes quando cultivadas *in vitro*, uma vez que ácidos graxos insaturados são obtidos do hospedeiro. Isso aumenta a fluidez da membrana e altera sua estrutura. Sendo assim, a suplementação com ácido oleico poderia propiciar a identificação de vias alternativas de resistência à daptomicina.

O procedimento desta evolução dirigida foi realizado de forma diferente, pois não observamos crescimento bacteriano em volumes pequenos com a adição de ácido oleico no meio BHI contendo cálcio e daptomicina, mesmo em concentrações bem baixas do antibiótico. Sendo assim, decidiu-se aumentar o número de células e, portanto, fazer a evolução dirigida em um volume final de 25 mL. Primeiramente, três colônias isoladas foram inoculadas em 3 tubos cada contendo 25 mL de caldo BHI suplementado com 50 µg/mL de cálcio e 20 µg/mL de ácido oleico, os tubos foram incubados em agitação a 37 °C por 18 horas (pré-inóculo). No dia seguinte, 1 mL do conteúdo de cada um dos tubos foi transferido para novos tubos contendo uma diluição abaixo da CIM (0,03 µg/mL), o segundo com a mesma concentração da CIM (0,06 µg/mL), o terceiro com uma diluição acima da CIM (0,125 µg/mL). Os tubos continham um volume final de 25 mL de caldo BHI (totalizando 9 tubos), também foi suplementado com 50 µg/mL de cálcio e 20 µg/mL de ácido oleico. Os mesmos foram incubados ao abrigo da luz, com agitação, a 37 °C por 20-24 horas. No terceiro dia, o tubo de cada um dos 3 experimentos com maior concentração de antibiótico que apresentou crescimento foi utilizado como pré-inóculo para a próxima etapa, e assim por diante. Após 10 dias consecutivos obteve-se crescimento em concentrações de resistência.

3.9 Sequenciamento e análise do genoma

Para o sequenciamento pelo método Illumina, o DNA genômico foi quantificado (Qubit dsDNA High-Sensitivity; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), as bibliotecas foram preparadas à partir de 50 ng de DNA com o kit Nextera DNA Sample Preparation (Illumina, San Diego, CA, USA) e sequenciadas pela plataforma Illumina MiSeq no Massachusetts Eye

and Ear Infirmary, Ocular Genomics Institute (Boston, MA, USA). A formação de *contigs*, bem como a comparação dos genomas foram realizados utilizando o software CLC Genomics Workbench (CLC bio, Aarhus, Denmark). A anotação dos *contigs* foi feita utilizando RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology). As sequências comparadas foram alinhadas à fim de buscar por SNPs que ocorreram em genes possivelmente relacionados à resistência à daptomicina. Os SNPs encontrados foram confirmados por meio de PCR com *primers* confeccionados para amplificar a região envolvida e posterior sequenciamento (Tabela 2).

Tabela 2. Sequência de *primers* para a confirmação dos SNPs por sequenciamento pelo método de Sanger.

Gene	Nome do <i>Primer</i>	Sequência de Nucleotídeos (5'-3')	Tamanho amplificado (pb)
<i>lafB E. faecium</i>	LafB2_F	GTATCCGTGTGCCGATTCAA	337
	LafB2_R	GCACCTGAATACGCACCTT	
<i>dhaK_SNP239 E. faecium</i>	DhaK239_F	GAAATGGTCCAGGCAGGTG	362
	DhaK239_2_R	AATCGTTCCTTCTACTGGTTTCA	
<i>dhaK_SNP 777delA e 856 - E. faecium</i>	Dhak 856_2F	TCATCGCAGTGTCCAAGGTC	386
	Dhak856_2R	GGACGCCTTTACCAGCAG	

3.10 Determinação do ST das amostras clínicas

O tipo de sequência (ST, do inglês *sequence type*) de cada pulstipo encontrado foi determinado por *MultiLocus Sequence Typing* (MLST). A ferramenta disponível online para o MLST (<http://www.genomicepidemiology.org/>) foi utilizada para identificar o ST das amostras que possuíam genoma sequenciado. Já para as amostras que não tiveram seu genoma sequenciado, fragmentos de 7 genes *housekeeping* foram amplificados e sequenciados utilizando *primers* e condições segundo o esquema descrito (<http://efaecium.mLst.net/>) para análise das mutações por comparação de sequências depositadas no banco de dados internacional (<http://www.mlst.net/databases/>).

3.11 Clonagem e superexpressão

3.11.1 Amplificação dos genes a serem clonados no vetor de expressão pAT28

Os genes *lafB-like*, que codifica glicosiltransferase-LafB, e *dhaK*, que codifica dihidroxiacetona quinase, foram amplificados a partir das amostras HBJSRP18-2.7 (com reversão da mutação) e HBJSRP18, respectivamente. A PCR foi realizada utilizando *Q5 High*

Fidelity DNA Polymerase (NEB), com *primers* apresentados na Tabela 3, que também contém as sequências dos *primers* utilizados para checar a inserção dos genes no plasmídeo.

Tabela 3. Sequência de *primers* para a clonagem dos genes e utilizados para confirmar que o gene foi inserido no plasmídeo.

Gene	Nome do Primer	Sequência de Nucleotídeos (5'-3')	Tamanho amplificado (pb)
<i>lafB-like</i>	LafB_F (KpnI)	GGTACCGTGAAGGGGGACGTAAGGTG	1.084
	LafB_R (XbaI)	TCTAGACTCCAAACCTAGTCCTTGACCT	
<i>dhaK</i>	Dhak_F (KpnI)	GGTACCAGCAGTCGATCTGAAGGAGGA	1.814
	Dhak_R (XbaI)	TCTAGAAAAAGGACTTGGTCAGCGAT	
Verificação do inserto no vetor	pAT28_F	TAATGCAGCTGGCACGACAGG	552
	pAT28_R	GCGTGATTGCCAAGCACGTCC	

Os produtos de PCR e o plasmídeo pAT28 com alto número de cópias (TRIEU-CUOT et al., 1990) foram digeridos com as enzimas KpnI e XbaI (*New England Biolabs*) à 37 °C por 1 hora e 30 minutos cada enzima. Os produtos de digestão foram purificados utilizando o kit GeneJET PCR Purification (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Após a segunda digestão, a purificação foi realizada com o kit de purificação de PCR (Qiagen), com volume final de 45 µl.

3.11.2 Ligação com T4 DNA ligase

A ligação do plasmídeo pAT28 aos produtos de PCR digeridos com KpnI/XbaI foi realizada com o uso da T4 DNA ligase (*New England Biolabs*) de acordo com instruções do fabricante.

3.11.3 Preparo de células competentes de *E. coli* DH5α

A preparação das células competentes foi iniciada a partir de uma cultura de 18 horas em meio Luria Bertani (LB) de uma única colônia de *E. coli* DH5α. Em seguida foi adicionado 2,5 mL da cultura crescida em DO_{600nm} 0,5 em 250 mL de LB. Após o ajuste da DO, a cultura foi mantida em gelo por 30 minutos. Células foram coletadas por centrifugação (3000 rpm por 10 minutos), o sobrenadante descartado e as células foram suspensas em 20 mL de solução de CaCl₂ a 100 mM e 10% glicerol. A suspensão foi mantida em gelo por mais

30 minutos, sendo misturada a cada 5 minutos. As células foram coletadas novamente por centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram suspensas em 2,5 mL de solução CaCl₂. Após serem divididas em alíquotas, *E. coli* DH5 α competentes foram mantidas a -80 °C.

3.11.4 Transformação em *E. coli* DH5 α

As células competentes foram descongeladas em gelo. Em 100 μ l da suspensão de células competentes foram adicionados 5 μ l de DNA proveniente do produto da ligação, misturado gentilmente e mantido em gelo por 15 minutos. O tubo foi aquecido a 42 °C por 2 minutos e mantido em gelo por mais 2 minutos. Foram adicionados 900 μ l de SOC (2% triptona, 0,5% extrato de levedura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, e 20 mM glicose) e incubado com agitação (225 rpm) a 37 °C por 45 minutos. Para cada gene, 100 μ l foram semeados nas placas de BHI com 500 μ g/mL de espectinomicina. Para a concentração das células, o volume restante foi centrifugado a 2500 rpm por 2 minutos, 800 μ l de sobrenadante foram descartados e os 100 μ l restantes foram semeados em placa de BHI contendo 100 μ g/mL de espectinomicina.

3.11.5 PCR de colônia

Para confirmar a inserção do gene de interesse no plasmídeo, PCR a partir de colônia foi realizada com *primers* dos genes *lafB* e *dhaK* para clonagem, assim como os *primers* do vetor pAT28 (Tabela 3).

3.11.6 Extração de plasmídeo

Para cada gene de interesse, uma colônia de *E. coli* DH5 α contendo o respectivo gene foi inoculada em 5 mL de BHI espectinomicina com 100 μ g/mL e incubados a 37°C por 4 a 6 horas, quando esse inóculo foi semeado em 300 mL de BHI também com 100 μ g/mL de espectinomicina. No dia seguinte, a extração do plasmídeo foi realizada com o kit Maxi prep (QIAGEN) segundo as instruções do fabricante.

3.11.7 Confirmação do inserto com fragmento de interesse

O produto da extração do plasmídeo foi quantificado e realizado PCR com *primers* pAT28, seguido de digestão do produto da PCR com as enzimas XbaI e KpnI, uma enzima cada vez. Entre a digestão com a primeira e segunda enzima, purificação foi realizada com o kit GeneJET PCR Purification (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A presença do inserto e a digestão correta do fragmento foram confirmadas por gel de agarose.

3.11.8 Preparo de células competentes de *E. faecium*

No primeiro dia, uma colônia de cada *E. faecium*, HBSJRP18-3.6 e HBSJRP18, foi inoculada em 3 mL de BHI e incubadas a 37 °C por 18 horas. Após o período de incubação, 30 µl da cultura foi adicionado em 25 mL de meio A (BHI 2x concentrado com 1M de sacarose e glicina 4%) e incubado a 37 °C, por 18 horas. Realizou-se as etapas em gelo. Centrifugou-se as células a 4500 rpm por 5 minutos, descartou-se o sobrenadante, o pellet foi ressuspensionado com 25 mL de meio A preaquecido e incubou-se a 37 °C por 1 hora. As células foram centrifugadas a 4500 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e seu pellet foi ressuspensionado com 10 mL do tampão de lavagem gelado (1M de sacarose misturado com mesmo volume de glicerol 20%). O pellet ressuspensionado foi dividido em 6 microtubos de 2 mL; as células foram novamente centrifugadas com 12000 rpm por 1 minutos; descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet com 2 mL de tampão de lavagem gelado, esta etapa foi repetida. Centrifugou-se novamente as células a 12000 rpm por 1 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado com 100 µl de tampão de lavagem gelado. As células competentes foram armazenadas a -80 °C.

