PÂMELA PONTES PENAS

**TIPAGEM DE *Enterococcus faecalis* ISOLADOS DE
INFECÇÕES ENDODÔNTICAS E SISTÊMICAS E SUA
CORRELAÇÃO COM OS GENES DE VIRULÊNCIA**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Microbiologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para a
obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

SÃO PAULO
2013

PÂMELA PONTES PENAS

**TIPAGEM DE *Enterococcus faecalis* ISOLADOS DE
INFECÇÕES ENDODÔNTICAS E SISTÊMICAS E SUA
CORRELAÇÃO COM OS GENES DE VIRULÊNCIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador (a): Profa. Dra. Ericka
Tavares Pinheiro

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

SÃO PAULO
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Penas, Pâmela Pontes.

Tipagem de *Enterococcus faecalis* isolados de infecções endodônticas e sistêmicas e sua correlação com os genes de virulência / Pâmela Pontes Penas. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Ericka Tavares Pinheiro.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Fatores de virulência e resistência antimicrobiana de *Enterococcus faecalis*.

Versão do título para o inglês: Typing of *Enterococcus faecalis* isolated from endodontic and systemic infections and its correlation with the virulence genes.

1. *Enterococcus faecalis* 2. Virulência 3. Resistência antimicrobiana
4. Cápsula 5. Infecção endodôntica I. Pinheiro, Profa. Dra. Ericka
Tavares II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0115/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Pâmela Pontes Penas.

Título da Dissertação: Tipagem de *Enterococcus faecalis* isolados de infecções endodônticas e sistêmicas e sua correlação com os genes de virulência.

Orientador(a): Profa. Dra. Ericka Tavares Pinheiro.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

(☐) **Aprovado(a)**

(☐) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 05 de julho de 2011.

PARECER 1005/CEP

A Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB, nesta data, **APROVOU** o projeto intitulado: "*Tipagem de cepas de enterococcus faecalis isoladas de pacientes com infecção endodôntica e sua relação com os fatores de virulência*" sob responsabilidade de execução dos autores Profa. Dra. **MARCIA PINTO ALVES MAYER** e a aluna **PÂMELA PONTES PENAS**.

Cabe a pesquisadora executante elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX. 2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **05.07.2012**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Dedico este trabalho com muito amor e gratidão...

À Deus primeiramente. Sem Ele, eu nada seria.

À minha família, principalmente aos meus pais, Marcos Aristides Penas e Rosemary Pontes Penas, pelo exemplo, amor, apoio, paciência e incentivo que me deram até hoje para que eu chegasse até aqui. Devo a eles tudo o que sou!

Ao meu noivo Lucas Ruas Amado com muito amor, pelo incentivo, pela paciência, por me dar força e muito amor nos momentos difíceis.

Aos familiares e amigos por todo o apoio e incentivo que me deram para que eu conseguisse chegar até aqui.

Vocês souberam entender meus objetivos e me incentivaram para que eu cumprisse esta etapa com êxito. Sem a presença de cada um de vocês eu não teria conseguido...

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter concedido a mim a maravilhosa oportunidade da realização deste trabalho.

Agradeço a minha família pelo amor incondicional, compreensão, amparo e incentivo para que eu nunca desistisse dos meus sonhos, principalmente a finalização desta dissertação.

Agradeço a Universidade de São Paulo, ao Instituto de Ciências Biomédicas e ao departamento de Microbiologia, sempre com admiração e respeito.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro concedido.

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Ericka Tavares Pinheiro por ter confiado em mim e por ter ensinado-me tudo o que sabia para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço pela dedicação, sempre motivando-me na pesquisa científica e mostrando-me o que é ser um professor firme, capaz e íntegro. Agradeço não só pela parceria, mas também pela amizade.

Agradeço a Profa. Dra. Marcia Pinto Alves Mayer por ter aberto com tanto carinho as portas de seu laboratório, pela colaboração inestimável e por ter acreditado em mim desde o princípio. Com certeza será sempre um exemplo para mim.

Agradeço a Dra. Adriana C. Ribeiro por ter sido meu primeiro exemplo de uma orientação ímpar e a quem devo tudo o que aprendi quando iniciei minha carreira acadêmica. Agradeço pela colaboração e amizade.

Agradeço com muito carinho a todos os amigos do laboratório de microbiologia oral pela ajuda e amizade. Vocês tornaram minha caminhada mais leve e me mostraram o valor da amizade.

Agradeço por toda a ajuda e apoio técnico do Léo e João Paulo.

Agradeço a todos os professores e colegas do departamento de Microbiologia pela ajuda e por compartilharem os bons momentos.

Agradeço ao Henri Berghs pela ajuda com o Bionumerics, possibilitando maior facilidade na análise dos resultados desta dissertação.

Agradeço a secretaria de pós-graduação e do comitê de ética pelo apoio.

A todos que colaboraram e me ajudaram a realizar este trabalho

O meu sincero agradecimento!

RESUMO

PENAS, P. P. **Tipagem de *Enterococcus faecalis* isolados de infecções endodônticas e sistêmicas e sua correlação com os genes de virulência**. 2013. 75 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Enterococcus faecalis faz parte da microbiota gastrointestinal de mamíferos, mas é considerado uma importante causa de infecções hospitalares. Na cavidade oral, *E. faecalis* é comumente encontrado em canais de dentes com insucesso do tratamento endodôntico. Contudo, pouco é conhecido sobre a virulência de isolados endodônticos e sua relação genética com isolados de diferentes nichos. Os objetivos do presente estudo foram: investigar a relação genética entre linhagens isoladas de infecções endodônticas e sistêmicas, bem como sua correlação com marcadores de virulência e resistência antimicrobiana. As linhagens genéticas de 40 isolados clínicos de *E. faecalis* foram determinadas por *Multilocus sequence typing* (MLST), incluindo 21 isolados endodônticos e 19 de infecções sistêmicas. Clusters virulentos foram investigados por PCR quanto à presença dos seguintes determinantes genéticos: polimorfismo do operon da cápsula; genes da ilha de patogenicidade (*esp*, *cyl*, *gls24-like*, *nuc1*, *psaA* e *cbh*); outros genes de virulência (*ace*, *efaA*, *gelE* e *agg*); e marcadores de resistência antimicrobiana (*vanA*, *vanB*, *aac6'-aph2"*, *aph3'-IIIa*, *ant6-la*, *ermB*, *tetM*, *tetL*, *cat* e *blaZ*). A análise filogenética revelou que a maioria dos isolados de pacientes hospitalizados (63,1%) pertencia ao complexo clonal 2 (CC2), que é um cluster virulento conhecido como causador de surtos de infecções em vários países. Amostras do CC2 carregavam no mínimo 3 genes de resistência antimicrobiana e 4 genes da PAI simultaneamente. Essas amostras eram também produtoras de cápsula. Por outro lado, os isolados endodônticos eram, em sua maioria, cepas não-capsuladas e continham poucos genes de virulência e resistência antimicrobiana. Além disso, a maioria dos isolados endodônticos apresentava relação genética distante dos isolados de pacientes hospitalizados. Em particular, 42,8% dos isolados endodônticos pertenciam ao CC 25, um cluster que é frequentemente encontrado em amostras comensais e de alimentos. Por sua vez, os genes *ace* e *efaA* foram detectados em 100% dos isolados, independente da sua origem clínica; enquanto os genes *agg* e *gelE* foram detectados em sua maioria. Concluímos que *E. faecalis* isolados de infecções endodônticas apresentaram um perfil genético e de virulência diferente dos clusters patogênicos de pacientes hospitalizados, provavelmente devido a especialização ao nicho de colonização conferida principalmente por regiões variáveis no genoma.

Palavras-chave: *Enterococcus faecalis*. Virulência. Resistência antimicrobiana. Cápsula. Infecção endodôntica.

ABSTRACT

PENAS, P. P. **Typing of *Enterococcus faecalis* isolated from endodontic and systemic infections and its correlation with the virulence genes.** 2013. 75 p. Masters thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Enterococcus faecalis is part of the mammalian gastrointestinal microbiota, but it has been considered a leading cause of nosocomial infections. In the oral cavity, *E. faecalis* is commonly found in root canals of teeth with failed endodontic treatment. However, little is known on the virulence of endodontic isolates and their genetic relatedness with isolates from different niches. The aims of the present study were: to investigate the genetic relatedness among lineages isolated from endodontic and systemic infections, as well as their correlation with virulence and antibiotic resistance markers. The genetic lineages of 40 *E. faecalis* clinical isolates were determined by Multilocus sequence typing (MLST), including 21 endodontic and 19 systemic infections isolates. Virulent clusters were investigated by PCR for the presence of the following genetic determinants: capsular operon polymorphism; pathogenicity island genes (*esp*, *cyl*, *gls24-like*, *nuc1*, *psaA*, and *cbh*); other virulence genes (*ace*, *efaA*, *gelE*, and *agg*); and antibiotic resistance markers (*vanA*, *vanB*, *aac6'-aph2"*, *aph3'-IIIa*, *ant6-la*, *ermB*, *tetM*, *tetL*, *cat*, and *blaZ*). The phylogenetic analysis revealed that most hospitalized patients isolates (63.1%) belonged to clonal complex 2 (CC2), which is a known virulent cluster that has caused infection outbreaks in several countries. CC2 strains carried at least 3 antibiotic resistance genes and 4 PAI genes simultaneously. They were also capsule-producers strains. On the other hand, endodontic isolates were mostly non-capsulated strains, harboring few PAI and antimicrobial resistance genes. Moreover, most endodontic isolates were not closely related to *E. faecalis* isolates from hospitalized patients. In particular, 42.8% of the endodontic isolates belonged to CC25, a cluster often found in commensal and food samples. For instance, *ace* and *efaA* genes were detected in 100% of isolates, regardless of their clinical source; whereas *agg* and *gelE* were detected in their majority. We concluded that *E. faecalis* isolated from endodontic infections presented a different genetic and virulence profile of pathogenic clusters of hospitalized patients isolates, probably due to colonization niche specialization conferred mainly by variable regions in the genome.

Keywords: *Enterococcus faecalis*. Virulence. Antibiotic resistance. Capsule. Endodontic infection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Sequências dos iniciadores e condições de PCR utilizadas.....35

Figura 1 - Dendrograma baseado nos dados do MLST de 40 cepas de *E. faecalis*: 21 isolados endodônticos (RC) e 19 isolados médicos (M) de infecções sistêmicas e sua correlação com os genes de resistência antimicrobiana, genes da ilha de patogenicidade (PAI) e outros genes.....39

Figura 2 - A relação filogenética de 40 cepas de *E. faecalis* com análise dos complexos clonais (CC).....40

Figura 3 - Produtos de PCR dos 3 polimorfismos do operon da cápsula: um produto de amplificação de 950 pb de uma cepa CPS 1; um produto 1.098 pb indicando a presença do gene *cpsF*, característico de CPS 2; e um produto de 199 pb, indicando a presença *cpsE*, *cpsG* e a ausência de *cpsF*, características do polimorfismo CPS 5. M = peso molecular 100 pb.....43

Figura 4 - Distribuição dos tipos de polimorfismos do operon da cápsula (CPS); genes que conferem resistência antimicrobiana; genes da PAI e outros genes associados à virulência em 40 cepas de *E. faecalis*: 21 isolados endodônticos (RC) e 19 isolados médicos (M) de infecções sistêmicas.....43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Prevalência dos genes de virulência e resistência antimicrobiana entre 21 isolados endodônticos e 19 médicos.....	42
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL – microlitro

μM – micromolar

ATCC – *American Type Culture Collection*

BHI – Infusão de cérebro e coração (*brain heart Infusion*)

CC – complexo clonal

CPS – polimorfismo capsular (*capsular polymorphism*)

DLVs – *double locus variants* (variantes em dois loci)

DNA – Ácido desoxirribonucleico (deoxyribonucleic acid)

dNTP- desoxirribonucleotídeos trifosfato

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

HiRECC – complexos clonais enterocócicos de alto risco (*high-risk enterococcal clonal complexes*).

M – peso molecular

mg – miligrama

min – minuto

mL – mililitro

MLST – tipagem por sequenciamento de multilocus (*multilocus sequence typing*)

mM – milimolar

MSCRAMMs – componentes da superfície microbiana que reconhecem adesinas da matriz (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*)

nmol – nanomolar

ORFs – fases de leitura aberta (*open reading frames*)

PAI – Ilha de patogenicidade

pb – pares de base

PCR – reação em cadeia da polimerase

RPPs – proteínas de proteção ao ribossomo (*ribosome protection proteins*)

rRNA – ácido ribonucleico ribossomal

s – segundos

S – subunidades ribossomais de Svedberg

SLVs – *single locus variants* (variantes em um único locus)

ST – *sequence type*

TAE – Tris acetato EDTA

Taq DNA polimerase – DNA polimerase termoestável de *Thermus aquaticus*.

TE – Tris EDTA

UPGMA – *unweighted pair group method with arithmetic averages*

UV – Ultra violeta

VRE – enterococos resistentes à vancomicina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Fatores de virulência de <i>Enterococcus faecalis</i>	17
1.1.1	<i>Ilha de patogenicidade de Enterococcus faecalis</i>	<i>18</i>
1.1.2	<i>Outros genes associados à virulência de Enterococcus faecalis.....</i>	<i>21</i>
1.1.3	<i>O operon da cápsula de Enterococcus faecalis.....</i>	<i>24</i>
1.2	Resistência a antibióticos	24
2	OBJETIVOS.....	28
3	MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1	Cepas bacterianas	29
3.2	Sequenciamento parcial do gene <i>16S rRNA</i>.....	29
3.3	Detecção de genes de resistência antimicrobiana e de virulência	30
3.4	Análise do polimorfismo do operon <i>cps</i>.....	31
3.5	Tipagem por MLST.....	32
3.6	Análise estatística.....	33
4	RESULTADOS.....	38
5	DISCUSSÃO	44
6	CONCLUSÕES	52
	REFERÊNCIAS*	53
	APÊNDICES – Artigos de Periódicos.....	65

1 INTRODUÇÃO

Enterococos são micro-organismos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, com capacidade de crescer em condições extremas, como 6,5% de NaCl e pH elevado. Eram previamente descritos como micro-organismos comensais do trato intestinal de mamíferos de pouca importância clínica, mas emergiram como patógenos responsáveis por sérias infecções nosocomiais, incluindo endocardites, infecções do trato urinário, bacteremias, infecções de feridas cirúrgicas, meningites e infecções do trato biliar (HOLLENBECK; RICE, 2012; SOOD et al., 2008).

