

Título em Português: CARACTERIZAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DE Enterococcus RESISTENTES À VANCOMICINA

Título em Inglês: characterization of virulence factors of enterococcus resistant to vancomycin

Autor: Luciana Roberta Torini de Souza

Instituição: Universidade de São Paulo

Unidade: Instituto de Física de São Carlos

Orientador: Ilana Lopes Baratella da Cunha Camargo

Área de Pesquisa / SubÁrea: Microbiologia Aplicada

Agência Financiadora: CNPq - PIBIC

CARACTERIZAÇÃO DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Enterococcus* RESISTENTES À VANCOMICINA

Aluna: Luciana R. Torini de Souza

Orientadora: Prof.^a Dra. Ilana Lopes Baratella da Cunha Camargo

Universidade de São Paulo (USP)

lucianatorini@usp.br

Objetivos

Enterococcus faecalis resistentes à vancomicina (VRE) têm se revelado uma constante ameaça de vida em todo o mundo devido à alta taxa de mortalidade e os crescentes casos de surtos hospitalares. Objetivamos realizar a caracterização fenotípica incluindo a capacidade de hemólise e produção de gelatinase, além da caracterização genotípica para detecção dos genes de virulência: *gelE*, *cylL*, *esp*, *eriA* e *acm* através de reação em cadeia da polimerase.

Métodos e Procedimentos

Incluimos neste estudo 25 isolados de *Enterococcus faecalis* provenientes de uma coleção bacteriana de um laboratório de análises clínicas do estado de Minas Gerais. Inicialmente analisamos a concentração inibitória mínima (CIM) de vancomicina seguindo as recomendações da ISO 20776-1 e os resultados foram interpretados de acordo com a determinação do BrCAST, que indica que o ponto de corte para *Enterococcus* spp. é < 4 mg/L. Realizamos a extração do DNA genômico de forma mecânica e amplificamos os genes de interesse através de PCR, utilizando *primers* específicos, seguido de eletroforese em gel de agarose. A identificação de hemolisina foi realizada através de leitura visual do cultivo em BHI ágar suplementado com 5% de sangue humano. A identificação da hidrólise da proteína do leite foi realizada em meio de cultura a base de leite desnatado, de

forma que os isolados foram semeados e a leitura foi realizada de forma visual, onde o halo transparente ao redor das colônias indica que a bactéria possui as enzimas necessárias para hidrolisar caseína.

Resultados

Verificamos que dos 25 isolados analisados, 88% são do tipo β -hemolítico, ou seja, são capazes de lisar eritrócitos, 8% são α -hemolítico, capazes de lisar parcialmente eritrócitos e 4% γ -hemolítico, não capazes de lisar eritrócitos. Verificamos que 100% dos isolados possuem proteases responsáveis pela hidrólise da caseína.

Nenhum dos isolados possui o gene *esp* que auxilia na produção de biofilmes nem o gene *acm* que auxilia na aderência dos microrganismos ao tecido hospedeiro. O gene *gelE* foi o mais encontrado em nosso estudo, presente em 96% dos isolados. Este gene é capaz de promover nutrientes peptídeos ao organismo bacteriano, e de causar danos ao tecido do hospedeiro hidrolisando gelatina, colágeno, caseína, hemoglobina e outros peptídeos. Além disso, é um gene que está envolvido na ativação de autolisinas dos *Enterococcus* e no desenvolvimento de biofilmes.