3.11.9 Eletroporação em *E. faecium*

Primeiramente, as células foram descongeladas e mantidas em gelo, em seguida misturou-se 400 ng do plasmídeo construído em 80 µl de células. A mistura foi colocada em uma cubeta e mantida em gelo por 30 minutos. A eletroporação foi realizada com o equipamento MicroPulser™ (Bio-Rad, Hercules, EUA) com pulso de 2,5 kV, com capacitância de 25 µF e resistência de 200 ohms. As células foram lavadas com 1 mL de meio B (BHI 2x concentrado, 1M de sacarose - temperatura ambiente) na cubeta e transferidas para um novo microtubo de 2 mL e incubada a 37 °C por 2 h em agitação. As células foram centrifugadas a 12000 rpm por 1 minuto. Em seguida, o sobrenadante foi descartado deixando apenas 100-200 µl do sobrenadante no tubo para que o *pellet* fosse ressuspensionado. Em seguida, o *pellet* ressuspensionado foi inoculado por espalhamento em placa BHI com 500 µg/mL de espectinomicina e incubou-se a 37 °C por 2 dias. No segundo dia, PCR da colônia foi realizada com os *primers* para pAT28 para confirmar se a banda amplificada continha o fragmento de interesse.

3.12 Investigação de como a amostra com supersensibilidade à daptomicina foi selecionada no hospital

O fato da amostra supersensível à daptomicina HBSJRP18 apresentar uma mutação única que influencia na sensibilidade também a outros antibióticos, nos motivou a buscar qual foi a força seletiva que proporcionou a seleção desta linhagem *in vivo*, durante o período de internação do paciente. O paciente fez uso de diversos antibióticos como piperacilina/tazobactam e cefepima para o tratamento de pneumonia. Para tratar infecção do trato urinário, colistina, ceftriaxona e ciprofloxacina foram administrados. Sendo assim, foi analisada a inibição do crescimento da amostra HBSJRP18 e HBJSRP18-2.7 (que possui a reversão da mutação em LafB) para diversos antibióticos. Este experimento foi realizado por Daria V. Tyne, colaboradora no laboratório do Professor Michael S. Gilmore (Harvard Medical School). As amostras foram cultivadas em caldo MHCA a 37°C por 18 horas. Diluições seriadas em série de cada antibiótico no mesmo meio foram realizadas em placa de 96 poços e os poços foram depois inoculados com as linhagens bacterianas, que foram normalizadas para $DO_{600nm} = 0,5$ e depois diluídas a 1: 10000. O volume total em cada poço foi de 200uL. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e foram então lidas quanto a crescimento, a olho ou ressuspensando todos os poços e depois medindo DO_{600nm} num leitor de placas Synergy2 Biotek (Winooski, VT) com o Software Gen5. O gráfico do tempo versus DO_{600nm} foi traçado utilizando o Software Excel. O experimento foi realizado em quadruplicata técnica. Para a análise estatística foi realizado o Teste T-Student da média de absorbância das duas amostras avaliadas. Os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises do PFGE, ST, prevalência de VRE e genes *van* genes nas amostras clínicas

Os 26 isolados de *E. faecium* foram categorizados em 4 pulsotipos (A-D) (Figura 3). O pulsotipo “A” foi o predominante e incluiu 5 subtipos. Os isolados HBSJRP 7, HBSJRP 9, HBSJRP 12 e HBSJRP 16 não sensíveis à daptomicina juntamente com outros 7 isolados sensíveis, agruparam-se no pulsotipo A, subtipo A1. Os 3 isolados não sensíveis à daptomicina do subtipo A1 foram determinados como pertencentes ao ST896, os isolados dos pulsotipos B, C e D foram determinados como ST412, como isolados representativos são HBSJRP 3 do pulsotipo B1, HBSJRP 18 do pulsotipo C1 e HBSJRP 17 do pulsotipo D1.

Nos EUA na década de 1990, *E. faecium* resistentes à vancomicina se disseminaram em ambientes hospitalares e na virada do século se tornaram endêmicos. A estrutura da

população de *E. faecium* foi elucidada com base na tipagem de sequências de multilocus (MLST) e revelou a existência de um complexo clonal (CC) 17 ou chamado de “Clade A1” (LEBRETON et al., 2013), sendo associado a maioria dos surtos de infecções hospitalares e clínicas em cinco continentes (LEAVIS et al., 2006), inclusive no Brasil (MERLO et al., 2015; DE MELLO et al., 2016). Primeiramente identificado nos EUA (WANG et al., 2014), o ST896 é SLV (do inglês, *single-locus variant*) do ST412, ambos pertencentes ao CC17, associados com amostras não sensíveis à daptomicina (WANG et al., 2014). Neste estudo, o pulstipo A corresponde ao ST896, e o clone identificado como subtipo A1 foi encontrado em infecções em 11 pacientes. VREs foram encontrados no subtipo A1, que também apresentou os isolados não sensíveis à daptomicina (que daqui em diante serão denominados resistentes à daptomicina). Quatorze isolados foram encontrados resistentes à vancomicina e teicoplanina, e 10 deles eram do subtipo A1. Todos possuíam Tn1546, que é conhecido por transmitir este fenótipo. Tn1546 abriga o gene *vanA*, que é o prevalente em hospitais no Brasil (DA SILVA et al., 2012; MERLO et al., 2015; DE MELLO et al., 2016; SACRAMENTO et al., 2016).

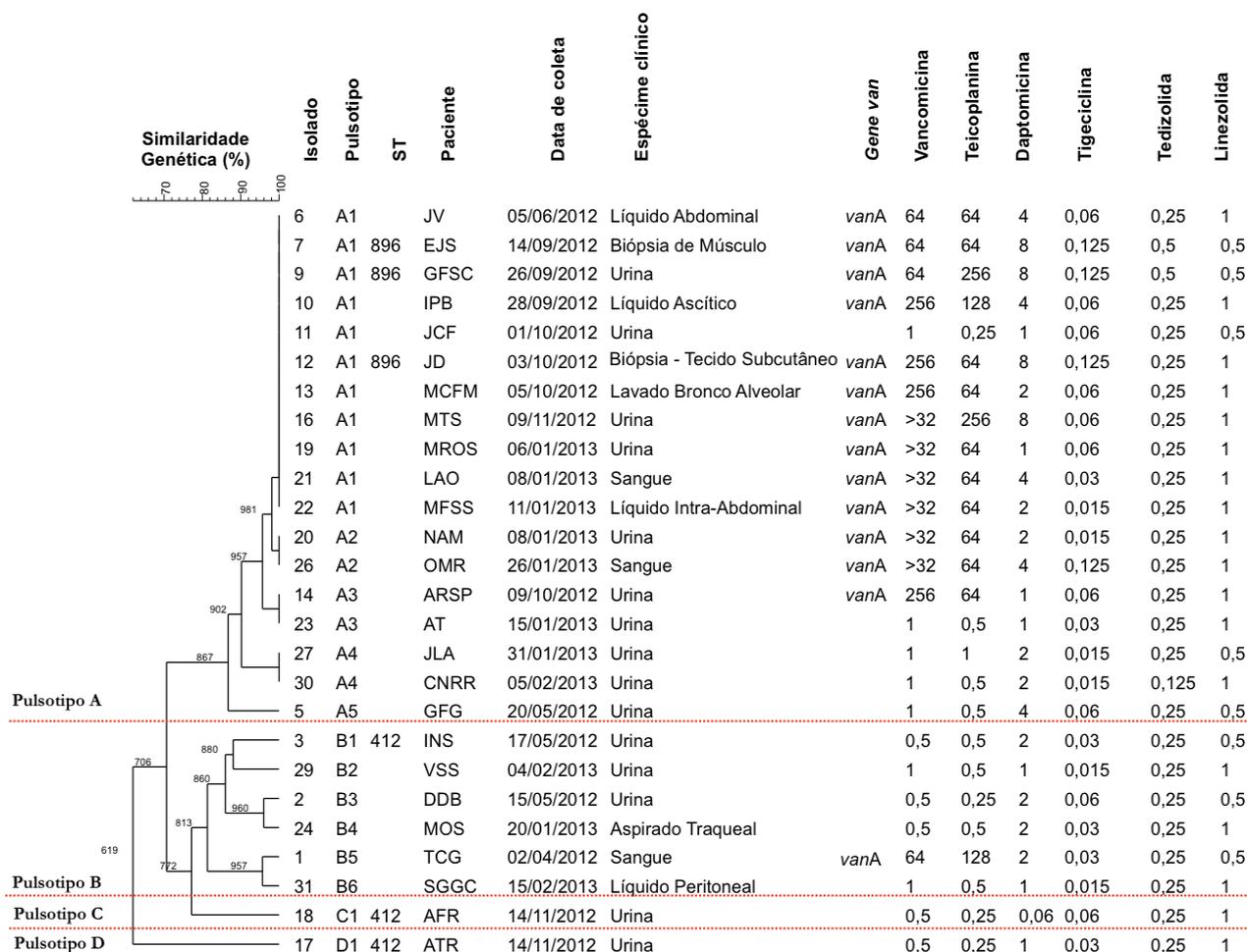


Figura 3. Dendrograma de similaridade genética de *E. faecium* isolados de infecções em pacientes hospitalizados durante o período estudado. Informações de pulsotipo, ST, presença de genes van e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos expresso em valor de CIM. Os pontos de corte utilizados foram: vancomicina $S \leq 4$, $I = 8-16$, $R \geq 32$; teicoplanina $S \leq 8$, $I = 16$, $R \geq 32$; daptomicina $S \leq 4$; linezolida $S \leq 2$, $I = 4$, $R \geq 8$; tedizolida $S \leq 0,5$; tigeciclina $S \leq 0,25$, $R > 0,5$.

A disseminação de um clone de *E. faecium* considerado de alto risco resistente à vancomicina com sensibilidade reduzida à daptomicina foi encontrada em 4 pacientes, apesar da daptomicina não ter sido utilizada no hospital até novembro de 2012. Esta observação implica que modificações induzidas por outros fatores no hospital, potencialmente tratamentos com antibióticos, desinfecção ou outros fatores, podem ter contribuído para selecionar alterações nessas linhagens que também reduziram a sensibilidade à daptomicina.