Enterococos são responsáveis por 12% de todas as infecções hospitalares, sendo considerado o terceiro grupo de patógenos nosocomiais mais comumente isolado (HIDRON et al., 2008). Embora mais de doze espécies diferentes possam estar associadas a doenças, a maioria das infecções enterocócicas em humanos é causada por *Enterococcus faecalis* (SOOD et al., 2008).

A habilidade de isolados de *E. faecalis* causarem infecções sérias está relacionada a fatores de virulência intrínsecos que permitem ao micro-organismo persistir em ambiente hospitalar e sobreviver a muitos mecanismos de defesa do hospedeiro, associada à aquisição de uma variedade de traços de virulência por transferência horizontal (MANSON; HANCOCK; GILMORE, 2010). Outro fato que contribui para patogenicidade de *E. faecalis* é a sua resistência à maioria dos antibióticos comumente utilizados no tratamento de infecções em ambientes hospitalares. Além de mecanismos de resistência intrínseca desse microrganismo a muitos antibióticos, a aquisição de genes pode conferir resistência à maioria dos antibióticos disponíveis atualmente (HOLLENBECK; RICE, 2012).

Na cavidade oral, *E. faecalis* é isolado em baixas taxas e em pequeno número na saliva de indivíduos saudáveis (SEDGLEY; LENNAN; CLEWELL, 2004). Entretanto, *E. faecalis* é frequentemente detectado em casos de insucesso endodôntico, ou seja, em canais radiculares de dentes com periodontites apicais crônicas persistentes após o tratamento endodôntico. Estudos prévios relataram uma prevalência de *E. faecalis* em 29% a 77% nesses casos (GOMES et al., 2008; GOMES et al., 2006; MOLANDER et al., 1998; PINHEIRO et al., 2003; ROCAS; JUNG; et al., 2004; ROCAS; SIQUEIRA; SANTOS, 2004; SIQUEIRA; ROCAS, 2004; SUNDQVIST et al., 1998; WANG et al., 2012; WILLIAMS et al., 2006; ZHANG et al., 2012) *E. faecalis* também tem sido isolado em periodontites

marginais, porém em menor prevalência quando comparado às periodontites apicais (SUN et al., 2009). Entretanto, apesar da alta prevalência, o papel de *E. faecalis* na etiologia dos insucessos endodônticos ainda é desconhecido (ANDERSON et al., 2012).

A alta prevalência de *E. faecalis* em canais radiculares de dentes tratados endodonticamente pode ser devida à sua resistência aos procedimentos de desinfecção utilizados durante a terapia endodôntica inicial, facilitando seu crescimento; ou ainda, à sua capacidade de invadir os canais radiculares durante ou após o tratamento endodôntico por micro-infiltração coronária, sendo capaz de sobreviver em ambientes com baixas concentrações de nutrientes (ANDERSON et al., 2012; ROCAS; SIQUEIRA; SANTOS, 2004). Uma possível fonte de enterococos é a contaminação dos canais radiculares por *E. faecalis* provenientes de alimentos em dentes sem selamento coronário adequado após o tratamento endodôntico (ZEHNDER; GUGGENHEIM, 2009). *E. faecalis* é comumente utilizado na fermentação de queijos ou presente em outros produtos alimentícios fermentados, como salsichas e azeitonas (JAMET et al., 2012). Esse micro-organismo é normalmente transiente na cavidade oral, mas pode invadir e colonizar os canais radiculares (ZEHNDER; GUGGENHEIM, 2009). Entretanto, a relação filogenética de *E. faecalis* isolados de canais radiculares com os de alimentos ainda não foi determinada, sendo necessários estudos para comprovar essa hipótese.

Para o estudo da estrutura populacional e epidemiologia de *E. faecalis*, foram desenvolvidos diferentes métodos moleculares de tipagem que variam entre si por seu caráter discriminatório e reprodutibilidade (COOPER; FEIL, 2004; RUIZ-GARBAJOSA et al., 2006). A técnica de *Multilocus sequence typing* (MLST) é baseada na análise de sequências nucleotídicas de genes de manutenção (*housekeeping*), nos quais é possível identificar variações alélicas e determinar a diversidade genética da população de interesse, análise da estrutura populacional e a realização de estudos epidemiológicos a curto e longo prazo (COOPER; FEIL, 2004; MAIDEN et al., 1998; RUIZ-GARBAJOSA et al., 2006). A vantagem dessa técnica é a reprodutibilidade, acuracidade e portabilidade dos dados das sequências, o que permite a comparação dos dados de diferentes laboratórios pela internet (URWIN; MAIDEN, 2003). O esquema desenvolvido para o estudo de cepas de *E. faecalis* foi padronizado por Ruiz-Garbajosa et al. (2006) e é realizado através da análise de fragmentos internos de 7 genes *housekeeping*.

Diversos estudos tem utilizado MLST para a análise de *E. faecalis* isolados de diversas fontes, tais como alimentos, animais, amostras ambientais e clínicas (BUHNIK-ROSENBLAU et al., 2013; JAMET et al., 2012; MCBRIDE et al., 2007; POULSEN et al., 2012; RATHNAYAKE; HARGREAVES; HUYGENS, 2011). Os dados de MLST podem revelar diferenças na preferência por certos nichos ou no potencial de virulência em infecções humanas através da identificação de complexos clonais (COOPER; FEIL, 2004). Estudos utilizando MLST definiram complexos clonais distintos de *E. faecalis* associados ao ambiente hospitalar, então chamados de complexos clonais enterocócicos de alto risco (*high-risk enterococcal clonal complexes* – HiRECC); são eles CC2, CC9, CC28, CC40 e CC87 (KAWALEC et al., 2007; RUIZ-GARBAJOSA et al., 2006). Essas linhagens genéticas específicas de infecções hospitalares também estavam associadas a vários traços de virulência e resistência a antibióticos, caracterizando linhagens patogênicas dentro da espécie (DJAHMI et al., 2012; LOPEZ et al., 2012; MCBRIDE et al., 2007; NALLAPAREDDY et al., 2002; NALLAPAREDDY et al., 2005; QUINONES; KOBAYASHI; NAGASHIMA, 2009).

O primeiro e único estudo encontrado na literatura que utilizou MLST para estabelecer a estrutura populacional de enterococos orais analisou principalmente isolados de doenças periodontais (SUN et al., 2009). Esses autores encontraram uma alta diversidade genética em enterococos subgengivais e a presença de marcadores de resistência antimicrobiana em 50% desses isolados, principalmente à tetraciclina. Entretanto, estudos das linhagens genéticas de *E. faecalis* presentes nas infecções endodônticas e sua correlação com fatores de virulência são escassos. Portanto, torna-se necessária uma investigação sobre a possível associação de linhagens genéticas específicas de *E. faecalis* a infecções endodônticas e suas características de virulência.

1.1 Fatores de virulência de *Enterococcus faecalis*

Pelo fato de *E. faecalis* ter surgido como um importante patógeno de infecções hospitalares nas três últimas décadas, os fatores de virulência de isolados nosocomiais têm sido amplamente estudados, embora pouco ainda se saiba sobre seus mecanismos de patogenicidade (DI ROSA et al., 2006; HASANI et al., 2012;

JOHANSSON; RASMUSSEN, 2013; MCBRIDE et al., 2007; SILVA et al., 2013). Por outro lado, informações sobre os fatores de virulência de cepas de *E. faecalis* isoladas de canais radiculares são limitadas e merecem maiores investigações (ANDERSON et al., 2012; REYNAUD AF GEIJERSSTAM et al., 2007; SEDGLEY et al., 2005; ZOLETTI et al., 2011).

1.1.1 Ilha de patogenicidade de *Enterococcus faecalis*

A virulência de um organismo é regulada por genes codificadores de fatores de virulência presentes no genoma, em especial em regiões denominadas ilhas de patogenicidade (PAI) (HACKER; KAPER, 2000). PAIs são elementos genéticos distintos encontrados em cromossomos bacterianos, adquiridos por transferência horizontal de genes, que codificam múltiplos fatores de virulência (GAL-MOR; FINLAY, 2006). Diversos dos fatores de virulência encontrados em *E. faecalis* fazem parte de sua PAI, que foi primeiramente identificada entre isolados clínicos resistentes a antibióticos (SHANKAR; BAGHDAYAN; GILMORE, 2002). Estudos genéticos mostraram que diversos elementos móveis adquiridos por transferência horizontal foram incorporados a PAI de *E. faecalis*, o que contribuiu para o aumento no potencial patogênico de certas linhagens (MCBRIDE et al., 2009). O conteúdo genético da PAI de *E. faecalis* é rico entre isolados de infecções hospitalares e compreende determinantes genéticos que são raros em isolados não derivados de infecções (MCBRIDE et al., 2009; MCBRIDE et al., 2007; SHANKAR et al., 2002). Portanto, foi sugerido que a PAI, ou partes dela, podem ser marcadores úteis para detecção de cepas patogênicas de enterococos (SHANKAR et al., 2002).

A PAI de *E. faecalis* codifica proteínas com funções diversas, incluindo proteínas com função conhecida ou potenciais fatores de virulência (MCBRIDE et al., 2009). McBride et al. (2007) estudaram 6 genes associados a virulência encontrados na PAI para identificar clusters virulentos em isolados hospitalares de *E. faecalis*: *esp* (proteína de superfície enterocócica), *cylA/B/M* (citolisina), *cbh* (hidrolase de sal biliar), *gls24-like* (proteína de resposta ao estresse), *nuc1* (homólogo a nuclease de estafilococos) e *psaA* (adesina homóloga a proteína A de superfície pneumocócica).

Shankar et al. (2002) mostraram que ao menos uma proteína encontrada na PAI, a proteína de superfície enterocócica (Esp), foi altamente associada a isolados

de *Enterococcus faecium* derivados de infecções. Essa proteína é codificada pelo gene *esp*, que está localizado na PAI e não foi descrita sua presença em nenhum outro elemento genético (MCBRIDE et al., 2009). Portanto, isolados de *E. faecalis* que contem *esp* evidenciam a presença da PAI nessas cepas. Esp é uma proteína encontrada tanto em *E. faecium* quanto em *E. faecalis* e é considerada um suposto fator de virulência envolvido na adesão, colonização, evasão do sistema imune e aparentemente cumpre um papel na resistência antimicrobiana (FISHER; PHILLIPS, 2009). Foi primeiramente descrita em um estudo realizado por Shankar et al. (1999), onde foi reportado que o gene *esp* é comumente encontrado em isolados de endocardites e bacteremias, mas raramente em isolados fecais. Esp também foi associada à formação de biofilme e colonização do trato urinário (LATASA et al., 2006; SHANKAR et al., 2001). Estudos mostraram que *esp* era frequentemente detectado em *E. faecalis* isolados de canais de dentes com periodontites apicais persistentes após o tratamento endodôntico (REYNAUD AF GEIJERSSTAM et al., 2007; SEDGLEY et al., 2005; ZOLETTI et al., 2011). A alta prevalência de *esp* entre isolados endodônticos sugere que Esp pode ser um importante traço de virulência que participa na colonização de canais radiculares.

Citolisina, antigamente chamada de hemolisina, é uma enzima expressa por vários isolados de *E. faecalis*. Entre as células alvo da citolisina estão: eritrócitos, macrófagos, neutrófilos e larga faixa de bactérias Gram-positivas (JETT; GILMORE, 1990; MIYAZAKI et al., 1993). Pode ser codificada pela PAI de *E. faecalis* ou por plasmídeos conjugativos (SHANKAR et al., 2002; SHANKAR et al., 2004). É produzida por um processo complexo que envolve 8 genes dentro do operon da citolisina, incluindo *cyIA*, *cyIB*, *cyIM*, *cyIL_L* e *cyIL_S*, considerados essenciais para a sua produção (HALLGREN et al., 2009; SHANKAR et al., 2004). A citolisina é uma toxina composta de duas subunidades codificadas pelos genes *cyIL_L* e *cyIL_S*, que são posteriormente modificadas pelo produto do gene *cyIM*. As subunidades modificadas são então transportadas para fora da célula por um transportador ABC codificado por *cyIB*. Extracelularmente, as duas subunidades são ativadas por uma protease codificada por *cyIA*, resultando em uma citolisina madura e funcional. Sua expressão é regulada por um sistema de *quorum-sensing* (HAAS; SHEPARD; GILMORE, 2002). Estudos também sugerem que mudanças nas condições de oxigênio podem regular a expressão dessa toxina, onde condições anaeróbicas induzem a uma maior produção de citolisina (DAY; COVE; PHILLIPS-JONES, 2003).

Do ponto de vista endodôntico, esse achado é importante porque as células de *E. faecalis* podem encontrar condições anaeróbicas no interior dos canais radiculares (KAYAOGLU; ORSTAVIK, 2004). Estudos revelaram que 16% a 27% das cepas de *E. faecalis* isoladas de infecções endodônticas produziam citolisina (REYNAUD AF GEIJERSSTAM et al., 2007; SEDGLEY et al., 2004). A presença dos genes *cylA/B/M* associada à produção de hemolisina foi observada em 24% a 30% de isolados de pacientes hospitalizados, porém diversas cepas positivas para esses genes não eram hemolíticas (DWORNICZEK et al., 2012; MCBRIDE et al., 2007). Por outro lado, Sedgley et al. (2005) e Zhu et al. (2010) reportaram previamente que nenhum de seus isolados endodônticos de *E. faecalis* eram hemolíticos, mesmo aqueles positivos para o gene *cylA*.

Outro gene que faz parte da PAI de *E. faecalis*, o *cbh*, é responsável pela codificação de uma hidrolase de sal biliar. Os sais biliares são moléculas anfipáticas que atuam como detergentes, auxiliando na solubilização de lipídeos e na digestão; mas também podem ter um papel na defesa imunológica do hospedeiro por seu potencial antimicrobiano, podendo causar danos ao DNA, proteínas e membrana das bactérias entéricas (HOFMANN; HAGEY, 2008; MERRITT; DONALDSON, 2009). A resistência aos sais biliares é uma característica importante para a sobrevivência de bactérias no intestino (BEGLEY; GAHAN; HILL, 2005). A prevalência de *cbh* e a produção da hidrolase foi alta entre isolados de *E. faecalis* de diversas fontes, incluindo cepas comensais ou causadoras de infecções (MCBRIDE et al., 2007). Entretanto, a presença desse e de outros genes da PAI ainda não foi investigada em isolados endodônticos.