Citolisina é uma toxina β -hemolítica, capaz de lisar eritrócitos humanos e os genes relacionados à sua produção de citolisina são: *cylL*, *cylS*, *cylM*, *cylB*, *cylA* e *cylI*. O gene *cylL* e *cylS* codificam peptídeos que juntos constituem o componente *cylA*, responsável pela ativação das citolisinas. O gene *cylL*

estava presente em 88% dos isolados analisados, e o *cy_A* estava presente em 96% dos isolados analisados. Apenas o Isolado VRE8 teve ausência destes dois genes e foi exatamente o que não foi capaz de lisar hemácias em nosso teste fenotípico. Os isolados VRE 12 e VRE 15, apesar de possuírem os genes *cy_{LL}* e *cy_A*, apresentaram a lise parcial das hemácias. Acreditamos que algum gene de regulação ou mutações podem ter afetado a capacidade hemolítica ou que possa haver outra toxina agindo nestas amostras. Os isolados VRE 17 e VRE 21 foram capazes de lisar hemácias, mas não foi detectado o gene *cy_{LL}*. A presença de citolisinas é bastante preocupante uma vez que a presença dessa proteína está associada a um maior risco de desfecho terminal em pacientes com bacteremia enterocócica.

Por fim, o gene *elrA*, responsável por codificar a proteína A enterocócica, esteve presente em 68% dos isolados. Essa proteína é responsável por interagir com peptidoglicanos da parede celular e está relacionada à produção de citocina interleucina

Conclusões

Fármacos direcionados à inibição dos fatores de virulência podem ser desenvolvidos para diminuir os danos causados no paciente durante infecções causadas por microrganismos resistentes, mas para o desenvolvimento deste tipo de fármacos é essencial conhecer os mecanismos utilizados por microrganismos para causar infecções. Dentre os fatores estudados citolisina, codificada pelo gene *cy_L* e gelatinase, codificada pelo gene *gelE*, estão presentes na maioria dos isolados de *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina isolados na cidade de Minas Gerais. Sendo assim, nossos dados sugerem que terapias alternativas antivirulência baseada na inibição destes genes, poderiam minimizar consideravelmente a patogenicidade dos isolados deste estudo.

Agradecimentos

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC). CNPq; À Pró-Reitoria da Pesquisa e Inovação da USP; Ao Instituto de Física de São Carlos (IFSC) e ao laboratório LeMiMo.

Referências

Henrique, P. M., Palazzo, I. C. V., Zanella, R. C., & Darini, A. L. da C. (2008). Molecular characterization of enterococci harboring genotype and phenotype incongruence related to glycopeptide resistance isolated in Brazilian hospitals. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(3),301–305. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762008000300014>

Merlo, T. P., Dabul, A. N. G., & Camargo, I. L. B. C. (2015). Different *VanA* Elements in *E. faecalis* and in *E. faecium* Suggest at Least Two Origins of Tn 1546 Among VRE in a Brazilian Hospital. *Microbial Drug Resistance*, 21(3),320–328. <https://doi.org/10.1089/mdr.2014.0077>

Mundy, L. M., Sahm, D. F., & Gilmore, M. (2000). Relationships between Enterococcal Virulence and Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(4), 513–522. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.4.513>

CHARACTERIZATION OF VIRULENCE FACTORS OF *Enterococcus* RESISTANT TO VANCOMICIN

Luciana Roberta Torini de Souza

Supervisor: Ilana Lopes Baratella da Cunha Camargo

University of São Paulo (USP)

lucianatorini@usp.br

Objectives

Vancomycin resistant *Enterococcus faecalis* (VRE) has become a constant threat to life all over the world due to its high mortality rate and increasing cases of hospital outbreaks. We aim at carrying out phenotypic characterization, including hemolysis capacity and gelatinase production, as well as genotypic characterization to detect the virulence genes: *gelE*, *cyLL*, *esp*, *erlA* and *acm* through polymerase chain reaction.

Materials and Methods

This study includes 25 isolates of *Enterococcus faecalis* from a bacterial collection of a clinical analysis laboratory in the state of Minas Gerais. Initially, we analyzed the minimum inhibitory concentration (MIC) of vancomycin following the recommendations of ISO 20776-1 and the results were interpreted according to the BrCAST determination, which indicates that the cut-off point for *Enterococcus* spp. is < 4 mg/L. Genomic DNA was extracted mechanically, and the genes of interest were amplified by PCR using specific primers, followed by agarose gel electrophoresis. The hemolysin was identified by visual reading of the culture on BHI agar supplemented with 5% human blood. The identification of milk protein hydrolysis was carried out in skimmed milk-based culture medium, so that the isolates were seeded, and

the reading was carried out visually, where the transparent halo around the colonies indicates that the bacteria have the enzymes needed to hydrolyze casein.