4.2 Sensibilidade aos antimicrobianos

A faixa de CIM encontrada para daptomicina foi de 0,06 a 8 µg/mL, sendo que HBSJRP18 foi o isolado mais sensível à daptomicina. Os valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ (µg/mL) para todos os antimicrobianos foram determinados como se segue: 2/8 para daptomicina, 64/256 para vancomicina, 64/128 para teicoplanina, 0,06/0,125 para tigeciclina, 1/1 para linezolida e 0,25/0,25 para tedizolida. A CIM de cada isolado está descrita na Figura 3. De acordo com os pontos de corte do CLSI (2018) para *E. faecalis* (0,5 µg/mL), todos os isolados foram sensíveis à tedizolida.

No contexto clínico, os desafios do tratamento de *E. faecium* multirresistente tem aumentado e estão cada vez mais difíceis de se tratar. A daptomicina é um dos poucos antibióticos restantes com atividade contra VRE e é normalmente utilizada como antibiótico de último recurso (WHO, 2017). Contudo, o surgimento de resistência à daptomicina tem aumentado.

Felizmente, verificou-se que todos os isolados de *E. faecium* deste estudo possuem sensibilidade à tigeciclina, linezolida e tedizolida que podem ser considerados como terapias alternativas para tratar VRE resistente à daptomicina. Tanto tigeciclina como linezolida poderiam ser indicadas baseado nos testes *in vitro* conduzidos neste estudo. A tedizolida foi aprovada recentemente para uso no Brasil (FDA, 2014; ANVISA, 2017). A partir da identificação da amostra supersensível à daptomicina foi realizada a evolução dirigida *in vitro* em meio BHI.

4.3 Análise do crescimento bacteriano

Com esta análise verificou-se que a presença de ácido oleico não atrapalha o crescimento do isolado supersensível, pelo contrário, parece até mesmo contribuir para seu crescimento (Figura 4), sendo assim o ácido oleico foi utilizado para realizar uma nova evolução dirigida à daptomicina *in vitro*.

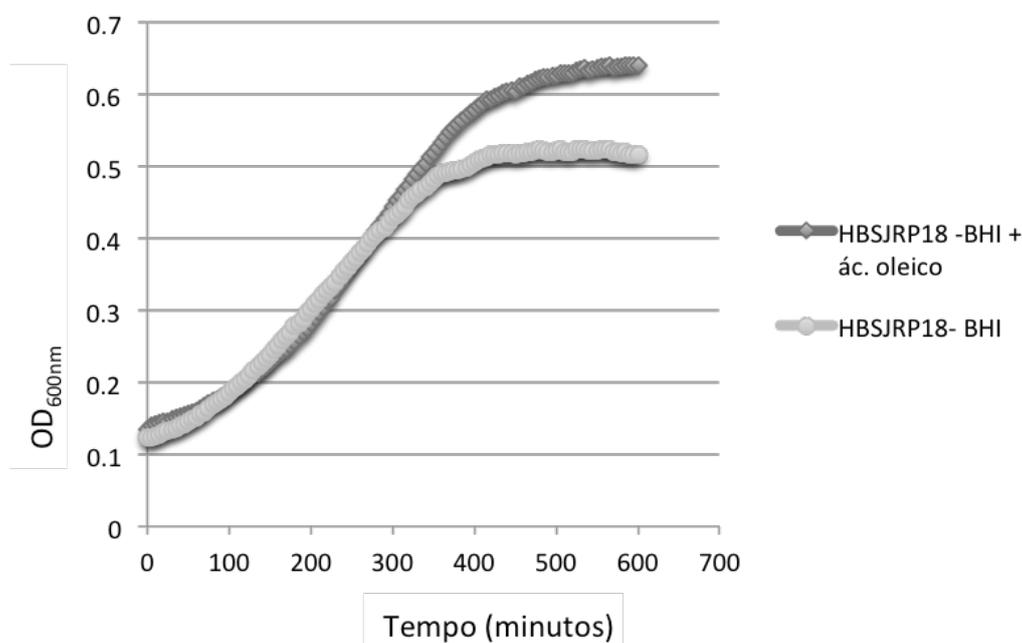


Figura 4. Curva de crescimento comparando o crescimento da amostra supersensível em BHI com e sem a presença de ácido oleico.

4.4 Sensibilidade à daptomicina das duas seleções de resistentes

A amostra HBSJRP18 mostrada na Figura 2 foi selecionada para a realização da evolução dirigida *in vitro* por apresentar a CIM de daptomicina mais baixa. A CIM de daptomicina foi determinada para todos os derivados da HBSJRP18 obtidos das duas seleções, as Tabelas 4 e 5 mostram a sensibilidade de cada um dos derivados da evolução dirigida com meio BHI e meio BHI contendo ácido oleico, respectivamente.

Da evolução dirigida em meio BHI, a primeira e última amostra de cada experimento assim como outros três mutantes intermediários foram escolhidos para serem sequenciados. Já para a evolução dirigida em meio BHI e ácido oleico foram escolhidas as primeiras e todas as que tiveram um aumento da CIM para que pudessem ser sequenciadas.

Tabela 4. CIM das amostras da evolução dirigida à daptomicina em meio BHI.

Amostras	CIM ($\mu\text{g/mL}$)
HBSJRP18 1.1	0,06
1.2	0,125
1.3	0,125
1.4	4
1.5	4
1.6	4
1.7	4
1.8	4
1.9	4
1.10	8
HBSJRP18 2.1	0,06
2.2	0,25
2.3	0,25
2.4	0,25
2.5	2
2.6	2
2.7	2
2.8	4
2.9	4
2.10	16
HBSJRP18 3.1	0,06
3.2	0,25
3.3	4
3.4	4
3.5	4
3.6	8
3.7	4
3.8	4
3.9	4
3.10	8

Tabela 5. CIM das amostras da evolução dirigida à daptomicina em meio BHI e ácido oleico.

Amostras	CIM ($\mu\text{g/mL}$)
HBSJRP18 A1	0,06
A2	4
A3	4
A4	4
A5	8
A6	8
A7	8
A8	8
A9	8
A10	8
A11	32
HBSJRP18 B1	0,06
B2	2
B3	4
B4	4
B5	8
B6	8
B7	8
B8	16
B9	32
B10	16
B11	64
HBSJRP18 C1	0,06
C2	4
C3	4
C4	4
C5	8
C6	8
C7	8
C8	16
C9	16
C10	16
C11	64

4.5 Análise do perfil clonal das amostras provenientes das seleções de resistentes

As amostras recuperadas de cada etapa da evolução dirigida foram comparadas por macrorrestrrição do DNA com SmaI seguido por PFGE para verificação do perfil clonal e descartar contaminações durante o experimento. As amostras recuperadas durante a evolução

dirigida em BHI e em BHI com ácido oleico estão nas Figuras 5 e 6, respectivamente. Não houve contaminação durante os experimentos de evolução dirigida.

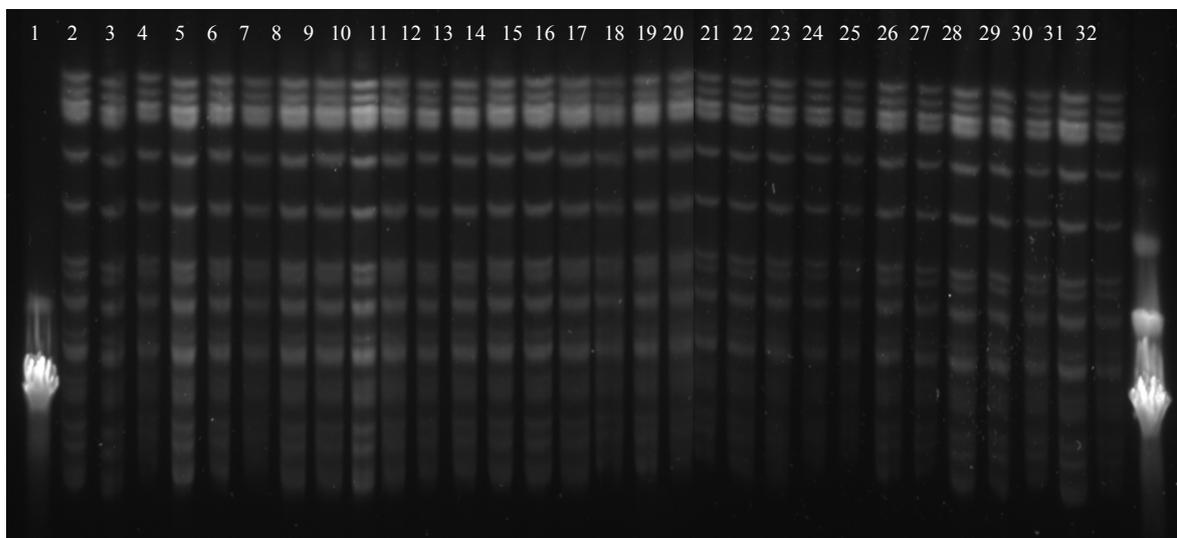


Figura 5. Figura representativa dos géis demonstrando o perfil clonal obtido por macrorrestrição do DNA com SmaI seguido de PFGE das amostras da evolução dirigida em meio BHI. 1 e 32 são os marcadores de peso molecular (1,000 kb). De 2 a 11 são as amostras do experimento 1: 1.8, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9 e 1.10. De 12 a 21 são as amostras do experimento 2: 1.8, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9 e 2.10. De 22 a 31 são as amostras do experimento 3: 1.8, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9 e 3.10.