A resposta ao estresse tem sido associada à virulência bacteriana, envolvendo sua adaptação ao ambiente em situações de estresse no hospedeiro (TENG; NANNINI; MURRAY, 2005). O gene *gls24-like*, encontrado na PAI, apresenta alta homologia ao gene *gls24* de enterococos e está associado a resposta ao estresse (GIARD et al., 2002). *gls24* codifica uma proteína que também está envolvida na resistência a sais biliares, onde sua transcrição é induzida na falta de glicose e outras condições de estresse (GIARD et al., 1997; GIARD et al., 2000). A inativação de *gls24* na cepa OG1RF de *E. faecalis* resultou numa redução de peritonites e endocardites em modelos animais, indicando sua importância na virulência de *E. faecalis* (NANNINI et al., 2005; TENG et al., 2005). Sua presença vem sendo detectada entre amostras de *E. faecalis* de pacientes saudáveis, entre

outras diversas fontes, tais como clínica, comensal, alimentos, animais, urina e sangue (HEW; KORAKLI; VOGEL, 2007; LENZ; HEW FERSTL; VOGEL, 2010; MCBRIDE et al., 2007).

O gene *nuc1* está localizado no final oposto da PAI em relação ao gene *gls24-like* (MCBRIDE et al., 2007). Esse gene apresenta sequência nucleotídica altamente similar a nuclease de estafilococos, que hidrolisa DNA e RNA (CHAIKEN; ANFINSEN, 1971). A produção de nuclease extracelular em *Staphylococcus aureus* tem sido associada a uma reduzida suscetibilidade a fagocitose, devido ao aumento na sua capacidade de escapar das armadilhas extracelulares dos neutrófilos (BERENDS et al., 2010). McBride et al. (2007) identificaram alta prevalência de *nuc1* em *E. faecalis* isolados de infecções nosocomiais.

O gene *psaA*, que também pode ser encontrado na PAI de *E. faecalis*, codifica uma adesina homóloga a proteína A de superfície pneumocócica (LOWE; LAMBERT; SMITH, 1995). Essa molécula desempenha um papel importante na adesão de pneumococos a células do hospedeiro e em sua virulência (RAJAM et al., 2008). No estudo de McBride et al. (2007), o gene *psaA* foi o mais prevalente entre os genes de virulência estudados em *E. faecalis* isolados de diversas fontes.

A PAI de *E. faecalis* isolados de infecções endodônticas ainda não foi totalmente explorada. Com exceção dos genes *esp* e *cyl*, não há dados sobre a presença de outros genes da PAI; sendo necessários, portanto, novos estudos para investigar a composição genética da PAI desses isolados, além da possível importância desses genes na patogenicidade das periodontites apicais crônicas persistentes após tratamento endodôntico.

1.1.2 Outros genes associados à virulência de *Enterococcus faecalis*

Outros supostos fatores de virulência de *E. faecalis* incluem adesinas, como a substância de agregação (Agg), a proteína de adesão ao colágeno (Ace) e o antígeno A da endocardite (EfaA) (JETT; HUYCKE; GILMORE, 1994).

A substância de agregação (Agg) pode contribuir para a patogênese de infecções enterocócicas através de vários mecanismos, incluindo a formação de agregados durante a conjugação, a transferência de plasmídeos e a adesão a uma variedade de superfícies eucarióticas (KOCH et al., 2004; MUNDY; SAHM; GILMORE, 2000). O gene *agg* foi encontrado em *E. faecalis* isolados de diversas

fontes, tais como feridas, alimentos, endocardite, fezes, urina, sangue, entre outros (DWORNICZEK et al., 2012; EATON; GASSON, 2001; HAN et al., 2011; LYSAKOWSKA; SMIGIELSKI; DENYS, 2009). Estudos envolvendo isolados endodônticos detectaram a presença de *agg* em 45-78% das cepas (PADILLA et al, 2012; ZOLETTI et al, 2011).

A família de MSCRAMMs (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) é composta por adesinas de enterococos importantes nos estágios iniciais da infecção, ligando-se a componentes da matriz extracelular das células do hospedeiro. A mais estudada entre as MSCRAMMs é a proteína Ace (ARIAS; MURRAY, 2012), que media a ligação da célula bacteriana aos tecidos do hospedeiro através da interação com colágeno tipo I e IV (RICH et al., 1999). Sua expressão parece ser aumentada na presença de estímulos do ambiente, como a presença de soro, alta temperatura e sais biliares (LEBRETON et al., 2009; NALLAPAREDDY; MURRAY, 2006; SHEPARD; GILMORE, 2002). Estudos revelaram que cepas de *E. faecalis* mutantes de *ace* tiveram seu crescimento atenuado em diferentes modelos de estudo, incluindo macrófagos murínicos, infecção de trato urinário e endocardite experimental; sugerindo que Ace é um importante fator de virulência (LEBRETON et al., 2009; NALLAPAREDDY et al., 2011; SINGH et al., 2010). Também foi demonstrado que Ace pode auxiliar a ligação de *E. faecalis* à dentina (HUBBLE et al., 2003).

Outra proteína relacionada à adesão é EfaA (*endocardial adherence factor antigen*), codificada por um gene que possui sequência de aminoácidos com homologia entre 55-60% a adesinas de estreptococos (SEDGLEY et al., 2005). Esse antígeno foi primeiramente identificado no antisoro de um paciente com endocardite provocada por *E. faecalis* (LOWE et al., 1995). Assim como a hemolisina, a gelatinase, Ace e Esp, EfaA é considerado um possível fator de virulência em *E. faecalis* causadores de endocardites, porém pouco se sabe sobre sua significância em infecções endodônticas persistentes (PREETHEE; KANDASWAMY; HANNAH, 2012). Estudos tem demonstrado uma prevalência de 100% de ambos os genes *ace* e *efaA* entre *E. faecalis* isolados de infecções endodônticas (SEDGLEY et al., 2005; SUN; SUNDSFJORD; SONG, 2012; ZHU et al., 2010; ZOLETTI et al., 2011), similar a dados reportados sobre isolados médicos (CRETI et al., 2004; EATON; GASSON, 2001).

E. faecalis produz uma variedade de enzimas que direta ou indiretamente causam danos aos tecidos. Gelatinase é uma metaloproteinase produzida por *E. faecalis* capaz de promover hidrólise de gelatina, colágeno e fibrinogênio, dentre outros componentes (FISHER; PHILLIPS, 2009). Gelatinase pode também ser produzida por uma variedade de células do hospedeiro, desempenhando um papel nos processos fisiológicos normais. Entretanto, uma atividade desregulada dessa enzima tem sido associada a certas condições patológicas. A gelatinase do hospedeiro encontra-se em maior concentração em inflamações periodontais, pulpares e periapicais (SHIN et al., 2002). A degradação do colágeno promovida pela gelatinase gera certos peptídeos que atraem macrófagos e neutrófilos para a região, além de promover a liberação de citocinas pró-inflamatórias por essas células. Portanto, é possível que a gelatinase produzida por *E. faecalis* isolados de canais radiculares possa desempenhar um papel importante na patogênese da inflamação periapical (KAYAOGLU; ORSTAVIK, 2004). A gelatinase também parece estar envolvida na formação de biofilme por enterococos (HANCOCK; PEREGO, 2004; MOHAMED; HUANG, 2007). Wang et al. (2011), analisando amostras de *E. faecalis* isoladas de infecções endodônticas recorrentes, encontraram associação entre formação de biofilme *in vitro* e uma alta expressão de *gelE*, sugerindo que a gelatinase possa contribuir para o desenvolvimento de infecções periapicais. A presença de *gelE* e a produção de gelatinase foi observada entre cepas de *E. faecalis* isoladas de pacientes hospitalizados, tendo sido detectada entre 40 e 55% dos isolados, porém foram detectadas cepas *gelE*-positivas não produtoras de gelatinase (DWORNICZEK et al., 2012; MCBRIDE et al., 2007). Da mesma forma, essa relação foi frequentemente detectada em *E. faecalis* isolados de infecções endodônticas: 46% a 69% dos isolados (REYNAUD AF GEIJERSSTAM et al., 2007; SEDGLEY et al., 2005; ZOLETTI et al., 2011).

A presença do gene *gelE* é apenas um indicativo da possível produção de gelatinase. Hancock e Perego (2004) mostraram que *frs* (um sistema dependente de *quorum-sensing*) controlava o desenvolvimento do biofilme pela produção de gelatinase. O operon *fsr* é formado por 4 genes: *fsrA*, *fsrB*, *fsrC* e *fsrD*. O fenótipo gelatinase-negativo está relacionado a uma deleção cromossomal de 23.9 kilobases desse operon, que inclui os genes *fsrA*, *fsrB* e parte do gene *fsrC*. Para detectar essa deleção, foi realizada a pesquisa de um determinante (*ef1841/fsrC*) que identifica um fragmento contendo a junção da deleção

(NAKAYAMA; KARIYAMA; KUMON, 2002). A relação entre a produção de gelatinase e a ausência de *ef1841/fsrC* tem sido observada (NAKAYAMA et al., 2002; SUN et al., 2012; ZOLETTI et al., 2011).

1.1.3 O operon da cápsula de *Enterococcus faecalis*

A periodontite apical pode se desenvolver ou persistir como resultado a respostas imunes complexas contra a infecção bacteriana proveniente dos sistema de canais radiculares. Os componentes estruturais bacterianos podem ser lançados dentro dos tecidos perirradiculares e estimular o desenvolvimento de reações imunológicas no hospedeiro (NAIR, 1997). Para evadir as defesas do hospedeiro em tecidos inflamados, a expressão de cápsula por *E. faecalis* pode mascarar os antígenos da superfície bacteriana, levando a bactéria a resistir a opsonofagocitose (THURLOW; THOMAS; FLEMING; et al., 2009). A biossíntese do polissacarídeo capsular por *E. faecalis* é codificada pelo operon *cps*, que inclui 11 genes: *cpsA* à *cpsK* (HANCOCK; GILMORE, 2002). Contudo, apenas 7 destes genes são essenciais para a produção de cápsula (*cpsC*, *cpsD*, *cpsE*, *cpsG*, *cpsI*, *cpsJ* e *cpsK*) (THURLOW; THOMAS; HANCOCK, 2009). Evidências genéticas prévias demonstraram que isolados de *E. faecalis* podem ser classificados em 1 dos 3 polimorfismos do operon *cps*: CPS 1 apresenta apenas *cpsA* e *cpsB*, CPS 2 apresenta todos os 11 genes do operon *cps* e CPS 5 apresenta todos os genes, menos *cpsF*. CPS 2 e 5 expressam o polissacarídeo capsular, enquanto que CPS 1 não apresenta expressão. A presença de cápsula tem sido associada a linhagens patogênicas de *E. faecalis* isolados de pacientes hospitalizados (MCBRIDE et al., 2007).

1.2 Resistência a antibióticos

Os microrganismos do gênero *Enterococcus* possuem mecanismos de resistência intrínseca a determinados antibióticos, porém, ao longo dos anos, têm adquirido resistência a várias classes de antibióticos por sua habilidade de aquisição de elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposons ou por meio de troca ou mutações cromossômicas (HEGSTAD et al., 2010).

Os enterococos apresentam moderada sensibilidade às penicilinas e são resistentes intrinsecamente a todas as cefalosporinas, a trimetoprim/sulfametoxazol e a concentrações terapêuticas de aminoglicosídeos e clindamicina. A resistência adquirida a β -lactâmicos, aminoglicosídeos e glicopeptídeos é de suma importância clínica por serem drogas de eleição no tratamento de infecções enterocócicas graves (CERCENADO, 2011).

A resistência intrínseca aos β -lactâmicos pode se dar pela baixa afinidade das PBP (proteínas de ligação às penicilinas) por estes antibióticos. Dentre as penicilinas, a mais ativa é a ampicilina, onde cepas resistentes a ela também são ao resto das penicilinas e carbapenens (CERCENADO, 2011). A resistência adquirida a essa classe de antibióticos pode dar-se por mutações na região de ligação à penicilina, codificada pelo gene *pbp5*; também pela produção de uma β -lactamase, que apresenta alta similaridade genética à estafilocócica do tipo A, codificada pelo gene *blaZ* (HOLLENBECK; RICE, 2012; TOMAYKO et al., 1996). Cepas produtoras dessa enzima se caracterizam por serem resistentes à penicilina, aminopenicilinas (ampicilinas), ureído-penicilinas (piperacilina), imipenem e as combinações de β -lactâmicos com inibidores de β -lactamase (ácido clavulânico, tazobactam, sulbactam) (CERCENADO, 2011). Cepas de *E. faecalis* produtoras de β -lactamases parecem ser raramente encontradas (CERCENADO, 2011; HOLLENBECK; RICE, 2012). Estudos analisando amostras de diversas fontes detectaram a presença do gene *blaZ* em baixa porcentagem entre os isolados (JUNGERMANN et al., 2011; MCBRIDE et al., 2007).

Os enterococos também apresentam uma resistência intrínseca de baixo nível aos aminoglicosídeos por um transporte deficiente desse antibiótico para o interior da bactéria, onde ele atua inibindo a síntese de proteínas pelo ribossomo, como demonstrado em experimentos realizados na década de 1970 (MOELLERING; WEINBERG, 1971; ZIMMERMANN; MOELLERING; WEINBERG, 1971). A associação de um aminoglicosídeo com outro antibiótico que atue na parede celular, como um β -lactâmico ou um glicopeptídeo, aumenta a sua capacidade, levando a um efeito sinérgico bactericida necessário para o tratamento de infecções enterocócicas graves, como bacteremias, endocardites e meningites. Porém, os enterococos são capazes de evitar este efeito sinérgico bactericida mediante a aquisição de genes que codificam a produção de enzimas inativadoras de aminoglicosídeos, que podem ser: fosfotransferases (APH), acetiltransferases (AAC)

ou nucleotidiltransferases (ANT) (CERCENADO, 2011). O gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* é o resultado da fusão de dois genes ancestrais e codifica uma enzima bifuncional, a AAC(6')-APH(2''), que possui atividade de acetilase e fosforilase, alterando a estrutura do antibiótico, que por sua vez não será capaz de ligar-se ao sítio de ação, a subunidade ribossomal 30S, perdendo sua atividade antimicrobiana (HOLLENBECK; RICE, 2012). Essa enzima é mediadora de resistência a altos níveis de gentamicina e a maioria dos aminoglicosídeos disponíveis clinicamente, com exceção da estreptomicina (CHOW, 2000). A resistência à estreptomicina em enterococos ocorre por mutações na subunidade ribossômica 30S, que resulta em uma diminuição da ligação do antibiótico a ela. Um dos genes associados à resistência a esse antibiótico é o *ant(6)-Ia*. O gene *aph(3')-IIIa* codifica uma fosfotransferase que confere alto nível de resistência a kanamicina e ao sinergismo ampicilina-amicacina (CERCENADO, 2011). Genes que conferem resistência a aminoglicosídeos têm sido amplamente detectados entre cepas de *E. faecalis* de diversas fontes (ASLAM et al., 2012; JAMET et al., 2012; LOPEZ et al., 2012; MCBRIDE et al., 2007; QUINONES PEREZ et al., 2011).