Results

Among the 25 isolates analyzed, we found that 88% were of the β -hemolytic type, meaning they were capable of lysing red blood cells, 8% were α -hemolytic, capable of partial lysis of red blood cells, and 4% were γ -hemolytic, unable to lyse red blood cells. We also observed that 100% of the isolates possessed proteases responsible for the hydrolysis of casein.

None of the isolates possessed the *esp* gene, which assists in biofilm production, nor the *acm* gene, which aids in microbial adherence to host tissue. The *gelE* gene was the most commonly found in our study, present in 96% of the isolates. This gene is capable of promoting peptide nutrients to the bacterial organism and causing damage to host tissue by hydrolyzing gelatin, collagen, casein, hemoglobin, and other peptides. Furthermore, it is a gene involved in the activation of *Enterococcus* autolysins and in the development of biofilms.

A citolysin is a β -hemolytic toxin capable of lysing human erythrocytes, and the genes related to its production are: *cyLL*, *cyLL_S*, *cyLM*, *cyLB*, *cyLA*, and *cyLI*. The *cyLL* and *cyLL_S* genes code for peptides that together constitute the *cyLA* component, responsible for the activation of citolysins. The *cyLL* gene was present in

88% of the isolates analyzed, and *cyIA* was present in 96% of the isolates analyzed. Only isolate VRE8 lacks these two genes, and it is the one that could not lyse red blood cells in our phenotypic test. Isolates VRE 12 and VRE 15, despite having the *cyLL* and *cyIA* genes, exhibits partial hemolysis of erythrocytes. We believe that some regulatory genes or mutations may have affected the hemolytic capacity, or there may be another toxin at play in these samples. Isolates VRE 17 and VRE 21 were able to lyse erythrocytes, but the *cyLL* gene was not detected. The presence of cytolytins is of great concern since the presence of this protein is associated with a higher risk of adverse outcomes in patients with enterococcal bacteremia.

Finally, the *elrA* gene, responsible for encoding the enterococcal A protein, was present in 68% of the isolates. This protein is responsible for interacting with peptidoglycans in the cell wall and is related to the production of the cytokine interleucine.

Conclusions

Drugs targeted at inhibiting virulence factors can be developed to reduce the damage caused to patients during infections caused by resistant microorganisms, but for the development of such drugs, it is essential to understand the mechanisms used by microorganisms to cause infections. Among the factors studied, cytolytin, encoded by the *cyL* gene, and gelatinase, encoded by the *gelE* gene, are present in the majority of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* isolates obtained in the city of Minas Gerais. Therefore, our data suggest that alternative antivirulence therapies based on the inhibition of these genes could significantly reduce the pathogenicity of the isolates in this study.

Acknowledgements

To the Institutional Program for Scientific Initiation Scholarships (PIBIC) - CNPq; to the Pro-Rectorate for Research and Innovation at USP; To the Institute of Physics of São Carlos (IFSC); and to the LeMiMo laboratory

References

Henrique, P. M., Palazzo, I. C. V., Zanella, R. C., & Darini, A. L. da C. (2008). Molecular characterization of enterococci harboring genotype and phenotype incongruence related to glycopeptide resistance isolated in Brazilian hospitals. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(3),301–305. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762008000300014>

Merlo, T. P., Dabul, A. N. G., & Camargo, I. L. B. C. (2015). Different *VanA* Elements in *E. faecalis* and in *E. faecium* Suggest at Least Two Origins of Tn 1546 Among VRE in a Brazilian Hospital. *Microbial Drug Resistance*, 21(3),320–328. <https://doi.org/10.1089/mdr.2014.0077>

Mundy, L. M., Sahm, D. F., & Gilmore, M. (2000). Relationships between Enterococcal Virulence and Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(4), 513–522. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.4.513>