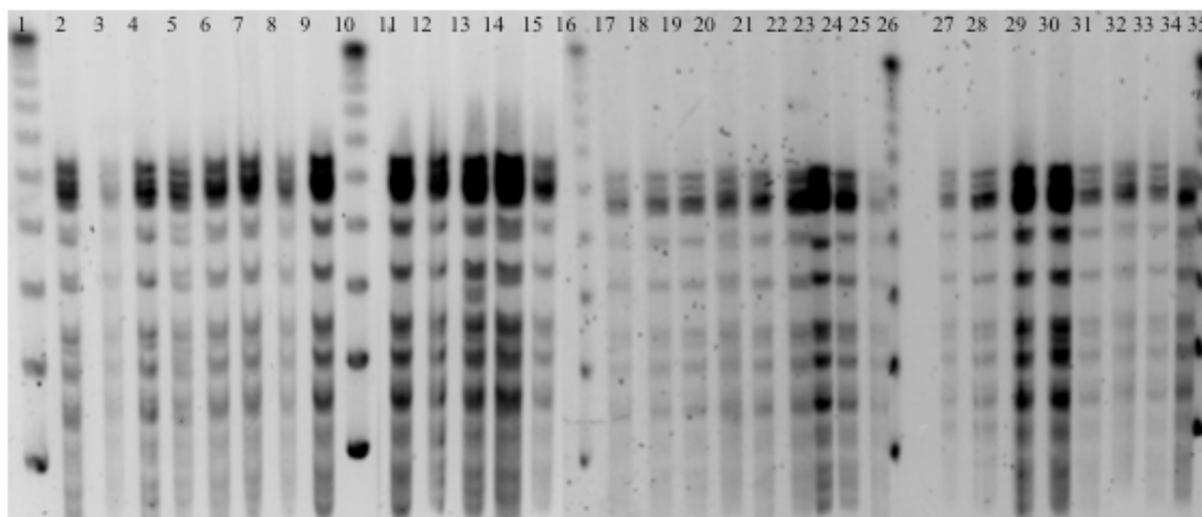


Figura 6. Figura representativa dos géis demonstrando o perfil clonal obtido por macrorrestrição do DNA com SmaI seguido de PFGE das amostras da evolução dirigida em meio BHI com ácido oleico a 20 µg/mL. 1, 10, 16, 26 e 35 são os marcadores de peso molecular (1,000 kb). De 2 a 9, 11 e 12 são as amostras do experimento A: 1.8, A.2, A.3, A.4,

A.5, A.6, A.7, A.8, A.9, A.11. De 13 a 15 e de 17 a 23 são as amostras do experimento B: B.1, B.2, B.3, B.4, B.5, B.6, B.7, B.8, B.9 e B.11. De 24 a 34 são as amostras do experimento C: 18, C.2, C.3, C.4, C.5, C.6, C.7, C.8, C.9 e C.11.

4.6 Análise de genoma

As amostras clínicas resistentes à daptomicina *E. faecium* HBSJRP7, HBSJRP9 e HBSJRP12, a supersensível HBSJRP18, bem como as resistentes selecionadas e algumas das amostras obtidas das evoluções dirigidas *in vitro* em BHI tiveram seus genomas sequenciados. A cobertura e número de *contigs* de cada amostra sequenciada se encontram na Tabela 6.

Foram escolhidas três amostras resistentes da evolução dirigida e algumas intermediárias. Os genomas das resistentes obtidos foram comparados com o genoma da amostra inicial (HBSJRP18 1.1, HBSJRP18 2.1 e HBSJRP18 3.1) em busca de SNPs.

A comparação do genoma de todas as amostras iniciais dos experimentos da evolução dirigida *in vitro* com BHI (HBSJRP18 1.1, HBSJRP18 2.1 e HBSJRP18 3.1) comprovou que não houve diferença entre as colônias iniciais usadas em cada um dos experimentos.

Tabela 6. Análise dos genomas quanto à cobertura e número de *contigs*.

Amostras	Cobertura	Número de <i>contigs</i>
<i>E. faecium</i> HBSJRP7	271,2x	176
<i>E. faecium</i> HBSJRP 9	393,9x	177
<i>E. faecium</i> HBSJRP 12	223,4x	182
<i>E. faecium</i> HBSJRP 18		
1.1	299x	181
18-1.4	470x	158
18-1.10	410x	149
<i>E. faecium</i> HBSJRP18-2.1	357x	156
18-2.7	460x	157
18-2.10	204.6x	166
<i>E. faecium</i> HBSJRP18 3.1	507.4x	152
18-3.6	425x	148

Os resultados das comparações genômicas do isolado supersensível HBSJRP18 à daptomicina e seus mutantes (Tabela 7) demonstram que o gene denominado glicosiltransferase LafB (o qual chamaremos daqui em diante de gene *lafB-like*) foi o primeiro passo necessário para aumentar o nível de sensibilidade à daptomicina nos três experimentos realizados em BHI. Outro gene que apresentou alteração nos três experimentos foi o denominado como gene que codifica uma proteína da família dihidroxiacetona quinase, o qual chamaremos de *dhaK* daqui por diante (Tabela 7).

Observou-se que a mutação de transição inicial C577T no gene *lafB-like*, que resultou na substituição dos aminoácidos Arg193Trp, precedeu qualquer outra mutação em todos os mutantes. Quando se alinhou a sequência deste gene com esta mutação com todo o GenBank, verificou-se que ela era igual às sequências das demais amostras. Ao analisar a sequência da HBSJRP18, observamos que a sequência era única e exclusiva desta amostra supersensível. Por isso, concluímos que o SNP C577T restaurou a sequência de codificação que é mais comum para o gene *lafB-like* em isolados de *E. faecium*.

O outro gene identificado e selecionado para estudo foi *dhaK*, pois nos três experimentos ele sofreu algum tipo de alteração. No experimento 1, ele foi detectado na amostra resistente com CIM igual a 8 µg/mL contendo o SNP C239A que resultou na alteração de aminoácido Ala80Glu. Entretanto, nesta amostra também havia um SNP resultando em troca de aminoácido no gene descrito como regulador de transcrição [contendo domínio catalítico diacilglicerol quinase] (*dgK*) (Tabela 7).

No experimento 2, uma inserção de adenina (A) foi detectada no *dhaK* entre as bases de número 776 e 777 (776_777insA) alterando o quadro de leitura, o que gerou um códon de parada da tradução. No experimento 3, *dhaK* aparece com um SNP na posição 856 (G856T) que leva ao surgimento de um *stop codon* (Glu286*) truncando a proteína.

Tabela 7. Resultado da comparação entre o genoma obtido da HBSJRP18 e os genomas dos seus respectivos derivados obtidos na evolução dirigida com meio BHI.

Linhagem	Dia de obtenção	Mutações encontradas*	CIM (µg/mL)
HBSJRP18			0,06
18-1.4	4	Glicosiltransferase LafB C577T (Arg193Trp)	2
18-1.10	10	Glicosiltransferase LafB - C577T (Arg193Trp) Regulador de transcrição [contendo domínio catalítico diacilglicerol quinase] - G842T (Gly281Val) Proteína da família de Dihidroxiacetona quinase - C239A (Ala80Glu)	8
18-2.7	7	Glicosiltransferase LafB C577T (Arg193Trp)	2
18-2.10	10	Glicosiltransferase LafB C577T (Arg193Trp) Uridina quinase C69A (Ser23Arg) Proteína da família de Dihidroxiacetona quinase 776_777insA (Val259fs)	16
18-3.6	6	Glicosiltransferase LafB C577T (Arg193Trp) Proteína da família de Dihidroxiacetona quinase G856T (Glu286*)	8

*Nome do gene anotado – bases que sofreram mutação com a respectiva localização (troca de aminoácido)

Como no experimento 3 foram detectados SNPs apenas no gene *lafB-like* e no *dhaK* da amostra resistente 18 – 3.6 e 18 - 3.10, o gene *lafB-like* das amostras 18-3.2; 18-3.3; 18-3.4 e 18-3.5 foi sequenciado pelo método de Sanger para verificar em qual dessas amostras este SNP aparecia primeiro. Para tal, foram sintetizados os *primers* LafB_R (XbaI) e LafB_F (KpnI) para amplificação da ORF completa e posterior sequenciamento. Os *primers* LafB2_F e LafB2_R também foram usados para complementar o sequenciamento de toda a ORF. Todos os *primers* usados estão compilados na Tabela 2 e 3 dos materiais e métodos. No experimento 3, o SNP C577T aparece primeiro na amostra 18-3.3 que é justamente a que apresenta um incremento significativo da CIM para 4 µg/mL.

Da mesma forma, foi investigado em qual amostra do experimento 3 ocorreu a mutação G856T em *dhaK*. As sequências realizadas pelo método de Sanger mostraram que a amostra 18-3.6 é a primeira a ter essa mutação no *dhaK* que é quando a CIM aumenta para 8 µg/mL.

4.7 Verificação do papel das mutações encontradas na resistência à daptomicina por superexpressão dos genes

A sequência do gene *lafB-like* foi amplificada da amostra 18-2.7 com os *primers* LafB_F (KpnI) e LafB_R (XbaI) (Tabela 3) para clonagem no vetor de alto número de cópias pAT28 e superexpressão na supersensível HBSJRP18, a fim de verificar se sua expressão normal poderia contribuir para o aumento da CIM para níveis maiores de sensibilidade à daptomicina. Pode-se observar que a superexpressão foi capaz de restaurar o fenótipo normal de sensibilidade à daptomicina, com CIM igual a 2 µg/mL, aumentando cerca de aproximadamente 30x o nível de resistência, ou seja, a mesma CIM observada na amostra HBSJRP18-2.7 (Tabela 8).

Tabela 8. Comparação da CIM da daptomicina após superexpressão dos genes clonados em pAT28.

Amostras	CIM ($\mu\text{g/mL}$)
HBSJRP18	0,06
HBSJRP18 + pAT28	0,125
HBSJRP18 + pAT28 + <i>lafB</i> 18-2.7	2
HBSJRP18 2.7	2
HBSJRP18-3.6	8
HBSJRP18-3.6 + pAT28	4
HBSJRP18-3.6 + pAT28 + <i>dhaK</i> _18	4

LafB foi descrito em *Listeria monocytogenes* e faz parte de sistema de duas enzimas responsáveis pela formação da âncora do ácido lipoteicóico (LTA): proteína A de formação de âncora do LTA (LafA) e proteína B de formação de âncora do LTA (LafB). Em *L. monocytogenes*, LafA e LafB são duas glicosiltransferases distintas necessárias para produzir monoglicosildiácilglicerol (Glc-DAG) e galactosilglucosildiácilglicerol (GalGlc-DAG), respectivamente (Webb *et al.*, 2009). Os homólogos destas enzimas em outras bactérias Gram-positivas já foram descritos (Figura 7) (Reichmann e Gründling, 2011).

Em *E. faecalis*, a glicosiltransferase BgsA (gene A de síntese de glicolípido associado a biofilme), que é homólogo à *L. monocytogenes* LafB, transfere a segunda glicose para galactosilglucosildiácilglicerol (Glc-DAG) usando UDP-glicose como substrato para produzir diglucosildiácilglicerol (Glc₂DAG), e BgsB (gene B de síntese de glicolípido associado a biofilme) é homólogo de *L. monocytogenes* LafA, a glicosiltransferase que sintetiza monoglicosildiácilglicerol (Glc-DAG) (Theilacker *et al.*, 2009; Reichmann e Gründling, 2011).