A aquisição de resistência a glicopeptídeos por enterococos foi primeiramente descrita no ano de 1988, sendo a cepa VR83 o primeiro isolado resistente a vancomicina entre os enterococos nos Estados Unidos (SAHM et al., 1989). Enterococos resistentes a glicopeptídeos emergiram como a maior causa de infecções nosocomiais (HOLLENBECK; RICE, 2012). Em especial, o aparecimento e disseminação de enterococos resistentes a vancomicina (VRE) tem trazido sérias preocupações por causarem infecções de difícil tratamento. A vancomicina inibe a síntese da parede celular, ligando-se a terminação D-ala-D-ala do precursor de peptídeo. VRE modificam esses precursores de pentapeptídeos, substituindo D-ala terminal por D-lac ou D-ser, diminuindo drasticamente a afinidade do antibiótico, quando comparado ao precursor normal (REYNOLDS, 1989). Existem vários operons conhecidos por conferirem resistência à vancomicina, mas *vanA* e *vanB* são os mais prevalentes em infecções por VRE. O operon *vanA* é transportado pelo transposon Tn1546, comumente encontrado em plasmídeos conjugativos e não conjugativos. O fenótipo VanA é resistente tanto à vancomicina quanto à teicoplanina. O operon *vanB* pode ser transferido entre enterococos como parte de um grande elemento cromossomal conjugativo ou por plasmídeos conjugativos. O fenótipo VanB é resistente à vancomicina e sensível à teicoplanina, porém a

exposição ao último pode levar a expressão constitutiva e resultar em resistência aos dois antibióticos (HEGSTAD et al., 2010; LEBRETON et al., 2011). Estudos têm documentado que VRE são mais comumente isolados de pacientes hospitalizados, altamente comprometidos, nos Estados Unidos e em outros países, incluindo o Brasil (D'AZEVEDO et al., 2008).

E. faecalis também podem ser altamente resistente a macrolídeos, tetraciclina e cloranfenicol. Como a resistência a esses agentes antimicrobianos é muito comum, raramente são envolvidos no tratamento de infecções enterocócicas sérias (HOLLENBECK; RICE, 2012).

Foi reportado que a cepa DS16 de *E. faecalis* carregava o transposon Tn917, encontrado no plasmídeo não-conjugativo que confere múltipla resistência a antibióticos chamado pAD2 (SHAW; CLEWELL, 1985). Dentre os genes de resistência encontrados nesse transposon, está *ermB*, codificador de uma metilase de rRNA, que altera a estrutura da molécula de 23S rRNA, alterando o sítio de ligação do antibiótico. Essa modificação confere resistência a macrolídeos (ROBERTS, 2005).

A resistência a tetraciclina é mediada por vários genes que levam à sua eliminação ativa da célula bacteriana através da produção de bombas de efluxo (genes *tetL*-like) (ROBERTS, 2011) ou à mecanismos de proteção dos ribossomos pela produção de proteínas (*ribosome protection proteins* ou RPPs) que interagem com proteínas ribossomais, desligando o antibiótico do seu sítio primário de ligação (genes *tetM*-like) (CONNELL et al., 2003).

O mecanismo mais comum de resistência ao cloranfenicol ocorre através da acetilação da droga, envolvendo uma enzima acetiltransferase codificada pelo gene *cat* (SCHWARZ et al., 2004). As proteínas CAT são divididas em três tipos: CATI, CATII e CATIII, sendo CATI a mais prevalente (BISWAS et al., 2012).

Embora a emergência de cepas resistentes seja mais pronunciada em infecções hospitalares ou sistêmicas (MCBRIDE et al., 2007), estudos de *E. faecalis* isolados de infecções endodônticas de pacientes têm demonstrado o aparecimento de resistência bacteriana, principalmente a macrolídeos, tetraciclina e cloranfenicol (PINHEIRO et al., 2004; SEDGLEY et al., 2004; SEDGLEY et al., 2005).

2 OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

- analisar a diversidade genética de cepas de *E. faecalis* isoladas de canais de dentes com periodontites apicais persistentes após o tratamento endodôntico e sua relação filogenética com isolados de pacientes hospitalizados com infecções sistêmicas;
- investigar a prevalência de genes relacionados à virulência e à resistência a antibióticos em cepas de *E. faecalis* isoladas de infecções endodônticas e infecções sistêmicas;
- investigar se há clusters virulentos associados a infecções endodônticas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cepas bacterianas

Para o estudo do perfil genotípico foram utilizadas 40 cepas de *E. faecalis* isoladas de infecções orais e de pacientes hospitalizados. As cepas de *E. faecalis* isoladas de canais radiculares foram cedidas pela Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP. Essas cepas foram coletadas previamente a esse estudo, com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP (CEP/ FOP/ UNICAMP 139/2008). As cepas de *E. faecalis* isoladas de diferentes condições clínicas (bacteremia, endocardite, infecções do trato gênito-urinário) foram cedidas pelo Prof. Antônio Carlos Pignatari, diretor do Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC) – UNIFESP.

A identificação bioquímica foi realizada inicialmente através da utilização do kit comercial ID 32 STREP (Bio Merieux, Marcy-l'Etoile, França) e posteriormente confirmadas através do sequenciamento do gene *16S rRNA*. As células de *E. faecalis* foram mantidas em criotubos contendo caldo BHI (DIFCO, Detroit, USA) acrescido de 20% de glicerol em freezer a -80 °C (Revco, Asheville, N.C., EUA).

3.2 Sequenciamento parcial do gene *16S rRNA*

Alíquotas do estoque congelado de cada uma das cepas em 20% de glicerol em freezer -80°C (Revco) foram inoculadas em placas contendo BHI (DIFCO) ágar e incubadas durante o período 24 horas a 37 °C em estufa sob atmosfera de aerobiose.

Após o desenvolvimento das culturas de *E. faecalis*, as colônias foram transferidas com auxílio de alça estéril plástica padronizadas de 1 µl para tubos de centrifuga de 1,5 mL contendo 1 mL de BHI caldo (DIFCO). Os tubos foram incubados durante o período 24 horas a 37 °C em estufa sob atmosfera de aerobiose.

A obtenção do DNA genômico das cepas de *E. faecalis* foi realizada segundo a metodologia preconizada por Ulrich e Hughes (2001), utilizando o Wizard® Genomic DNA Purification System Kit (Promega, Madison, WI, USA).

Foram adicionadas algumas etapas ao protocolo do fabricante para facilitar a extração do DNA de várias bactérias Gram-positivas, como adição de solução de lisozima (30 mg/mL) e 3 etapas de congelamento-descongelamento utilizando gelo seco e um banho-maria a 80 °C (ULRICH; HUGHES, 2001).

Para a reação de amplificação foi utilizada Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. Para cada reação, foram utilizados 5 µL de tampão (10x PCR *buffer*), 3 mM de MgCl₂, 40 nmol de cada dNTP (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 20 pmol de cada iniciador (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 1 µL de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen), 5 µL de DNA molde e água estéril foi adicionada para completar o volume total da reação (50 µL). O controle negativo foi constituído da mistura padrão de PCR com o DNA molde trocado por 5 µL de água estéril. Como controle positivo foi utilizado o DNA da amostra ATCC 29212 em todas as reações.

Os produtos dessas reações foram purificados utilizando o QIAquick Gel Extration Kit (Gene Company Limited, Beijing, China), seguindo as instruções do fabricante. Foram posteriormente levados ao Centro de Estudos do Genoma Humano, onde foi realizado o sequenciamento de uma das fitas do gene, utilizando o iniciador *forward* utilizado na reação de PCR. As sequências gênicas foram editadas e comparadas com sequências publicadas no endereço eletrônico <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.

As sequências dos iniciadores e condições de PCR utilizadas em todas as etapas deste estudo estão detalhadas no Quadro 1.

3.3 Detecção de genes de resistência antimicrobiana e de virulência

Os genes associados à resistência antimicrobiana e virulência das cepas de *E. faecalis* da nossa coleção foram investigados por PCR. Para investigar o perfil de resistência foram selecionados os seguintes genes que conferem resistência a diferentes classes de antimicrobianos: *vanA* e *vanB* (vancomicina), *aac6'-aph2''* (altos níveis de gentamicina), *aph(3')-IIIa* (kanamicina) e *ant(6)-Ia* (estreptomicina), *ermB* (eritromicina), *tetM* e *tetL* (tetraciclina), *cat* (cloranfenicol) e *blaZ* (penicilina).

O perfil de virulência dessas cepas foi determinado pelo conteúdo genético da PAI, que pode conter os genes: *esp* (proteína de superfície de enterococos), *gls24-like* (proteína de resposta ao estresse), *nuc1* (homólogo a nuclease de

estafilococos), *psaA* (proteína de adesão ao metal), *cbh* (hidrolase do sal biliar) e *cyl* (citolisina). Em particular, foram investigados todos os genes do operon da citolisina (*cylA/B/M/L_L/L_S*) e só foram consideradas cepas com genótipo positivo para a produção de citolisina as que apresentaram todos os genes analisados.

Também foram investigados outros genes de virulência: *agg* (substância de agregação), *ace* (proteína de adesão ao colágeno), *efaA* (antígeno da endocardite) e *gelE* (gelatinase). O locus *frs*, que regula a produção de gelatinase, foi igualmente investigado e foram consideradas cepas com capacidade de produção de gelatinase aquelas com a presença do gene *gelE* e ausência do determinante de deleção *frsC* (*gelE*⁺/*frsC*⁻).

Como controle positivo para a realização das reações de PCR, as seguintes cepas foram selecionadas: *E. faecalis* M39717 para os genes *esp*, *gelE*, *ef1841/frsC*, *cylA/B/M/L_L/L_S*, *nuc1*, *psaA*, *agg*, *ace*, *efaA*, *aph(3')-IIIa*, *ant(6)-Ia*; *E. faecalis* M35959 para *cbh*; *E. faecalis* M36837 para *vanA*; *E. faecium* A para *vanB*; *E. faecalis* M36561 para *aac6'-aph2"*; *E. faecalis* A42382; *E. faecium* 36770 para *ermB*; *E. faecium* 190 para *tetL*; *E. faecium* 37041 para *tetM* e *cat*. Foram realizadas extrações de DNA das cepas selecionadas e sequenciamento dos genes de interesse.

As reações de amplificação foram realizadas utilizando Taq DNA Polimerase (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Para cada reação, foram utilizados 2,5 µL de tampão (10x PCR buffer), 1 µL de MgCl₂, 1,5 µL de dNTP (50 mM de cada dNTP), 1,25 µL de cada iniciador (concentração ajustada para 5 µM), 0,12 µL de Taq DNA polimerase, 1 µL de DNA molde e água estéril foi adicionada para completar o volume total da reação (25 µL). Os ciclos de amplificação foram realizados em termociclador (Gene AmpPCR System 2400, Applied Biosystems) seguindo as condições de PCR descritas no Quadro 1.

Seus produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose e corados com brometo de etídio para visualização sobre emissão de luz UV e fotografados no sistema Photo PC 3100Z (EPSON, Hemel Hempstead, Inglaterra).

3.4 Análise do polimorfismo do operon *cps*

Os três polimorfismos do operon da cápsula de *E. faecalis* foram previamente descritos e investigados por McBride et al. (2007). O locus *cps* que caracteriza o

CPS 1 é formado por *cpsA* e *cpsB*, seguido do gene *hcp1* (não relacionado à cápsula). O locus *cps* de CPS 2 é formado por *cpsA*, *B*, *C*, *D*, *E*, *F*, *G*, *H*, *I*, *J*, *K*, seguido por *hcp1*. Já o locus *cps* de CPS 5 é formado por *cpsA*, *B*, *C*, *D*, *E*, *G*, *H*, *I*, *J*, *K*, seguido por *hcp1*, porém *cpsF* é ausente. Os iniciadores *cpsB5-F/hcp1-R* geram um produto de 950 pares de bases (pb) para amostras tipo CPS 1. Os iniciadores *cpsEend-F/59cpsG-R* foram utilizados para amplificar regiões entre *cpsE* e *cpsG* para detectar a presença de *cpsF*, que diferencia o polimorfismo CPS 2 de CPS 5. Um produto de amplificação de 1.098 pb indica a presença de *cpsF*, característica de CPS 2, já a geração de um produto de 199 pb indica a presença de *cpsE* e *cpsG* e a ausência de *cpsF*, característica do polimorfismo CPS 5.

As reações de amplificação foram realizadas utilizando Taq DNA Polimerase (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Para cada reação, foram utilizados 2,5 µL de tampão (10x PCR *buffer*), 1 µL de MgCl₂, 1,5 µL de dNTP (50mM de cada dNTP), 1,25 µL de cada iniciador (concentração ajustada para 5 µM), 0,12 µL de Taq DNA polimerase, 1 µL de DNA molde e água estéril foi adicionada para completar o volume total da reação (25 µL). Os ciclos de amplificação foram realizados em termociclador (Gene AmpPCR System 2400, Applied Biosystems) seguindo as condições de PCR descritas no Quadro 1. Os produtos destas reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose e corados com brometo de etídio para visualização sobre emissão de luz UV e fotografados no sistema Photo PC 3100Z (EPSON).

3.5 Tipagem por MLST

A metodologia utilizada foi descrita por Ruiz-Garbajosa et al. (2006). Estes autores desenvolveram uma técnica de MLST para *E. faecalis* através do sequenciamento das regiões internas utilizando iniciadores específicos para 7 genes cromossomais que codificam enzimas de manutenção (*housekeeping*): *gdh* (glicose-6-fosfato desidrogenase), *gyd* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), *pstS* (*fosfate ATP binding cassette transporter*), *gki* (glicoquinase putativa), *aroE* (chiquimato 5-desidrogenase), *xpt* (chiquimato 5-desidrogenase) e *yqiL* (acetil-coenzima A acetiltransferase).

As reações de amplificação foram realizadas utilizando Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Para cada

reação, foram utilizados 5 µL de tampão (10x PCR buffer), 2 µL de MgCl₂, 3 µL de dNTP (50mM de cada dNTP), 2,5 µL de cada iniciador (concentração ajustada para 5 µM), 0,25 µL de Platinum Taq DNA polimerase, 2 µL de DNA molde e água estéril foi adicionada para completar o volume total da reação (50 µL). Os ciclos de amplificação foram realizados em termociclador (Gene AmpPCR System 2400, Applied Biosystems) seguindo as condições de PCR descritas no Quadro 1.