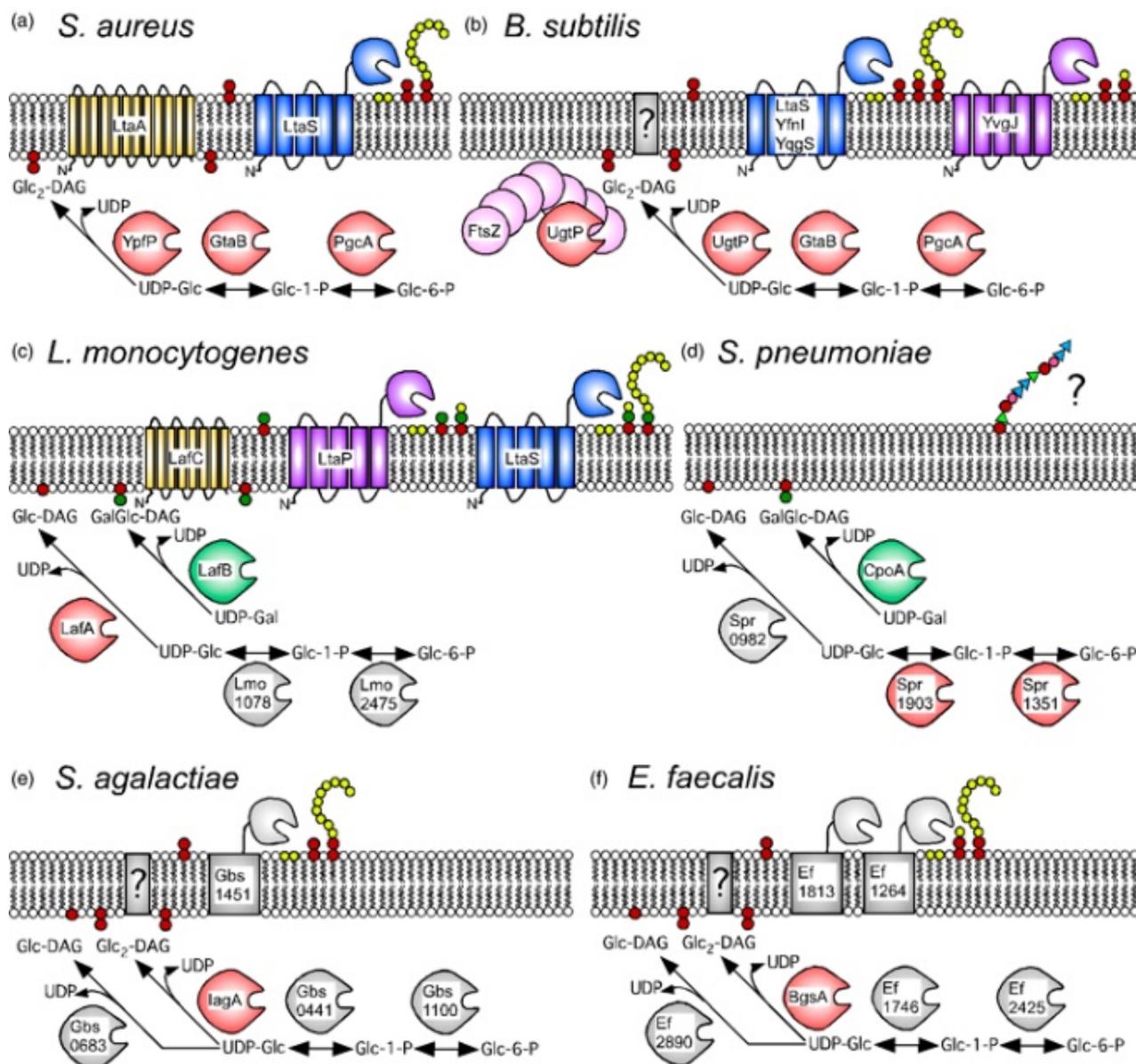


Figura 7. Enzimas requeridas para a síntese de glicolipídios e LTA em diferentes bactérias Gram-positivas. (a) *Staphylococcus aureus*, (b) *Bacillus subtilis*, (c) *L. monocytogenes*, (d) *Streptococcus pneumoniae*, (e) *Streptococcus agalactiae* e (f) *E. faecalis*. Fonte: REICHMANN e GRÜNDLING, 2011.

A daptomicina se liga com alta afinidade ao fosfatidilglicerol (PG) e a diminuição no conteúdo de PG está relacionado com a resistência à daptomicina como demonstrado em diversos estudos (HACHMANN et al., 2011; TAYLOR e PALMER, 2016). Em *B. subtilis*, a via de formação tanto do LTA quanto de fosfolipídios de membrana é bem conhecida (MATSUOKA, 2018). Na Figura 8, é possível visualizar a via de biossíntese de fosfolipídios, glicolipídios e do LTA em *B. subtilis*.

Com base na literatura, acredita-se que a linhagem supersensível estudada, não produza um LTA apropriado. Por apresentar uma mutação no gene *lafB*-like pode ser que possua uma âncora “defeituosa” contendo apenas MGlc-DAG, assim como o conteúdo dos fosfolipídeos comparado entre a supersensível e seus mutantes resistentes possam ser também diferentes.

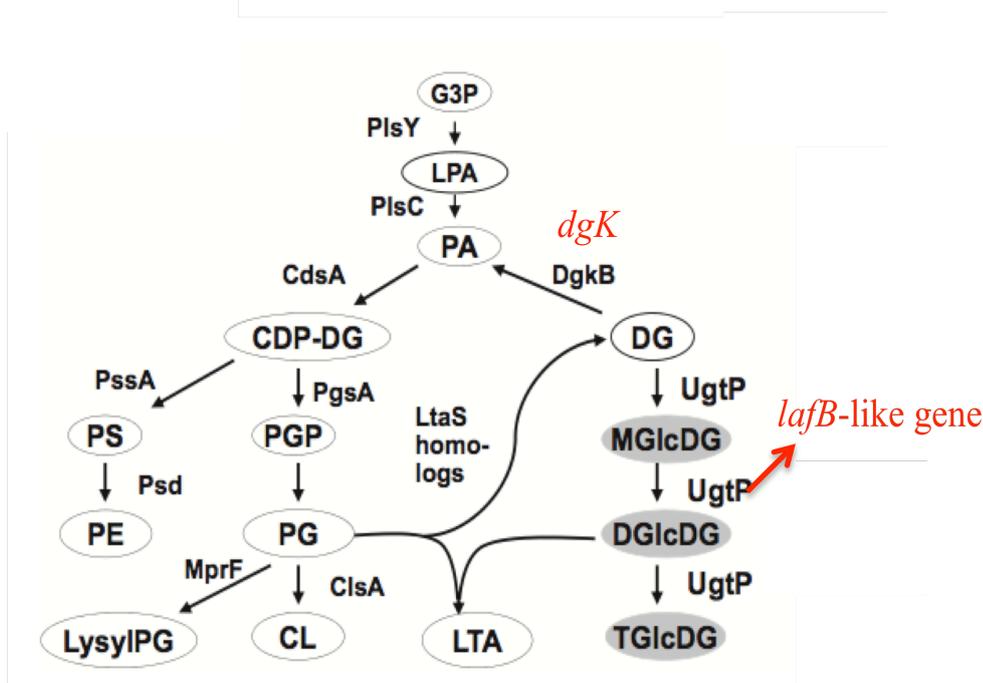


Figura 8. Via de biossíntese de fosfolipídios, glicolipídios e LTA em *B. subtilis*. Abreviações: G3P, glicerol-3-fosfato; LPA, ácido liso-fosfatídico; PA, ácido fosfatídico; CDP-DG, CDP-Diacilglicerol; PS, fosfatidilserina; PE, fosfatidiletanolamina; PGP, fosfatidilglicerofosfato; PG, fosfatidilglicerol; CL, cardiolipina; LysylPG, lisilfosfatidilglicerol; LTA, ácido lipoteicoico; DG, diacilglicerol; MGlcDG monoglicosildiácilglicerol; DGlcDG, diglicosildiácilglicerol; TGlcDG, triglicosildiácilglicerol. Alguns genes identificados na evolução dirigida à daptomicina em meio BHI foram marcados em vermelho na figura para ilustrar onde eles atuam na participação da formação do LTA e do PG. Fonte: Adaptado de MATSUOKA, 2018.

Pela primeira vez, até onde sabemos, demonstrou-se que a supersensibilidade à daptomicina em *E. faecium* pode ser alcançada com esse SNP no gene *lafB*-like que possivelmente é responsável por produzir a âncora do LTA. O gene *lafB*-like pode ser apontado como um alvo terapêutico interessante e merece ser melhor estudado. Deleções dos genes *bgsB* e *bgsA*, ocasionando à ausência de Glc₂DAG, em *E. faecalis* também foram associadas ao aumento da colonização e ligação a células uroepiteliais (DIEDERICH et al.,

2014). Semelhantes resultados foram relatados por Theilacker et al. (THEILACKER et al., 2015) que também revelaram uma interação entre a deleção de *bgsA* com uma melhor resposta inflamatória, como também na virulência em peritonite enterocócica. *E. faecium* HBSJRP18 é uma amostra clínica que foi isolada da urina de um paciente com infecção do trato urinário. A correlação entre a deleção dos genes da biossíntese de Glc₂DAG e a adesão bacteriana ainda precisa ser esclarecida, mas os dados da literatura sugerem que esse SNP pode ajudar no processo de infecção do trato urinário.

Quanto a clonagem do gene *dhaK*, optou-se por clonar *dhaK* da linhagem supersensível HBSJRP18, sem SNP, e superexpressar na linhagem resistente 18-3.6 pelo fato dela conter um *stop* códon neste gene. Com isso, seria possível verificar se a superexpressão do *dhaK* intacto contribui na diminuição da CIM. O gene foi então amplificado com os primers Dhak_F (KpnI) e Dhak_R (XbaI) (Tabela 3), purificado e ligado no vetor pAT28 para a superexpressão. Contudo, não foi possível verificar uma alteração significativa do valor da CIM de daptomicina após a clonagem em relação à CIM inicial (Tabela 8). Este gene está envolvido no processo metabólico anaeróbico do glicerol em bactérias (SUN et al., 2003). O metabolismo de glicerol é importante na via para a síntese de lípidos, ácidos teicóicos e lipoteicóicos em muitas bactérias Gram-positivas, incluindo *E. faecalis* (COYETTE e HANCOCK, 2002). Apesar das evidências demonstradas pela presença dos SNPs neste gene em todos os experimentos realizados, a superexpressão não revelou alteração, ou porque não é a melhor estratégia neste caso, ou porque esta alteração não tem papel na resistência. Em alguns casos, somente a deleção do gene pode revelar o seu papel, mas infelizmente não se conseguiu realizar esta técnica. Portanto, o papel do *dhaK* na resistência ainda permanece a ser esclarecido.

Até o momento, foi demonstrada uma nova via de resistência à daptomicina que foi chamada de via *lafB/dhaK*, apesar de faltar uma conclusão para o papel do *dhaK*. Por isso, as linhagens HBSJRP18, 18-2.7 e 18-3.6 foram selecionadas como representantes da nova via de resistência à daptomicina para os próximos testes.

Com o intuito de verificar se a resistência à daptomicina havia influenciado na sensibilidade de outros antibióticos, a ampicilina, vancomicina e polimixina B foram testadas. Os resultados estão apresentados na Tabela 9. Apenas o aumento de uma diluição para a CIM da vancomicina em relação a supersensível e seus mutantes apresentaram diferença.

Tabela 9. CIM realizada para comparar a sensibilidade da supersensível em relação aos seus mutantes.

Amostra	Daptomicina (µg/mL)	Vancomicina (µg/mL)	Ampicilina (µg/mL)	Polimixina B (µg/mL)
HBSJRP18	0,06	0,5	256	>256
HBSJRP18-2.7	2	1	256	>256
HBSJRP18-3.6	8	1	256	>256

4.8 Dose Resposta aos antibióticos

Foram testados os antibióticos previamente administrados no paciente do qual foi isolada a amostra HBSJRP18 que apresenta supersensibilidade à daptomicina. A inibição do crescimento para a maioria dos antibióticos foi igual tanto para a amostra HBSJRP18 quanto para HBSJRP18-2.7 (Tabela 10), somente para a colistina que a amostra HBSJRP 18 apresentou ser mais sensível do que a HBSJRP18-2.7.

Tabela 10. CIM realizada para comparar a sensibilidade da supersensível em relação ao seu mutante que possui a reversão da mutação em no gene *lafB*-like gene.

Amostra	Piperacilina (µg/mL)	Cefepima (µg/mL)	Colistina (µg/mL)	Ceftriaxone (µg/mL)	Ciprofloxacina (µg/mL)
HBSJRP18	4096*	> 2000	64	>10000	128
HBSJRP18-2.7	4096*	> 2000	256	>10000	128

*Na concentração de 2048 µg/mL de piperacilina a amostra HBSJRP18 apresenta um crescimento de 25% em relação a DO inicial, enquanto a amostra HBSJRP18-2.7 apresenta um crescimento de 8,12%.

Apesar de ambas as amostras apresentarem o mesmo valor de CIM para piperacilina, é possível notar que o gráfico normalizado abaixo (Figura 9) evidencia a diferença entre a porcentagem de crescimento entre amostra HBSJRP18 (a qual possui um maior crescimento na concentração de 2048 µg/mL) e amostra HBSJRP18-2.7.

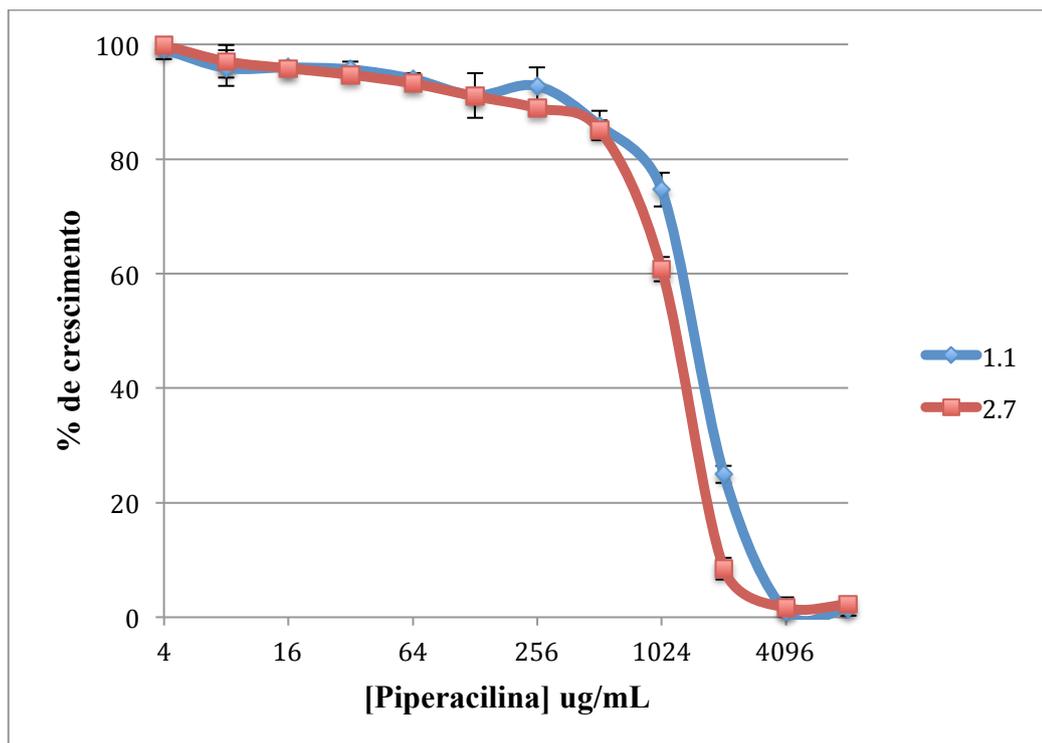


Figura 9. Gráfico normalizado com a porcentagem de crescimento em piperacilina. A amostra HBSJRP18 apresenta maior porcentagem de crescimento na concentração de 2048 ug/mL quando comparada com a amostra HBSJRP18-2.7.

Desta forma, o modo de leitura do resultado influencia no resultado da CIM, como a piperacilina é um antibiótico bactericida, deve ser considerado o valor da CIM quando há uma inibição 99,9% no crescimento, provavelmente à olho nu não seria possível visualizar os 8% de crescimento da HBSJRP18-2.7, assim a leitura da amostra HBSJRP18-2.7 seria uma CIM de 2048 $\mu\text{g/mL}$, enquanto a HBSJRP18 de 4096 $\mu\text{g/mL}$.

Portanto, foram realizadas curvas de crescimento com 1000 $\mu\text{g/mL}$ e 2000 $\mu\text{g/mL}$ de Piperacilina para ambas as amostras. Os dados mostraram que ambas as amostras possuem um crescimento muito parecido na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ de piperacilina (Figura 10). Contudo, na maior concentração (2000 $\mu\text{g/mL}$) a amostra HBSJRP18 tem claramente um melhor crescimento em relação a amostra HBSJRP18-2.7, mostrando uma maior resistência/tolerância à piperacilina na maior concentração (Figura 11).

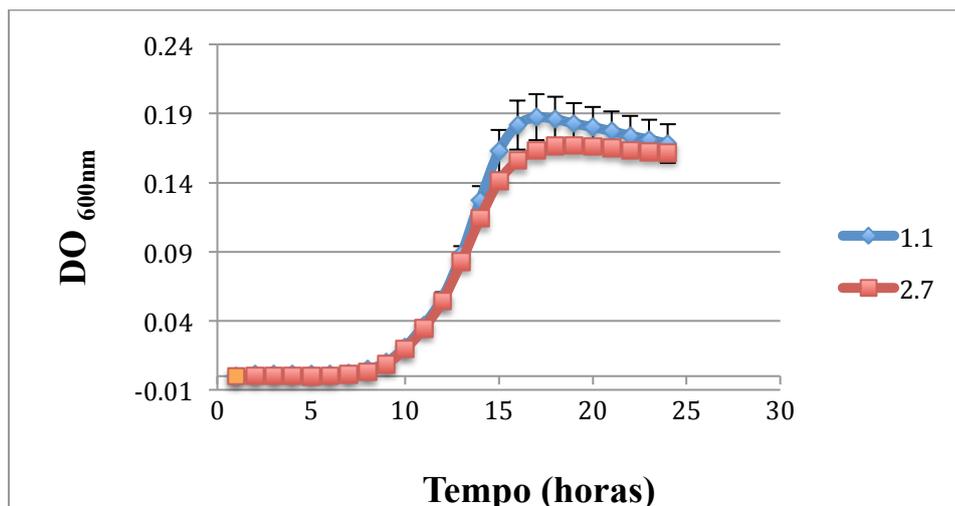


Figura 10. Crescimento das amostras HBSJRP18 e HBSJRP18-2.7 na concentração de 1000 µg/mL de piperacilina. Na concentração de 1000 µg/mL de piperacilina não é possível verificar uma diferença muito evidente entre as amostras comparadas.

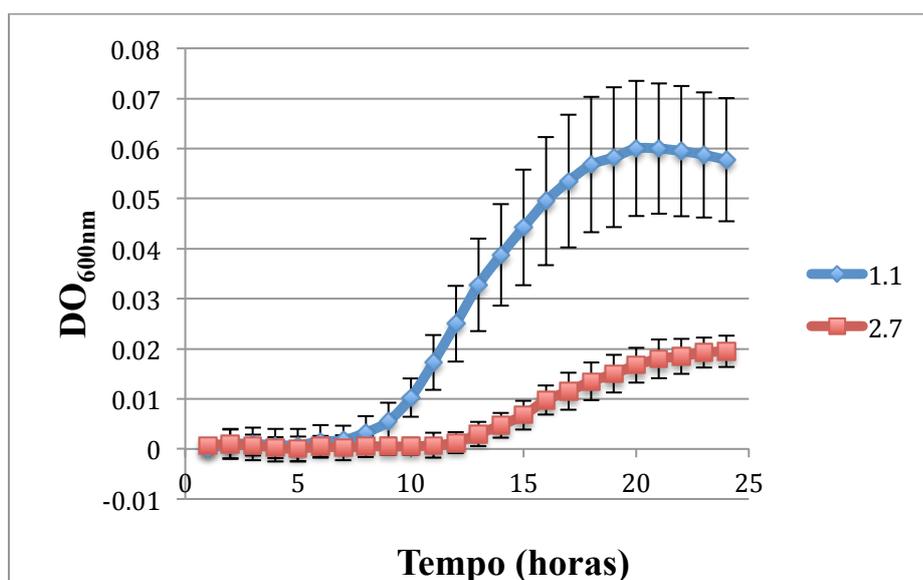


Figura 11. Crescimento das amostras HBSJRP18 e HBSJRP18-2.7 na concentração de 2000 µg/mL de piperacilina.