Após a amplificação, os produtos de PCR foram purificados através do kit de purificação QIAquick PCR Purification (Quiagen, Hilden, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. Os produtos de PCR foram enviados ao Centro de Estudos do Genoma Humano, onde foi realizado o sequenciamento de ambas as fitas de cada gene, utilizando os mesmos pares de iniciadores utilizados na PCR (Quadro 1). As sequências gênicas foram editadas e comparadas com sequências de cada locus publicadas no banco de dados do MLST de *E. faecalis* (<http://efaecalis.mlst.net/>). Para cada locus, um número de alelo foi atribuído a cada sequência diferente. Cada combinação única de alelos foi atribuída a um número de identificação, denominando o perfil alélico ou *sequence type* (ST). Os STs foram atribuídos na seguinte ordem de genes *gdh*, *gyd*, *pstS*, *gki*, *aroE*, *xpt* e *yqiL*. A similaridade entre as diferentes STs foram investigadas usando o software BioNumerics (versão 6.5; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) pelo método UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic averages*) para determinar o coeficiente de similaridade categórico (RUIZ-GARBAJOSA et al., 2006). Uma cepa de *Enterococcus faecium* foi utilizada como *out group*.

Os complexos clonais (CCs) são formados por clusters de STs relacionadas, que variam entre si em um único locus (*single locus variants* - SLVs) ou em dois loci (*double locus variants* - DLVs) dos sete estudados e são considerados descendentes de um mesmo ancestral comum (RUIZ-GARBAJOSA et al., 2006). Essa análise também foi realizada utilizando o software BioNumerics (versão 6.5; Applied Maths).

3.6 Análise estatística

O teste do Qui-quadrado e o teste exato de Fisher foram utilizados para verificar a associação entre a presença dos genes estudados (virulência, resistência

antimicrobiana e polimorfismo capsular) e os dois grupos de amostras analisados (isolados endodônticos e médicos). Adotou-se valor de significância $p < 0,05$.

Quadro 1 – Sequências dos iniciadores e condições de PCR utilizadas.

(continua)

Genes	Sequência dos iniciades (5' à 3')	Condições de PCR	Tamanho (pb)	Referências
<i>16S rRNA</i>	GAGAGTTTGATYMTGGCTCAG GAAGGAGGTGWTCCARCCGCA	95 °C - 8 min; 30 ciclos (95 °C - 45 s; 60 °C - 45 min; 72 °C - 1.5 min) e 72 °C-10 min.	~1500	Paster et al., 2001
Resistência antimicrobiana				
<i>vanA</i>	CCCGAATTTCAAATGATTGAAAA CGCCATCCTCCTGCAAAA	94 °C - 3 min; 40 ciclos (94 °C - 30 s; 62 °C - 2 min; 72 °C - 2 min) e 72 °C - 6 min.	1.029	McBride et al., 2007
<i>vanB</i>	CCCGAATTTCAAATGATTGAAAA CGCCATCCTCCTGCAAAA	94 °C - 3 min; 40 ciclos (94 °C - 30 s; 59 °C - 2 min; 72 °C - 2 min) e 72 °C - 6 min.	457	McBride et al., 2007
<i>aac6'-aph2"</i>	CTGATGAGATAGTCTATGGTATGGATC GCCACACTATCATAACCACTACCG	94 °C-3 min; 30 ciclos (94 °C - 30 s; 62 °C - 45 s; 72 °C - 30 s) e 72 °C - 4 min.	375	McBride et al., 2007
<i>aph(3')-IIIa</i>	GCCGATGTGGATTGCGAAAA GCTTGATCCCCAGTAAGTCA	94 °C - 3 min; 30 ciclos (94 °C - 30 s; 60 °C - 30 s; 72 °C - 30 s) e 72 °C - 4 min.	~300	Klibi et al., 2013
<i>ant(6)-Ia</i>	ACTGGCTTAATCAATTTGGG GCCTTTCCGCCACCTCACCG	94 °C - 3 min; 30 ciclos (94 °C - 30 s; 58 °C - 30 s; 72 °C - 30 s) e 72 °C - 4 min.	597	Klibi et al., 2013
<i>ermB</i>	CGACGAAACTGGCTAAAATAAGTAAAC GAGGTATGGCGGGTAAGTTTATTAAG	93 °C - 3 min; 35 ciclos (93 °C - 1 min; 52 °C - 1 min; 72 °C - 1 min) e 72 °C - 5 min.	408	McBride et al., 2007
<i>tetM</i>	GGACAAAGGTACAACGAGGAC GGTCATCGTTTCCCTCTATTACC	94 °C - 5 min; 30 ciclos (94 °C - 1 min; 55 °C - 1 min; 72 °C - 1 min) e 72 °C - 7 min.	445	McBride et al., 2007
<i>tetL</i>	GCTGTATATGGAAGCTATCTGATC CACGCTAACGATAAGAAAAGAAATGC	94 °C - 5 min; 30 ciclos (94 °C - 1 min; 55 °C - 1 min; 72 °C - 1 min) e 72 °C - 7 min.	491	McBride et al., 2007
<i>cat</i>	GAACACTATTTTAATCAGCAAACTAC CCAATCATCTACCCTATGAATTATATC	94 °C - 5 min; 35 ciclos (94 °C - 1 min; 54 °C - 1 min; 72 °C - 1 min) e 72 °C - 10 min.	590	McBride et al., 2007
<i>blaZ</i>	CAGTTCACATGCCAAAGAGTTAAATG CCGAAAGCAGCAGGTGTTG	94 °C - 5 min; 35 ciclos (94 °C - 1 min; 54 °C - 1 min; 72 °C - 1 min) e 72 °C - 10 min.	473	McBride et al., 2007
Virulência				
<i>esp</i>	CGATAAAGAAGAGAGCGGAG GCAAACTCTACATCCACGTC	94 °C - 2 min; 35 ciclos (92 °C - 30 s; 52 °C - 30 s; 72 °C - 1 min) e 72 °C - 2 min.	539	McBride et al., 2007
<i>cylA</i>	TGGATGATAGTGATAGGAAGT TCTACAGTAAATCTTTCGTCA	94 °C - 15 min; 30 ciclos (94 °C - 1 min; 52 °C - 1 min; 72 °C - 1 min) e 72 °C - 10 min.	517	Hallgren et al., 2009
<i>cylB</i>	GGAGAATTAGTGTTTAGAGCG GCTTCATAACCATTGTACTATAGAAAC	94 °C - 2 min; 35 ciclos (92 °C - 30 s; 52 °C - 30 s; 72 °C - 1 min) e 72 °C - 2 min.	522	McBride et al., 2007

Quadro 1 – Sequências dos iniciadores e condições de PCR utilizadas.

(continuação)

Genes	Sequência dos iniciades (5' à 3')	Condições de PCR	Tamanho (pb)	Referências
<i>cyIM</i>	AAGATTGTCTGTGCCATGGA TACTCACTTCCGGCAACCTT	94 °C - 2 min; 35 ciclos (92 °C - 30 s; 52 °C - 30 s; 72 °C - 1 min) e 72 °C - 2 min.	159	McBride et al., 2007
<i>cyLL</i>	GATGGAGGGTAAGAATTATGG GCTTCACCTCACTAAGTTTATAG	94 °C - 15 min; 30 ciclos (94 °C - 1 min; 52 °C - 1 min; 72 °C - 1 min) e 72 °C - 10 min.	253	Hallgren et al., 2009
<i>cyLS</i>	TGCTAAATAAGGAAAATCAAG CCTAAGCCTATGGTAAAACA	94 °C - 15 min; 30 ciclos (94 °C - 1 min; 52 °C - 1 min; 72 °C - 1 min) e 72 °C - 10 min.	157	Hallgren et al., 2009
<i>gls24-like</i>	GCATTAGATGAGATTGATGGTC GCGAGGTTTCAGTTTCTTC	94 °C - 2 min; 35 ciclos (92 °C - 30 s; 52 °C - 30 s; 72 °C - 1 min) e 72 °C - 2 min.	446	McBride et al., 2007
<i>nuc-1</i>	GTGTAAAGAAGTTACTGAAAATGTTACTC GCGTTTTTGTAGTAATGTTCCATCTACG	94 °C - 2 min; 35 ciclos (92 °C - 30 s; 52 °C - 30 s; 72 °C - 1 min) e 72 °C - 2 min.	332	McBride et al., 2007
<i>psaA</i>	CTATTTTGCAGCAAGTGATG CGCATAGTAAGTATCACCATCTTG	94 °C - 2 min; 35 ciclos (92 °C - 30 s; 52 °C - 30 s; 72 °C - 1 min) e 72 °C - 2 min.	540	McBride et al., 2007
<i>cbh</i>	CTCATAGGATCCATCACCAACATCAC TGGCTGGAATTCACTTTTTCAGGCTAT	94 °C - 2 min; 35 ciclos (92 °C - 30 s; 52 °C - 30 s; 72 °C - 1 min) e 72 °C - 2 min.	~580	McBride et al., 2007
<i>gelE</i>	ACCCCGTATCATTGGTTT ACGCATTGCTTTTCCATC	94 °C - 2 min; 35 ciclos (92 °C - 30 s; 56 °C - 1 min; 72 °C - 2 min) e 72 °C - 5 min.	419	Zoletti et al., 2011
<i>ef1841/fsrC</i>	GATCAAGAAGGGAAGCCACC CCAACCGTGCTCTTCTGGA	94 °C - 2 min; 35 ciclos (92 °C - 30 s; 56 °C - 60 s; 72 °C - 2 min) e 72 °C - 5 min.	1.050	Zoletti et al., 2011
<i>agg</i>	AAGAAAAAGAAGTAGACCAAC AAACGGCAAGACAAGTAAATA	94 °C - 2 min; 35 ciclos (92 °C - 30 s; 56 °C - 30 s; 72 °C - 1 min) e 72 °C - 2 min.	1.553	Zoletti et al., 2011
<i>ace</i>	AAAGTAGAATTAGATCACAC TCTATCACATTCGGTTGCG	94 °C - 2 min; 35 ciclos (92 °C - 30 s; 56 °C - 30 s; 72 °C - 1 min) e 72 °C - 2 min.	320	Zoletti et al., 2011
<i>efaA</i>	CTGGAGAAAGAAATGGAGGA CTACTAACACGTCACCAATG	94 °C - 2 min; 35 ciclos (92 °C - 30 s; 56 °C - 30 s; 72 °C - 1 min) e 72 °C - 2 min.	499	Zoletti et al., 2011
CPS				
<i>cpsB5/hcp1</i>	CCAGGACATGGTGGTATTTTAGATC CGCCAATAACAATCTTTACCAGAGC	94 °C - 5 min; 30 ciclos (94 °C - 30 s; 52 °C - 2 min; 72 °C - 2 min) e 72 °C - 7 min.	950	McBride et al., 2007
<i>cpsEend/59cpsG</i>	GAACCTACAACAATTAATAAAGC GCATAGTATGTAAAGATTGATCCA	94 °C - 5 min; 30 ciclos (94 °C - 30 s; 52 °C - 2 min; 72 °C - 2 min) e 72 °C - 7 min.	1098/199	McBride et al., 2007

Quadro 1 – Sequências dos iniciadores e condições de PCR utilizadas.

(continuação)

Genes	Sequência dos iniciades (5' à 3')	Condições de PCR	Tamanho (pb)	Referências
MLST				
<i>aroE</i>	TGGAAACTTTACGGAGACAGC GTCCTGTCCATTGTTCAAAAGC	94 °C - 5 min; 30 ciclos (94 °C - 30 s; 52 °C - 30 s; 72 °C - 1 min) e 72 °C - 7 min.	459	Ruiz-Garbajosa et al., 2006
<i>gdh</i>	GGCGCACTAAAAGATATGGT CCAAGATTGGGCAACTTCGTCCCA	94 °C - 5 min; 30 ciclos (94 °C - 30 s; 52 °C - 30 s; 72 °C - 1 min) e 72 °C - 7 min.	530	Ruiz-Garbajosa et al., 2006
<i>gki</i>	GATTTTGTGGGAATTGGTATGG ACCATTAAGCAAAATGATCGC	94 °C - 5 min; 30 ciclos (94 °C - 30 s; 52 °C - 30 s; 72 °C - 1 min) e 72 °C - 7 min.	438	Ruiz-Garbajosa et al., 2006
<i>gyd</i>	CAAACGCTTAGCTCCAATGGC CATTCGTTGTCATACCAAGC	94 °C - 5 min; 30 ciclos (94 °C - 30 s; 52 °C - 30 s; 72 °C - 1 min) e 72 °C - 7 min.	395	Ruiz-Garbajosa et al., 2006
<i>pstS</i>	CGGAACAGGACTTTCGC ATTTACATCACGTTCTACTTGC	94 °C - 5 min; 30 ciclos (94 °C - 30 s; 52 °C - 30 s; 72 °C - 1 min) e 72 °C - 7 min.	583	Ruiz-Garbajosa et al., 2006
<i>xpt</i>	AAAATGATGGCCGTGTATTAGG AACGTCACCGTTCCTTCACTTA	94 °C - 5 min; 30 ciclos (94 °C - 30 s; 52 °C - 30 s; 72 °C - 1 min) e 72 °C - 7 min.	456	Ruiz-Garbajosa et al., 2006
<i>yqiL</i>	CAGCTTAAGTCAAGTAAGTGCCG GAATATCCCTTCTGCTTGTGCT	94 °C - 5 min; 30 ciclos (94 °C - 30 s; 52 °C - 30 s; 72 °C - 1 min) e 72 °C - 7 min.	436	Ruiz-Garbajosa et al., 2006

4 RESULTADOS

Foram realizadas reações de MLST de 21 cepas de *E. faecalis* isolados de casos de insucesso no tratamento endodôntico e 19 isolados de infecções sistêmicas de pacientes hospitalizados. Um total de 40 isolados foi classificado em 19 STs (*sequence types*); 14 STs já descritas no banco de dados (<http://efaecalis.mlst.net>) e 5 STs demonstradas pela primeira vez no presente estudo (ST394 a ST397 e ST472) (Figura 1). As amostras isoladas de pacientes hospitalizados agruparam-se em clusters diferentes dos isolados endodônticos, sendo ST 2 predominante entre estas, representando 52,6% (10/19) das amostras estudadas (Figura 1). Por outro lado, 61,9% (13/21) das cepas endodônticas foram classificadas em diferentes STs.