Como a amostra HBSJRP18-2.7 possui a reversão da mutação no gene *lafB*-like, supomos que a piperacilina possa ser considerado um forte candidato como responsável por selecionar *in vivo* a mutação única encontrada na amostra supersensível HBSJRP18 resultando em um efeito “colateral” de sensibilidade à daptomicina.

4.9 Análise de genoma das amostras selecionadas *in vitro* em BHI e ácido oleico

Após 11 dias consecutivos de passagens seriadas, obteve-se amostras resistentes à daptomicina. Para cada experimento, foram escolhidas amostras para que o genoma fosse sequenciado de acordo com aumento da CIM. A cobertura e número de *contigs* de cada amostra sequenciada se encontram na Tabela 11.

Tabela 11. Análise dos genomas quanto à cobertura e número de *contigs*.

Amostras	Cobertura	Número de <i>contigs</i>
<i>E. faecium</i> HBSJRP18-A1	201x	158
18-A2	170x	157
18-A5	96.8x	162
18-A11	198.6x	158
<i>E. faecium</i> HBSJRP18-B1	87.5x	169
18-B2	269.5x	161
18-B3	118.6x	160
18-B5	178.6x	156
18-B8	70x	171
18-B9	345.5x	154
18-B11	257.7	156
<i>E. faecium</i> HBSJRP18-C1	217.8x	163
18-C2	204.7x	162
18-C5	189.5x	159
18-C8	161x	168
18-C11	159x	167

Os resultados das comparações genômicas do isolado supersensível HBSJRP18 à daptomicina e seus mutantes estão descritos na Tabela 12.

Podemos verificar que nos três experimentos a primeira etapa foi a mesma reversão mutação encontrada nas amostras da evolução dirigida *in vitro* (Arg193Trp) no gene *lafB*-like. E em comum também nos três experimentos observamos em amostras que possuem um maior valor de CIM, mutações no gene da cardiolipina sintetase, que já foi previamente associada à resistência à daptomicina (DIAZ et al., 2014).

Tabela 12. Mutações não-sinônimas encontradas na evolução dirigida com ácido oleico.

Linagem	Dia de obtenção	Mutações encontradas*	CIM (µg/mL)
HBSJRP18			0,06
18-A2	2	Glycosyltransferase LafB C577T (Arg193Trp)	4
18-A5	5	Glycosyltransferase LafB C577T (Arg193Trp)	8
18-A11	11	Glycosyltransferase LafB C577T (Arg193Trp) Cardiolipin synthetase G253A (Arg218Gln)	32
18-B2	2	Glycosyltransferase LafB C577T (Arg193Trp) Hypothetical protein T153A (Leu51Phe)	2
18-B3	3	Glycosyltransferase LafB C577T (Arg193Trp) Hypothetical protein T153A (Leu51Phe)	4
18-B5	5	Glycosyltransferase LafB C577T (Arg193Trp) Hypothetical protein T153A (Leu51Phe) Excinuclease ABC subunit A A448G (Ile150Val)	8
18-B8	8	Glycosyltransferase LafB C577T (Arg193Trp) Cardiolipin synthetase G253A (Arg218Gln) Hypothetical protein T153A (Leu51Phe) Glycosyltransferase LafB C577T (Arg193Trp) Cardiolipin synthetase T110C (Val37Ala) Hypothetical protein T153A (Leu51Phe) Transposase G433A (Ala145Thr) Ribossomal RNA small subunit methyltransferase G475A (Ala159Thr) Asparaginyl-tRNA synthetase G785A (Gly262Glu) Sortase family protein T212C (Leu71Ser) phosphosugar-binding transcriptional regulator/ RpiR G577A (Val193Met) Phosphate regulon sensor protein PhoR A116G (Gln39Arg)	16
18-B9	9	D,D-heptose 1,7-bisphosphate phosphatase A197G (Asp66Gly) Ribonuclease HII A209G (His70Arg) 30S ribosomal protein S2 G625A (Ser209Thr) Nitrilotriacetate monooxygenase component B G161A (Arg54Gln) ATP-dependent DNA helicase IV G841A (Gly281Ser) DNA invertase Pin G466A (Ala156Thr) 6-phospho-beta-glucosidase A1354G (Thr452Ala) DNA pol III alfa subunit 3809 C>T (Ser1270Leu) NADH peroxidase 261delA (Val88fs) possible ATPase 1465insT (Asp489*) DNA mismatch repair protein MutL G913A (Glu305*)	32

Continuação da Tabela 12

Linagem	Dia de obtenção	Mutações encontradas*	CIM (µg/mL)
18-B11	11	Glycosyltransferase LafB C577T (Arg193Trp) Cardiolipin synthetase T110C (Val37Ala) 30S ribosomal protein S2 G610A (Asp204Asn) Amidohydrolase A346G (Ile116Val) Glycosyltransferase LafA C185T (Ser62Phe) ABC transporter permease C380T (Ser127Phe) v-type ATP synthase subunit I C1598T (Ala533Val) Type-1 restriction- modification system, restriction subunit R C2402T (Ser801Phe) Possible ATPase 1465insT (Asp 489*) DNA mismatch repair protein MutL G913A (Glu305*) Carboxymethylenebutenolidase- related protein/thioesterase 137 insA (Glu54*) Foldase PrsA precursor 184delA (62 stop codon)	64
18-C2	2	Glycosyltransferase LafB C577T (Arg193Trp)	4
18-C5	5	Glycosyltransferase LafB C577T (Arg193Trp)	8
18-C8	8	Glycosyltransferase LafB C577T (Arg193Trp) Cardiolipin synthetase G644A (His215Arg)	16
18-C11	11	Transcriptional activator tipA 440 delA (Lys147fs) Glycosyltransferase LafB C577T (Arg193Trp) Cardiolipin synthetase G644A (His215Arg) 5-dehydro-2-deoxygluconokinase G775A (Asp259Asn) Galactokinase G1132A (Val378Ile) Ferrous iron transport protein A A254G (Gln85Arg) Transcriptional activator tipA 440 delA (Lys147fs) ABC transporter substrate-binding protein 345delA (Lys115fs) HD family hidrolase 166insA (Trp56fs)	64

No experimento B, inúmeras mutações aparecem na amostra B9, provavelmente devido a uma mutação em uma proteína de reparo do DNA que propiciou o surgimento de mutações que não estejam correlacionadas com a resistência à daptomicina.

Resta ainda verificar o papel das outras mutações que possivelmente levam à novas vias de resistência à daptomicina.

4.10 Análise de genoma das amostras clínicas

A linhagem supersensível *E. faecium* HBJSRP18 foi utilizada como referência para identificação de SNPs presentes nas amostras clínicas resistentes quando comparados com os genes previamente associados à resistência à daptomicina.

As sequências dos genes *liaF*, *liaS*, *liaR*, assim como o gene *dhaK* (identificado na evolução dirigida *in vitro*), eram iguais entre a linhagem supersensível *E. faecium* HBJSRP18 e a *E. faecium* DO (também conhecida como TX0016, a primeira linhagem de *E. faecium* a ter o genoma completo sequenciado). As mutações identificadas estão descritas na Tabela 13. Todos os isolados clínicos resistentes apresentaram as mesmas mutações, contudo nenhuma das mutações são as relacionadas previamente com a resistência à daptomicina.

As amostras clínicas resistentes apresentaram um SNP (T1019C) no gene *dhaK* que leva à alteração de aminoácido (Ile340Thr), quando comparadas com a supersensível. Não foi encontrado nenhum SNP em outros genes previamente descritos. A mesma reversão da mutação encontrada nas amostras da evolução dirigida *in vitro* (Arg193Trp) no gene *lafB*-like foi observada tanto nas amostras clínicas resistentes quanto na *E. faecium* DO e em todos os genomas disponíveis no NCBI, como mencionado anteriormente.

Tabela 13. Polimorfismos encontrados em genes conhecidos por afetar a resistência à daptomicina em *E. faecium*.

Gene	Modificação de aminoácido
<i>liaF</i>	His47Tyr
	Ala78Val
	Phe80Leu
	Ile111Val
	Val148Ile
	Tyr216Cys
	Ile 235Val
<i>lias</i>	Lys3Arg
	Arg6Lys
	Leu56Met
	Thr76Ala
	Leu99His
	Leu100Gln
	Lys116Met
	Val135Met
	Glu152 Lys
	Asp250Glu
Ser257Thr	
Ile346Thr	
<i>liaR</i>	Thr45Ala
	Glu75Lys
	Glu142Asp

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados deste trabalho, pode-se concluir:

- A mutação no gene *lafB-like* é responsável pela supersensibilidade à daptomicina, podendo ser um potencial alvo terapêutico.
- Até o momento, foi demonstrada uma nova via de resistência à daptomicina que foi chamada de via *lafB/dhaK*.
- Foi encontrada uma disseminação de um clone de *E. faecium* resistente de alto risco resistente a vancomicina e a daptomicina, apesar do fato de a daptomicina não ter sido ainda utilizada no hospital.
- Embora infecções causadas por enterococos resistentes à vancomicina e enterococos resistentes à daptomicina sejam cada vez mais difíceis de se tratar, algumas alternativas terapêuticas permanecem viáveis. Tanto tigeciclina como linezolida podem ser indicados com base nos testes *in vitro* realizados neste trabalho. Tedizolida foi recentemente aprovada para uso no Brasil e apresentou potencial para ser eficaz.

6. PERSPECTIVAS

Como visto no decorrer deste trabalho, o estudo de novas vias de resistência à daptomicina fornece informações importantes que podem ser cruciais para o desenvolvimento de novos fármacos que são urgentemente necessárias na atual situação mundial em que se encontra a resistência antimicrobiana.

Como perspectivas futuras a partir deste estudo, ainda resta a elucidação do papel do *dhaK* na resistência à daptomicina, assim como identificar possíveis novas vias obtidas pela evolução dirigida *in vitro* em BHI com ácido oleico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS CONSULTADAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução N° 174. Brasília, N° 179, de 18 de setembro de 2017. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_174_2017_.pdf/81f8ec51-3db9-42b7-9ed8-0e30586430c3>

ARIAS, C. A. et al. Management of multidrug-resistant enterococcal infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 6, p. 555-562, 2010.