A análise clonal revelou que 63% (12/19) dos isolados de pacientes hospitalizados estavam agrupados no complexo clonal 2 (CC2), composto por ST2 e ST6; enquanto 42,8% (9/21) dos isolados endodônticos pertenciam ao CC25, formado pelas STs 25, 62, 97 e 133 (Figura 2). Além disso, a maioria destes isolados não está relacionada filogeneticamente aos isolados de pacientes hospitalizados. A comparação dos resultados com o banco de dados internacional revelou que os isolados de infecções endodônticas possuem STs comuns aos isolados de alimentos, animais e fezes de indivíduos saudáveis. Em particular, 9 dos 21 (42,8%) isolados endodônticos apresentaram similaridade genética com amostras de alimentos (STs 23, 25, 40, 72 e 133).

Os dados de resistência a antibióticos, genes da virulência e dados sobre o polimorfismo do operon da cápsula de *E. faecalis* foram correlacionados aos dados de MLST (Figura 1). As cepas isoladas de pacientes hospitalizados representam clusters com maior número de genes de virulência e de resistência a antibióticos, quando comparadas aos isolados endodônticos (Figura 1). Os isolados pertencentes ao CC2 carregam simultaneamente no mínimo 13 destes genes. Muito diferente dos resultados encontrados entre os isolados endodônticos, onde foram detectados no mínimo 3 genes.

Figura 1 - Dendrograma baseado nos dados do MLST de 40 cepas de *E. faecalis*: 21 isolados endodômicos (RC) e 19 isolados médicos (M) de infecções sistêmicas e sua correlação com os genes de resistência antimicrobiana, genes da ilha de patogenicidade (PAI) e outros genes.

Figura 2 - A relação filogenética de 40 cepas de *E. faecalis* com análise dos complexos clonais (CC).

Foi observada uma alta prevalência dos genes associados à resistência antimicrobiana entre os isolados de pacientes hospitalizados. As cepas que apresentaram maior número de genes que conferem resistência a antibióticos foram

ST2, ST 6, ST 30 e ST 103 (Figura 1). Entre os isolados de pacientes hospitalizados, 52,6% (10/19) apresentaram genes que conferem resistência a todos os grupos de antimicrobianos estudados. Os genes mais prevalentes entre esses isolados foram *vanA*, *aa6'-aph2"*, *ermB* e *cat* ($p < 0,05$), sendo detectados em 94,7% das amostras (Tabela 1). Em particular, 68,4% (13/21) dos isolados de pacientes hospitalizados portavam simultaneamente *aa6'-aph2"*, *aph(3')-IIIa* e *ant(6)-Ia*, sendo detectados unicamente entre os isolados do CC2. Em contrapartida os genes *aph(3')-IIIa*, *ant(6)-Ia* e *cat* não foram detectados nos isolados endodônticos, enquanto o gene *aa6'-aph2"* foi observado em apenas uma amostra. Por sua vez, os genes *ermB* e *tetM* foram encontrados respectivamente em 61,9% e 57,1% dos isolados endodônticos (Tabela 1); com a presença simultânea de ambos os genes em 42,9% (10/21) das cepas (Figura 1). Por outro lado, 28,6% (6/21) dos isolados endodônticos não continham nenhum marcador de resistência antimicrobiana estudado. Os genes *vanB*, *tetL* e *blaZ* não foram detectados entre as 40 cepas estudadas.

A pesquisa dos genes da PAI revelou que 94,7% (18/19) dos isolados de pacientes hospitalizados apresentaram no mínimo 3 dos 6 genes estudados. Em contraste, a maioria dos isolados endodônticos apresentou apenas 1 ou 2 destes genes (Figura 1). Entre os isolados de pacientes hospitalizados, o gene da PAI mais prevalente foi o *psaA*, detectado em 94,7% das cepas ($p < 0,01$); já entre os isolados endodônticos, foi *cbh*, detectado em 76,2% destes ($p < 0,01$) (Tabela 1). Os genes *psaA*, *gls24-like* (proteína de resposta ao estresse) e os genes do operon da citolisina (*cylA*, *cylB*, *cylM*, *cylL_L* e *cylL_S*) não foram identificados entre os isolados endodônticos. Por outro lado, esses genes foram frequentemente detectados em isolados hospitalares, sendo *gls24-like* e *cyl* unicamente detectados em cepas ST2 (CC2).

Os genes mais prevalentes entre as 40 cepas analisadas foram *ace* (adesina ao colágeno de enterococos) e *efaA* (antígeno da endocardite), relacionados a adesão, sendo detectados em 100% dos isolados. Também foi observada uma alta prevalência do gene *agg* e de cepas com genótipo indicativo de produção de gelatinase (*gelE+/fsrC-*) entre as 40 cepas estudadas.

A presença simultânea de *gelE* e *esp* foi observada entre os isolados analisados, sendo detectada em 52,6% dos isolados de pacientes hospitalizados e

28,6% dos isolados endodônticos, entretanto essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,196$).

Tabela 1 - Prevalência dos genes de virulência e resistência antimicrobiana entre 21 isolados endodônticos e 19 médicos.

Genes	Endodônticos (%)	Médicos (%)	Valor de p.
CPS 1	61,9	31,6	$p = 0,067$
CPS 2	28,6	10,6	$p = 0,241$
CPS 5	9,5	57,9	$p = 0,002^*$
<i>vanA</i>	0	94,7	$p < 0,001^*$
<i>vanB</i>	0	0	-
<i>aa6'-aph2''</i>	4,8	94,7	$p < 0,001^*$
<i>aph(3')-IIIa</i>	0	68,4	$p < 0,001^*$
<i>ant(6)-Ia</i>	0	68,4	$p < 0,001^*$
<i>ermB</i>	61,9	94,7	$p = 0,021^*$
<i>tetM</i>	57,1	63,2	$p = 0,755$
<i>tetL</i>	0	0	-
<i>cat</i>	0	94,7	$p < 0,001^*$
<i>blaZ</i>	0	0	-
<i>esp</i>	57,1	73,7	$p = 0,333$
<i>cyl</i>	0	47,4	$p < 0,001^*$
<i>gls24-like</i>	0	52,6	$p < 0,001^*$
<i>nuc1</i>	14,3	78,9	$p < 0,001^*$
<i>psaA</i>	0	94,7	$p < 0,001^*$
<i>cbh</i>	76,2	15,8	$p < 0,001^*$
<i>gelE+/fsrC-</i>	66,7	78,9	$p = 0,488$
<i>agg</i>	61,9	84,2	$p = 0,163$
<i>ace</i>	100	100	-
<i>efaA</i>	100	100	-

Nota: *Valor de significância $p < 0,05$.

A análise do operon da cápsula demonstrou a presença dos 3 polimorfismos CPS entre os 40 isolados de *E. faecalis* (Figura 3). Houve uma associação entre os isolados de pacientes hospitalizados e cepas CPS 5 ($p = 0,002$), que apresentavam os genes essenciais para a produção de cápsula. Estas cepas pertenciam ao CC2 e estavam associadas a um perfil genotípico de virulência e resistência. Em contraste, o tipo mais comum entre os isolados endodônticos foi CPS 1 (61,9%), não produtores de cápsula, pertencentes principalmente ao CC25. Por sua vez, cepas CPS 2 e 5 foram identificadas em baixa prevalência entre os isolados endodônticos,

28,6% e 9,5%, respectivamente (Figura 4). Os isolados endodônticos CPS 2 não apresentaram um maior número de genes de virulência/resistência quando comparados aos outros isolados endodônticos.

Figura 3 - Produtos de PCR dos 3 polimorfismos do operon da cápsula: um produto de amplificação de 950 pb de uma cepa CPS 1; um produto 1.098 pb indicando a presença do gene *cpsF*, característico de CPS 2; e um produto de 199 pb, indicando a presença *cpsE*, *cpsG* e a ausência de *cpsF*, características do polimorfismo CPS 5. M = peso molecular 100 pb.

Figura 4 - Distribuição dos tipos de polimorfismos do operon da cápsula (CPS); genes que conferem resistência antimicrobiana; genes da PAI e outros genes associados à virulência em 40 cepas de *E. faecalis*: 21 isolados endodônticos (RC) e 19 isolados médicos (M) de infecções sistêmicas.

5 DISCUSSÃO

O insucesso do tratamento endodôntico, que é evidenciado por periodontites apicais persistentes após o tratamento, é frequentemente causado por micro-organismos que resistem ao tratamento convencional ou acessaram os canais radiculares através de infiltração coronária após o tratamento (ANDERSON et al., 2012; ROCAS; SIQUEIRA; et al., 2004). *E. faecalis* é a espécie mais frequentemente detectada nesses casos (GOMES et al., 2006; ROCAS; SIQUEIRA; et al., 2004; SEDGLEY; BUCK; APPELBE, 2006), entretanto, seu papel na etiopatogenia da doença ainda não foi determinado (ANDERSON et al., 2012). De acordo com a literatura, até o início do desenvolvimento do presente estudo, este foi o primeiro trabalho que comparou o perfil genético de cepas de *E. faecalis* isoladas de casos de insucesso do tratamento endodôntico e isolados não orais, com o objetivo de investigar a origem dessas cepas no canal radicular e seu possível papel na infecção endodôntica através do conhecimento do seu perfil de virulência.

O amplo polimorfismo genético e fenotípico observado em *E. faecalis* confere a esses microrganismos fatores de virulência que permitem sua sobrevivência e adaptação a diversos ambientes (PINHEIRO et al., 2006; SEDGLEY et al., 2004; SEDGLEY et al., 2005). A associação de múltiplos fatores de virulência dentro de certos grupos de cepas é altamente sugestiva da existência de linhagens patogênicas dentro da espécie (MCBRIDE et al., 2007). Estudos prévios utilizando MLST para diferenciar isolados médicos de *E. faecalis* identificaram clusters virulentos particularmente adaptados ao ambiente hospitalar, associados a diversos fatores de virulência e resistência a antibióticos, denominados complexos clonais enterocócicos de alto risco (*high-risk enterococcal clonal complexes* – HiRECC) (KAWALEC et al., 2007; MCBRIDE et al., 2007; RUIZ-GARBAJOSA et al., 2006). No presente estudo, 47,6% dos isolados de infecções sistêmicas de pacientes hospitalizados foram classificados como ST2. Tanto ST2 quanto ST6, que compreendiam 57,1% dos isolados de pacientes hospitalizados, pertenciam ao CC2, considerado um HiRECC.

O CC2 não foi detectado entre as cepas endodônticas estudadas, o que está de acordo com estudos utilizando MLST que analisaram amostras principalmente de periodontite marginal (SUN et al., 2009). Em contraste ao encontrado entre os isolados de pacientes hospitalizados, a maioria dos isolados endodônticos não fazia

parte de um complexo clonal, sendo caracterizados em 13 STs diferentes. Do total, 42,8% dos isolados pertenciam ao CC25, encontrado previamente entre amostras da cavidade oral (SUN et al., 2009), porém raramente encontrado em infecções não orais (FREITAS et al., 2009; MCBRIDE et al., 2009). O presente estudo foi o primeiro a determinar um complexo clonal entre isolados endodônticos de *E. faecalis*. O CC25 foi recentemente detectado em amostras de alimentos, especialmente em queijos contaminados com *E. faecalis* (JAMET et al., 2012). Esse achado suporta a hipótese de que cepas de *E. faecalis* encontradas nos sistemas de canais dentários provavelmente são de origem exógena (VIDANA et al., 2011; ZEHNDER; GUGGENHEIM, 2009). Estudo prévio mostrou que isolados do canais radiculares não apresentavam similaridade genética com isolados da microbiota comensal dos pacientes. Portanto, uma possível fonte de *E. faecalis* no canal radicular é a contaminação por cepas provenientes de alimentos, que geralmente são transientes na cavidade oral, mas podem tornar-se colonizadores do sistema de canais (VIDANA et al., 2011; ZEHNDER; GUGGENHEIM, 2009).

As amostras pertencentes ao CC2 encontradas entre os isolados de pacientes hospitalizados carregavam diversos genes associados à virulência e a resistência a antibióticos, quando comparadas ao restante. Estes isolados carregavam no mínimo 6 genes associados à resistência antimicrobiana. Todos isolados do CC2 continham genes que conferiam resistência a vancomicina, altos níveis de aminoglicosídeos e cloranfenicol. Também foi encontrada uma alta prevalência de resistência a eritromicina (91,7%) nos isolados do CC2. Estes dados corroboram com o encontrado na literatura, onde amostras pertencentes ao CC2 são mais resistentes a antibióticos (MCBRIDE et al., 2007).

O aumento no uso terapêutico de vancomicina foi seguido por um aumento contínuo e linear na prevalência de enterococos resistentes à vancomicina (VRE) identificados entre isolados clínicos. Sua rápida disseminação resultou em um aumento na porcentagem de infecções nosocomiais por VRE (CETINKAYA; FALK; MAYHALL, 2000). O presente estudo mostrou uma alta prevalência de *vanA* entre os isolados de pacientes hospitalizados, tendo sido detectado em 94,7% (18/19) destes, concordando com achados prévios (KOWALSKA-KROCHMAL et al., 2011; MCBRIDE et al., 2007; SHARIFI et al., 2012). Além disso, 89,5% (17/19) dos isolados de pacientes hospitalizados *vanA* positivos também portavam *ermB*. Já foi mostrado previamente que ambos os genes estão localizados no mesmo plasmídeo

(UTTLEY et al., 1989) e a associação entre resistência a vancomicina e eritromicina já foi anteriormente descrita em amostras de alimentos (NOVAIS et al., 2005). Em contraste com os isolados médicos, o gene *vanA* não foi detectado entre nossos isolados endodônticos. Dados similares foram encontrados em estudos prévios em isolados de infecções orais (DAHLEN et al., 2012; JUNGEMANN et al., 2011; LINS et al., 2013; REYNAUD AF GEIJERSSTAM et al., 2006).

A resistência aos aminoglicosídeos está amplamente difundida entre as cepas de *E. faecalis* isoladas de pacientes hospitalizados. Neste estudo, foram analisados 3 genes que conferem resistência aos aminoglicosídeos: *aa6'-aph2''*, que confere alto nível de resistência à gentamicina e a praticamente todos os aminoglicosídeos, com exceção da estreptomicina; *aph(3')-IIIa*, conferindo resistência a kanamicina; e *ant(6)-Ia*, a estreptomicina. As cepas do CC2 carregavam esses 3 genes simultaneamente. A alta prevalência destes genes tem sido observada entre isolados hospitalares (LOPEZ et al., 2012; QUINONES PEREZ et al., 2011), isolados de alimentos (ASLAM et al., 2012) e isolados ambientais (RATHNAYAKE; HARGREAVES; HUYGENS, 2012). O gene *aa6'-aph2''* foi o mais prevalente entre os isolados de pacientes hospitalizados estudados. Em contraste, apenas um isolado endodôntico apresentava *aa6'-aph2''*, dado semelhante ao encontrado por Sun et al. (2011) ao analisar cepas de *E. faecalis* isoladas de periodontite crônica.

A resistência ao cloranfenicol também é comum em enterococos não orais (HOLLENBECK; RICE, 2012), o que coincide com nossos achados, onde apenas um dos isolados de pacientes hospitalizados não carregava o gene *cat*. A disseminação desse gene entre diferentes linhagens de *E. faecalis* foi observada entre isolados de diversas fontes (MCBRIDE et al., 2007). Por outro lado, o gene *cat* não foi detectado nos isolados endodônticos, concordando com estudos prévios que revelaram alta suscetibilidade a esse antibiótico em isolados de infecções endodônticas (PINHEIRO et al., 2004; SEDGLEY et al., 2005).

O gene de resistência antimicrobiana mais prevalente entre todos isolados estudados foi *ermB*, tendo sido detectado em 94,7% e 61,9% dos isolados sistêmicos e endodônticos, respectivamente. Estes dados corroboram com os achados de McBride et al. (2007), mostrando a disseminação de resistência a eritromicina entre diferentes linhagens de *E. faecalis*. Da mesma forma, o gene *tetM*, que confere resistência a tetraciclina, foi frequentemente detectado em isolados sistêmicos (63,2%) e endodônticos (57,1%), o que está de acordo com estudo prévio

de isolados de diversas origens (MCBRIDE et al., 2007). O gene *tetM* tem sido identificado entre *E. faecalis* resistentes a tetraciclina isolados de infecções endodônticas (ROSSI-FEDELE; ROBERTS, 2007; ROSSI-FEDELE et al., 2006). Em particular, aproximadamente 50% dos isolados endodônticos carregavam simultaneamente os genes *ermB* e *tetM*, concordando com achados prévios que mostraram que cepas orais de *E. faecalis* podem representar um reservatório de resistência à esses antibióticos (POETA et al., 2009; SUN; SONG, 2011; SUN et al., 2009; SUN et al., 2012). A ocorrência de múltipla resistência a eritromicina e tetraciclina provavelmente está associada à presença da família de transposons conjugativos Tn916-Tn545, que carregam *ermB* e *tetM* (ROBERTS; MULLANY, 2009). A ocorrência de multirresistência a eritromicina e a tetraciclina também foi observada também por Aarestrup et al. (2000), ao analisarem amostras fecais de humanos, aves e suínos.

No presente estudo, os genes *tetL*, *vanB* e *blaZ* não foram detectados entre as 40 cepas de *E. faecalis* analisadas. A presença de *tetL* tem sido identificada em baixa prevalência entre cepas de *E. faecalis* causadoras de infecção (7%), isoladas de pacientes hospitalizados (12,3%) e isoladas de periodontite crônica (4,2%), sendo *tetM* mais prevalente (LINS et al., 2013; MCBRIDE et al., 2007; QUINONES PEREZ et al., 2011; SUN et al., 2012). Da mesma forma, estudos revelaram uma baixa prevalência de *vanB* e *blaZ* entre amostras clínicas de diversas fontes (MCBRIDE et al., 2007; RATHNAYAKE et al., 2012) e a ausência desses genes em isolados de infecções endodônticas (JUNGERMANN et al., 2011; LINS et al., 2013).

Estudos demonstraram que *Enterococcus* spp. com maior virulência são geralmente isolados médicos (FISHER; PHILLIPS, 2009; MCBRIDE et al., 2007). Esse fato também foi observado nas 40 cepas de *E. faecalis* da nossa coleção, onde os isolados de pacientes hospitalizados carregavam mais genes associados à virulência do que os isolados endodônticos; principalmente as cepas do CC2, onde foram detectados no mínimo 7 genes de virulência. Como citado anteriormente, cepas pertencentes à HiRECCs estão associadas a resistência a múltiplas drogas, como também a uma variedade de fatores de virulência (MCBRIDE et al., 2007).

Diversos fatores de virulência encontrados em *E. faecalis* fazem parte de sua PAI, que codifica 129 ORFs (*open reading frames*), incluindo traços de virulência conhecidos como a proteína Esp e a citolisina (MCBRIDE et al., 2009). A proteína de superfície de enterococos (Esp) está envolvida na colonização e persistência no sítio

de infecção (SHANKAR et al., 2001). Por sua vez, o gene *esp*, foi encontrado na maioria dos isolados hospitalares (73,7%) e endodônticos (57,1%). Resultados similares foram encontrados quando comparadas cepas de infecções sistêmicas com cepas comensais (SHANKAR et al., 2001). Esses achados também confirmam estudos prévios que encontraram uma alta prevalência do gene *esp* em isolados endodônticos, sugerindo que a proteína Esp possa ser um potencial fator de virulência, participando da colonização dos canais radiculares (SEDGLEY et al., 2005; ZOLETTI et al., 2011).

A citolisina é produzida por um processo complexo que envolve diferentes genes dentro do operon da citolisina (*cylA*, *cylB*, *cylM*, *cylL_L* e *cylL_S*), que são essenciais para sua produção e sua presença é indicativa de produção dessa enzima (HALLGREN et al., 2009). Estes genes foram detectados em 47,4% dos isolados de pacientes hospitalizados, mais precisamente em cepas ST2, pertencentes ao CC2. A distribuição de *cyl* em linhagens específicas de *E. faecalis* sugerem a associação de citolisina a infecções severas, como reportado em estudos prévios (ELSNER et al., 2000; MUNDY et al., 2000; VERGIS et al., 2002). Por outro lado, estes genes não foram detectados nas cepas endodônticas estudadas, o que está de acordo com Sedgley et al. (2005), que não encontraram isolados hemolíticos entre as amostras de *E. faecalis* endodônticas. Esses achados sugerem que a citolisina pode não ter relevância na patogenicidade de infecções endodônticas.

Genes homólogos a fatores de virulência de outras bactérias também são encontrados na PAI de *E. faecalis*, como *psaA* e *nuc1*, que codificam uma proteína homóloga à de *Streptococcus pneumoniae* e uma nuclease homóloga à de estafilococos, respectivamente (MCBRIDE et al., 2007; RAJAM et al., 2008). Ambos foram detectados em alta prevalência entre os isolados de pacientes hospitalizados no presente estudo. Esse achado está de acordo com os dados obtidos por McBride et al. (2007), que detectaram estes genes em linhagens de cepas não orais de diferentes fontes. Por outro lado, *psaA* não foi detectado entre os isolados endodônticos estudados e apenas 1 destes continha *nuc1*. A ausência desses genes na maioria dos isolados endodônticos sugere que estes genes podem não ser relevantes para adaptação no sistema de canais radiculares.

Outro gene detectado apenas entre isolados de pacientes hospitalizados, especialmente em cepas ST2 (CC2), foi *gls24-like*, relacionado a respostas ao estresse e a inativação de sais biliares (GIARD et al., 2002). Esse dado também

corroborar com o encontrado por McBride et al. (2007), onde este gene foi detectado em maior prevalência em amostras do CC2 e raramente no restante das amostras estudadas. Além disso, a ocorrência de *gls24-like* e *cyl* apenas em cepas ST2 fornece evidências de que essa linhagem pode ser especialmente adepta a aquisição de genes exógenos através de recombinação (MCBRIDE et al., 2007).

Por sua vez, o gene *cbh*, que também está associado à resistência aos sais biliares, foi mais prevalente entre os isolados endodônticos (76,2%) do que entre os isolados de pacientes hospitalizados (15,8%). Esses resultados são similares aos encontrados por McBride et al. (2007) em cepas não causadoras de infecções, sugerindo que a hidrolase do sal biliar pode ter um importante papel na existência comensal de muitas linhagens de *E. faecalis*.

No presente estudo, foram investigados outros genes que codificam fatores de virulência que podem ser importantes nas infecções endodônticas, a saber: *ace* (adesina ao colágeno de enterococos), *efa* (antígeno da endocardite), *agg* (substância de agregação), *gelE* (gelatinase) e *ef1841/fsrC* (determinante do fenótipo gelatinase-negativo). A prevalência dos genes *ace*, *efa* e *agg*, que codificam fatores de adesão, foi alta nos isolados médicos. É conhecido que a expressão simultânea de citolisina e fatores associados à adesão resultam em um aumento na patogenicidade de *E. faecalis* (SHEPARD; GILMORE, 2002). A presença dos genes associados à expressão dessas proteínas e enzima foram detectados simultaneamente em 75% dos isolados do CC2, sendo mais uma evidência da alta capacidade de virulência de cepas dessa linhagem. Uma alta prevalência dos genes relacionados à adesão também foi observada entre os isolados endodônticos, o que está de acordo com estudos prévios (SEDGLEY et al., 2005; ZOLETTI et al., 2011). A expressão de fatores de adesão, como Ace e Agg, podem facilitar a persistência de *E. faecalis* nos canais radiculares, uma vez que esses fatores podem aumentar a adesão ao colágeno (SEDGLEY et al., 2005).

A presença do gene *gelE* e a ausência de *ef1841/fsrC* (determinante do fenótipo gelatinase-negativo) é sugestiva da capacidade de produção de gelatinase, que é uma metaloproteínase capaz de promover hidrólise de gelatina, colágeno e fibrinogênio (FISHER; PHILLIPS, 2009). Esse padrão (*gelE*⁺/*fsrC*) foi observado em 78,9% dos isolados de pacientes hospitalizados e em 66,6% dos isolados endodônticos, sugerindo que a produção de gelatinase possa contribuir para patogênese do *E. faecalis* tanto nas infecções sistêmicas quanto endodônticas. A

alta prevalência de cepas *gelE*⁺/*fsrC*⁻ entre os isolados endodônticos está de acordo com achados prévios (SEDGLEY et al., 2005; ZOLETTI et al., 2011).

A expressão do gene *gelE* também tem sido associada à formação de biofilme, juntamente com outros genes, como o gene *esp* (MOHAMED; HUANG, 2007). No presente estudo foi encontrado que 52,6% dos isolados de infecções hospitalares e 28,6% dos isolados endodônticos apresentavam simultaneamente os dois genes, *gelE* e *esp*. A maioria dos *E. faecalis* endodônticos apresentava apenas um desses dois genes, o que está de acordo com achados prévios de isolados endodônticos, sugerindo que Esp pode agir com uma via alternativa à gelatinase no processo de colonização dos canais radiculares (ZOLETTI et al., 2011).

Um outro dado investigado neste estudo foi o polimorfismo do operon da cápsula. Estudos prévios demonstraram que cepas de *E. faecalis* produtoras de cápsula são mais resistentes a respostas imunológicas do hospedeiro, quando comparadas a cepas não capsuladas (THURLOW; THOMAS; FLEMING; et al., 2009). Além disso, a presença de cápsula tem sido associada a linhagens patogênicas de *E. faecalis* isolados de pacientes hospitalizados (MCBRIDE et al., 2007). Da mesma maneira, no presente estudo, todos os isolados de pacientes hospitalizados pertencentes ao CC2, além de carregarem diversos genes de virulência e resistência antimicrobiana, também foram associados à presença de cápsula, sendo classificados principalmente como CPS 5. Nossos achados indicam a presença de clusters virulentos particularmente adaptados ao ambiente hospitalar, como mostrado em estudos prévios (D'AZEVEDO et al., 2008; FREITAS et al., 2009; MCBRIDE et al., 2007). Em contraste, a maioria dos isolados endodônticos foram identificados como CPS 1 (indicativo da falta de produção de cápsula), com pequena quantidade de genes de virulência/resistência (MCBRIDE et al., 2007). Diferentemente das cepas de infecções sistêmicas, nossos isolados endodônticos CPS 2 e 5 não carregavam maior número de genes de virulência/resistência do que outras linhagens. Esse dado sugere que as variações na PAI ocorrem independentemente de outras regiões do cromossomo, incluindo o operon *cps*, o que está de acordo com achados prévios (MCBRIDE et al., 2009; MCBRIDE et al., 2007). Além disso, nossos dados suportam a hipótese de que o conteúdo genético da PAI de *E. faecalis* é altamente variável e dependente das condições ambientais em que a bactéria vive (GAL-MOR; FINLAY, 2006; MCBRIDE et al., 2009).

O presente estudo investigou isolados de *E. faecalis* de diferentes origens através da análise de MLST, dos determinantes de resistência antimicrobiana, dos genes da PAI, de outros genes associados à virulência e do polimorfismo do operon da cápsula. Baseado nesses dados, este estudo demonstrou que existem diferenças genéticas entre *E. faecalis* isolados de canais radiculares infectados e de pacientes hospitalizados. As análises de MLST revelaram que os isolados do CC2 são comuns em pacientes hospitalizados e os do CC25 em infecções endodônticas. Além da presença de isolados pertencentes CC2, que codificam genes para a produção de cápsula e são ricos em genes da PAI e de resistência a antibióticos, não foi identificado nenhum cluster virulento entre os isolados estudados. A variação genética existente entre isolados de *E. faecalis* de diferentes origens clínicas dá-se provavelmente devido a especialização ao nicho de colonização, conferida principalmente por elementos genéticos variáveis, incluindo a PAI. A maioria dos genes da PAI estudados parece ser importante para sobrevivência ou colonização em infecções hospitalares e não endodônticas, com exceção do gene *esp*, que estava presente na maioria dos isolados hospitalares e endodônticos. Esse dado sugere que a proteína Esp possa contribuir para colonização de *E. faecalis* em diferentes nichos, incluindo os canais radiculares. Da mesma forma, os genes associados à adesão (*ace*, *efa* e *agg*) e à formação de biofilme (*gelE*) foram prevalentes tanto em cepas hospitalares quanto endodônticas. Portanto, em infecções de canal radicular, esses fatores de virulência podem contribuir para a patogênese da doença pós-tratamento. Além disso, algumas cepas de *E. faecalis* endodônticas também podem produzir uma cápsula antifagocítica, o que pode contribuir na evasão do sistema imune e auxiliar na sustentação de uma infecção a longo prazo.

6 CONCLUSÕES

Dentro das condições experimentais do presente estudo e com base nos resultados, pôde-se concluir que:

- *E. faecalis* isolados de canais de dentes com insucesso do tratamento endodôntico apresentaram uma grande diversidade genética, com um perfil genotípico similar a de cepas comensais e diferente dos clusters patogênicos de pacientes hospitalizados;
- isolados de infecções sistêmicas de pacientes hospitalizados apresentaram uma ilha de patogenicidade (PAI) rica em seu conteúdo genético e um grande número de genes de resistência antimicrobiana, enquanto os isolados de infecções endodônticas carregavam poucos desses genes;
- isolados de infecções endodônticas apresentaram determinantes virulentos relacionados a adesão que podem contribuir para colonização dos canais radiculares.