ARIAS, C. A. et al. Genetic Basis for In Vivo Daptomycin Resistance in Enterococci. **N Engl J Med**, v. 365, n. 10, p. 892-900, 2011.

ARIAS, C. A.; MURRAY, B. E. The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. **Nat Rev Microbiol**, v. 10, n. 4, p. 266-78, 2012.

BOUCHER, H. W. et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis**, v. 48, n. 1, p. 1-12, 2009.

CATTOIR, V.; LECLERCQ, R. Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: is it time to divorce? **J Antimicrob Chemother**, v. 68, n. 4, p. 731-42, 2013.

CLSI Publishes New Antimicrobial Susceptibility Testing Standards - CLSI. 2018. Disponível em: <<http://www.facm.ucl.ac.be/intranet/CLSI/CLSI-2018-M100-S28-unlocked.pdf>>. Acesso em: 2 jun. 2018.

DA SILVA, L. M.; NUNES SALGADO, H. R. Tigecycline: a review of properties, applications, and analytical methods. **Ther Drug Monit**, v. 32, n. 3, p. 282-8, 2010.

DA SILVA, L. P. et al. Genetic features and molecular epidemiology of Enterococcus faecium isolated in two university hospitals in Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 74, n. 3, p. 267-71, 2012.

DE MELLO, S. S. et al. High-Quality Draft Genome Sequence of the Multidrug-Resistant Clinical Isolate Enterococcus faecium VRE16. **Genome Announc**, v.4, 2016.

DEPARDIEU, F.; PERICHON, B.; COURVALIN, P. Detection of the van Alphabet and Identification of Enterococci and Staphylococci at the Species Level by Multiplex PCR. **J Clin Microbiol**, v.42, p.5857-60, 2004.

DIAZ, L. et al. Whole-Genome Analyses of Enterococcus faecium Isolates with Diverse Daptomycin MICs. **Antimicrob Agents Chemother**, v.58, p.4527-34, 2014.

DIEDERICH, A. K. et al. Role of glycolipids in the pathogenesis of Enterococcus faecalis urinary tract infection. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e96295, 2014.

EUCAST: The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2018. Disponível em:

<http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_8.1_Breakpoint_Tables.pdf>. Acesso em 2 jun. 2018.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. **Microbiology**, v. 155, n. Pt 6, p. 1749-57, 2009.

GIRAFFA, G. Enterococci from foods. **FEMS Microbiol Rev**, v. 26, n. 2, p. 163-71, 2002.

GOLD, H. S. Vancomycin-resistant enterococci: mechanisms and clinical observations. **Clin Infect Dis**, v. 33, n. 2, p. 210-9, 2001.

HACHMANN, A. B. et al. Reduction in Membrane Phosphatidylglycerol Content Leads to Daptomycin Resistance in Bacillus subtilis. **Antimicrob Agents Chemother**, v.55, 2011.

HALL, B. G. et al. Growth Rates Made Easy. **Molecular Biology and Evolution**, v. 31, n. 1, p. 232-238, 2014.

HARP, J. R. et al. Exogenous Fatty Acids Protect Enterococcus faecalis from Daptomycin-Induced Membrane Stress Independently of the Response Regulator LiaR. **Appl Environ Microbiol**, v. 82, n. 14, p. 4410-4420, 2016.

JORDAN, S. et al. LiaRS-dependent gene expression is embedded in transition state regulation in Bacillus subtilis. **Microbiology**, v. 153, n. Pt 8, p. 2530-40, 2007.

LEACH, K. L. et al. The Site of Action of Oxazolidinone Antibiotics in Living Bacteria and in Human Mitochondria. **Molecular Cell**, v. 26, n. 3, p. 393-402, 2007.

LEAVIS, H. L.; BONTEN, M. J.; WILLEMS, R. J. Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance. **Curr Opin Microbiol**, v. 9, n. 5, p. 454-60, 2006.

LEBRETON, F. et al. Emergence of epidemic multidrug-resistant Enterococcus faecium from animal and commensal strains. **MBio**, v. 4, n. 4, 2013.

Lebreton F, Willems RJL, Gilmore MS. Enterococcus Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. 2014. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, et al., editors. Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014-.Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190427/>

MATONO, T. et al. Emergence of a daptomycin-non-susceptible Enterococcus faecium strain that encodes mutations in DNA repair genes after high-dose daptomycin therapy. **BMC Res Notes**, v. 9, p. 197, 2016.

MATSUOKA, S. Biological functions of glucolipids in Bacillus subtilis. **Genes Genet Syst**, v. 92, n. 5, p. 217-221, 2018.

MCDUGAL, L. K. et al. Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant Staphylococcus aureus isolates from the United States: establishing a national database. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 11, p. 5113-20, 2003.

MERLO, T. P.; DABUL, A. N.; CAMARGO, I. L. Different VanA Elements in *E. faecalis* and in *E. faecium* Suggest at Least Two Origins of Tn1546 Among VRE in a Brazilian Hospital. **Microb Drug Resist**, v. 21, n. 3, p. 320-8, 2015.

MILLER, W. R.; BAYER, A. S.; ARIAS, C. A. Mechanism of Action and Resistance to Daptomycin in *Staphylococcus aureus* and Enterococci. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 6, n. 11, 2016.

MOELLERING, R. C. Linezolid: the first oxazolidinone antimicrobial. **Ann Intern Med**, v. 138, n. 2, p. 135-42, 2003.

MUNITA, J. M. et al. Failure of High-Dose Daptomycin for Bacteremia Caused by Daptomycin-Susceptible *Enterococcus faecium* Harboring LiaSR Substitutions. **Clin Infect Dis**, v.59, p.1277-80, 2014.

PALAZZO, I. C.; REHDER, A.; DARINI, A. L. Quantitative disk diffusion as a convenient method for determining minimum inhibitory concentrations of oxacillin for staphylococci strains. **J Microbiol Methods**, v. 71, n. 3, p. 186-90, 2007.

REICHMANN, N. T.; GRÜNDLING, A. Location, synthesis and function of glycolipids and polyglycerolphosphate lipoteichoic acid in Gram-positive bacteria of the phylum Firmicutes. **FEMS Microbiol Lett**, v. 319, n. 2, p. 97-105, 2011.

REYES, J. et al. A *liaR* deletion restores susceptibility to daptomycin and antimicrobial peptides in multidrug-resistant *Enterococcus faecalis*. **J Infect Dis**, v. 211, n. 8, p. 1317-25, 2015.

RICE, L. B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. **J Infect Dis**, v. 197, n. 8, p. 1079-81, 2008.

RUBINSTEIN, E.; KEYNAN, Y. Vancomycin-resistant enterococci. **Crit Care Clin**, v. 29, n. 4, p. 841-52, 2013.

SACRAMENTO, A. G. et al. Environmental dissemination of *vanA*-containing *Enterococcus faecium* strains belonging to hospital-associated clonal lineages. **J. Antimicrob Chemother**, v. 71, n. 1, p. 264-6, 2016.

SAHM, D. F. et al. In vitro susceptibility studies of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 33, n. 9, p. 1588-91, 1989.

SAITO, H. E.; HARP, J. R.; FOZO, E. M. Incorporation of Exogenous Fatty Acids Protects *Enterococcus faecalis* from Membrane-Damaging Agents. **Appl Environ Microbiol**, v.80, p.6527-38, 2014.

SAITO, H. E.; HARP, J. R.; FOZO, E. M. *Enterococcus faecalis* Responds to Individual Exogenous Fatty Acids Independently of Their Degree of Saturation or Chain Length. **Appl Environ Microbiol**, v.84, 2018.

SEPUTIENE, V. et al. Tigecycline - how powerful is it in the fight against antibiotic-resistant bacteria? **Medicina (Kaunas)**, v. 46, n. 4, p. 240-8, 2010.

SIMJEE, S. et al. Characterization of Tn1546 in Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Isolated from Canine Urinary Tract Infections: Evidence of Gene Exchange between Human and Animal Enterococci. **J Clin Microbiol**, v. 12, p. 4659-65, 2002.

SINEL, C. et al. Sequential steps of daptomycin resistance in *Enterococcus faecium* and reversion to hypersusceptibility through IS-mediated inactivation of the *liaFSR* operon. **J. Antimicrob Chemother**, v.71, n.10, p. 2793-7,2016.

SUN, J. et al. Comparative genomic analysis of *dha* regulon and related genes for anaerobic glycerol metabolism in bacteria. **Biotechnol Prog**, v. 19, n. 2, p. 263-72, 2003.

SZURMANT, H. et al. YycH and YycI Interact To Regulate the Essential YycFG Two-Component System in *Bacillus subtilis*. **J Bacteriol**, v.189, p.3280-9, 2007.

TAYLOR, S. D.; PALMER, M. The action mechanism of daptomycin. **Bioorg Med Chem**, v. 24, n. 24, p. 6253-6268, 2016.

TENOVER, F. C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J Clin Microbiol**, v. 33, n. 9, p. 2233-9, 1995.

THEILACKER, C. et al. *Enterococcus faecalis* Glycolipids Modulate Lipoprotein-Content of the Bacterial Cell Membrane and Host Immune Response. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0132949, 2015.

THEILACKER, C. et al. Glycolipids are involved in biofilm accumulation and prolonged bacteraemia in *Enterococcus faecalis*. **Mol Microbiol**, v. 71, n. 4, p. 1055-69, 2009.

TRAN, T. T.; MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of drug resistance: daptomycin resistance. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1354, p. 32-53, 2015.

TRIEU-CUOT, P. et al. A pair of mobilizable shuttle vectors conferring resistance to spectinomycin for molecular cloning in *Escherichia coli* and in Gram-positive bacteria. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 14, p. 4296-4296, 1990.

WANG, G. et al. Identification of a novel clone, ST736, among *Enterococcus faecium* clinical isolates and its association with daptomycin nonsusceptibility. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 8, p. 4848-54, 2014.

WEBB, A. J.; KARATSA-DODGSON, M.; GRUNDLING, A. Two-enzyme systems for glycolipid and polyglycerolphosphate lipoteichoic acid synthesis in *Listeria monocytogenes*. **Mol Microbiol**, v. 74, n. 2, p. 299-314, 2009.

WERNER, G.; STROMMENGER, B.; WITTE, W. Acquired vancomycin resistance in clinically relevant pathogens. **Future Microbiol**, v. 3, n. 5, p. 547-62, 2008.

WHO | WHO Model Lists of Essential Medicines. **WHO**, 2017-Disponível em: <<http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/>>.