REFERÊNCIAS*

- AARESTRUP, F. M. et al. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 37, n. 2, p. 127-137, 2000.
- ANDERSON, A. C. et al. Comprehensive analysis of secondary dental root canal infections: a combination of culture and culture-independent approaches reveals new insights. **PloS One**, v. 7, n. 11, p. e49576, 2012.
- ARIAS, C. A.; MURRAY, B. E. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 266-278, 2012.
- ASLAM, M. et al. Characterization of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus* spp. isolated from retail meats in Alberta, Canada. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, n. 3, p. 222-230, 2012.
- BEGLEY, M.; GAHAN, C. G.; HILL, C. The interaction between bacteria and bile. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 4, p. 625-651, 2005.
- BERENDS, E. T. et al. Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps. **Journal of Innate Immunity**, v. 2, n. 6, p. 576-586, 2010.
- BISWAS, T. et al. The structural basis for substrate versatility of chloramphenicol acetyltransferase CATI. **Protein Science: A Publication of The Protein Society**, v. 21, n. 4, p. 520-530, 2012.
- BUHNIK-ROSENBLAU, K. et al. Biodiversity of *Enterococcus faecalis* based on genomic typing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 165, n. 1, p. 27-34, 2013.
- CERCENADO, E. [*Enterococcus*: phenotype and genotype resistance and epidemiology in Spain]. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 29 Supl 5, p. 59-65, 2011.
- CETINKAYA, Y.; FALK, P.; MAYHALL, C. G. Vancomycin-resistant enterococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 4, p. 686-707, 2000.
- CHAIKEN, I. M.; ANFINSEN, C. B. Solic phase synthetic study of the active site region of staphylococcal nuclease-T'. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 246, n. 7, p. 2285-2290, 1971.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CHOW, J. W. Aminoglycoside resistance in enterococci. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of The Infectious Diseases Society of America**, v. 31, n. 2, p. 586-589, 2000.

CONNELL, S. R. et al. Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 12, p. 3675-3681, 2003.

COOPER, J. E.; FEIL, E. J. Multilocus sequence typing--what is resolved? **Trends in Microbiology**, v. 12, n. 8, p. 373-377, 2004.

CRETI, R. et al. Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, n. pt. 1, p. 13-20, 2004.

D'AZEVEDO, P. A. et al. Molecular characterization of vancomycin-resistant Enterococci strains eight years apart from its first isolation in Sao Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, n. 4, p. 195-198, 2008.

DAHLEN, G. et al. Virulence factors and antibiotic susceptibility in enterococci isolated from oral mucosal and deep infections. **Journal of Oral Microbiology**, v. 4, 2012.

DAY, A. M.; COVE, J. H.; PHILLIPS-JONES, M. K. Cytolysin gene expression in *Enterococcus faecalis* is regulated in response to aerobiosis conditions. **Molecular Genetics and Genomics: MGG**, v. 269, n. 1, p. 31-39, 2003.

DI ROSA, R. et al. Relationship between biofilm formation, the enterococcal surface protein (Esp) and gelatinase in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 256, n. 1, p. 145-150, 2006.

DJAHMI, N. et al. Molecular epidemiology of *Enterococcus* sp. isolated in a university hospital in Algeria. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 44, n. 9, p. 656-662, 2012.

DWORNICZEK, E. et al. *Enterococcus* in wound infections: virulence and antimicrobial resistance. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 59, n. 2, p. 263-269, 2012.

EATON, T. J.; GASSON, M. J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 1628-1635, 2001.

ELSNER, H. A. et al. Virulence factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* blood culture isolates. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of The European Society of Clinical Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 39-42, Jan 2000.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, v. 155, n. Pt 6, p. 1749-1757, 2009.

FREITAS, A. R. et al. Clonal expansion within clonal complex 2 and spread of vancomycin-resistant plasmids among different genetic lineages of *Enterococcus faecalis* from Portugal. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 6, p. 1104-1111, 2009.

GAL-MOR, O.; FINLAY, B. B. Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 11, p. 1707-1719, 2006.

GIARD, J. C. et al. Glucose starvation response in *Enterococcus faecalis* JH2-2: survival and protein analysis. **Research in Microbiology**, v. 148, n. 1, p. 27-35, 1997.

GIARD, J. C. et al. Inactivation of the stress- and starvation-inducible *gls24* operon has a pleiotrophic effect on cell morphology, stress sensitivity, and gene expression in *Enterococcus faecalis*. **Journal of bacteriology**, v. 182, n. 16, p. 4512-20, Aug 2000.

GIARD, J. C. et al. Characterization of genes homologous to the general stress-inducible gene *gls24* in *Enterococcus faecalis* and *Lactococcus lactis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 206, n. 2, p. 235-239, 2002.

GOMES, B. P. et al. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 5, p. 537-540, 2008.

GOMES, B. P. et al. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 102, n. 2, p. 247-253, 2006.

HAAS, W.; SHEPARD, B. D.; GILMORE, M. S. Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction. **Nature**, v. 415, n. 6867, p. 84-87, 2002.

HACKER, J.; KAPER, J. B. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, p. 641-679, 2000.

HALLGREN, A. et al. Molecular detection of aggregation substance, enterococcal surface protein, and cytolysin genes and in vitro adhesion to urinary catheters of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* of clinical origin. **International Journal of Medical Microbiology: IJMM**, v. 299, n. 5, p. 323-332, 2009.

HAN, D. et al. The occurrence of virulence traits among high-level aminoglycosides resistant *Enterococcus* isolates obtained from feces of humans, animals, and birds in South Korea. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 3, p. 387-392, 2011.

HANCOCK, L. E.; GILMORE, M. S. The capsular polysaccharide of *Enterococcus faecalis* and its relationship to other polysaccharides in the cell wall. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 3, p. 1574-1579, 2002.

HANCOCK, L. E.; PEREGO, M. The *Enterococcus faecalis* *fsr* two-component system controls biofilm development through production of gelatinase. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 17, p. 5629-5639, 2004.

HASANI, A. et al. Molecular screening of virulence genes in high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from clinical specimens in Northwest Iran. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 175-181, 2012.

HEGSTAD, K. et al. Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of The European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. 541-554, 2010.

HEW, C. M.; KORAKLI, M.; VOGEL, R. F. Expression of virulence-related genes by *Enterococcus faecalis* in response to different environments. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 30, n. 4, p. 257-267, 2007.

HIDRON, A. I. et al. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. **Infection Control and Hospital Epidemiology: The Official Journal of The Society of Hospital Epidemiologists of America**, v. 29, n. 11, p. 996-1011, 2008.

HOFMANN, A. F.; HAGEY, L. R. Bile acids: chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics. **Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS**, v. 65, n. 16, p. 2461-2483, 2008.

HOLLENBECK, B. L.; RICE, L. B. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. **Virulence**, v. 3, n. 5, p. 421-433, 2012.

HUBBLE, T. S. et al. Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 18, n. 2, p. 121-126, 2003.

JAMET, E. et al. Prevalence and characterization of antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* in French cheeses. **Food Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 191-198, 2012.

JETT, B. D.; GILMORE, M. S. The growth-inhibitory effect of the *Enterococcus faecalis* bacteriocin encoded by pAD1 extends to the oral streptococci. **Journal of Dental Research**, v. 69, n. 10, p. 1640-1645, 1990.

JETT, B. D.; HUYCKE, M. M.; GILMORE, M. S. Virulence of enterococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, n. 4, p. 462-478, 1994.

JOHANSSON, D.; RASMUSSEN, M. Virulence factors in isolates of *Enterococcus faecalis* from infective endocarditis and from the normal flora. **Microbial Pathogenesis**, v. 55, p. 28-31, 2013.

JUNGERMANN, G. B. et al. Antibiotic resistance in primary and persistent endodontic infections. **Journal of Endodontics**, v. 37, n. 10, p. 1337-1344, 2011.

KAWALEC, M. et al. Clonal structure of *Enterococcus faecalis* isolated from Polish hospitals: characterization of epidemic clones. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 147-153, 2007.

KAYAOGU, G.; ORSTAVIK, D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine: An Official Publication of The American Association of Oral Biologists**, v. 15, n. 5, p. 308-320, 2004.

KOCH, S. et al. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. **Vaccine**, v. 22, n. 7, p. 822-830, 2004.

KOWALSKA-KROCHMAL, B. et al. Resistance patterns and occurrence of virulence determinants among GRE strains in southwestern Poland. **Advances in Medical Sciences**, v. 56, n. 2, p. 304-310, 2011.

LATASA, C. et al. Biofilm-associated proteins. **C R Biol**, v. 329, n. 11, p. 849-57, Nov 2006.

LEBRETON, F. et al. D-Ala-d-Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 10, p. 4606-4612, 2011.

LEBRETON, F. et al. ace, Which encodes an adhesin in *Enterococcus faecalis*, is regulated by Ers and is involved in virulence. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 7, p. 2832-2839, 2009.

LENZ, C. A.; HEW FERSTL, C. M.; VOGEL, R. F. Sub-lethal stress effects on virulence gene expression in *Enterococcus faecalis*. **Food Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 317-326, 2010.

LINS, R. X. et al. Antimicrobial resistance and virulence traits of *Enterococcus faecalis* from primary endodontic infections. **Journal of Dentistry**, Jul 11 2013.

LOPEZ, M. et al. Diversity of clones and genotypes among vancomycin-resistant clinical *Enterococcus* isolates recovered in a Spanish hospital. **Microbial Drug Resistance**, v. 18, n. 5, p. 484-491, 2012.

LOWE, A. M.; LAMBERT, P. A.; SMITH, A. W. Cloning of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen: homology with adhesins from some oral streptococci. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 2, p. 703-706, 1995.

LYSAKOWSKA, M. E.; SMIGIELSKI, J.; DENYS, A. [Occurrence of virulence genes among *Enterococcus faecalis* strains isolated from patients and hospital environment]. **Medycyna Doswiadczalna i Mikrobiologia**, v. 61, n. 2, p. 125-132, 2009.

MAIDEN, M. C. et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 6, p. 3140-3145, 1998.

MANSON, J. M.; HANCOCK, L. E.; GILMORE, M. S. Mechanism of chromosomal transfer of *Enterococcus faecalis* pathogenicity island, capsule, antimicrobial resistance, and other traits. **Proceedings of The National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 27, p. 12269-12274, 2010.

MCBRIDE, S. M. et al. Genetic variation and evolution of the pathogenicity island of *Enterococcus faecalis*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 10, p. 3392-3402, 2009.

MCBRIDE, S. M. et al. Genetic diversity among *Enterococcus faecalis*. **PloS One**, v. 2, n. 7, p. e582, 2007.

MERRITT, M. E.; DONALDSON, J. R. Effect of bile salts on the DNA and membrane integrity of enteric bacteria. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. pt. 12, p. 1533-1541, 2009.

MIYAZAKI, S. et al. Cytotoxic effect of hemolytic culture supernatant from *Enterococcus faecalis* on mouse polymorphonuclear neutrophils and macrophages. **Microbiology and Immunology**, v. 37, n. 4, p. 265-270, 1993.

MOELLERING, R. C., JR.; WEINBERG, A. N. Studies on antibiotic synerism against enterococci. II. Effect of various antibiotics on the uptake of 14 C-labeled streptomycin by enterococci. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 50, n. 12, p. 2580-2584, 1971.

MOHAMED, J. A.; HUANG, D. B. Biofilm formation by enterococci. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. Pt 12, p. 1581-1588, 2007.

MOLANDER, A. et al. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. **International Endodontic Journal**, v. 31, n. 1, p. 1-7, 1998.

MUNDY, L. M.; SAHM, D. F.; GILMORE, M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 4, p. 513-522, 2000.

NAIR, P. N. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. **Periodontology 2000**, v. 13, p. 121-148, 1997.

NAKAYAMA, J.; KARIYAMA, R.; KUMON, H. Description of a 23.9-kilobase chromosomal deletion containing a region encoding *fsr* genes which mainly determines the gelatinase-negative phenotype of clinical isolates of *Enterococcus faecalis* in urine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 3152-3155, 2002.

NALLAPAREDDY, S. R. et al. Molecular typing of selected *Enterococcus faecalis* isolates: pilot study using multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 868-876, 2002.

NALLAPAREDDY, S. R.; MURRAY, B. E. Ligand-signaled upregulation of *Enterococcus faecalis* *ace* transcription, a mechanism for modulating host-*E. faecalis* interaction. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 9, p. 4982-4989, 2006.

NALLAPAREDDY, S. R. et al. Relative contributions of Ebp Pili and the collagen adhesin *ace* to host extracellular matrix protein adherence and experimental urinary tract infection by *Enterococcus faecalis* OG1RF. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 7, p. 2901-2910, 2011.

NALLAPAREDDY, S. R. et al. Molecular characterization of a widespread, pathogenic, and antibiotic resistance-receptive *Enterococcus faecalis* lineage and dissemination of its putative pathogenicity island. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 16, p. 5709-5718, 2005.

NANNINI, E. C. et al. Decreased virulence of a *gls24* mutant of *Enterococcus faecalis* OG1RF in an experimental endocarditis model. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 11, p. 7772-7774, 2005.

NOVAIS, C. et al. High occurrence and persistence of antibiotic-resistant enterococci in poultry food samples in Portugal. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 1139-1143, 2005.

PINHEIRO, E. T. et al. Phenotypic and genotypic identification of enterococci isolated from canals of root-filled teeth with periapical lesions. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 21, n. 3, p. 137-144, 2006.

PINHEIRO, E. T. et al. Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolated from canals of root filled teeth with periapical lesions. **International Endodontic Journal**, v. 37, n. 11, p. 756-763, 2004.

PINHEIRO, E. T. et al. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. **International Endodontic Journal**, v. 36, n. 1, p. 1-11, 2003.

POETA, P. et al. Influence of oral hygiene in patients with fixed appliances in the oral carriage of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* and *Enterococcus* isolates. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 108, n. 4, p. 557-564, 2009.

POULSEN, L. L. et al. *Enterococcus faecalis* clones in poultry and in humans with urinary tract infections, Vietnam. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 7, p. 1096-1100, 2012.

PREETHEE, T.; KANDASWAMY, D.; HANNAH, R. Molecular identification of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen efaA in root canals of therapy-resistant endodontic infections. **Journal of Conservative Dentistry**, v. 15, n. 4, p. 319-322, 2012.

QUINONES, D.; KOBAYASHI, N.; NAGASHIMA, S. Molecular epidemiologic analysis of *Enterococcus faecalis* isolates in Cuba by multilocus sequence typing. **Microbial Drug Resistance**, v. 15, n. 4, p. 287-293, 2009.

QUINONES PEREZ, D. et al. [Antimicrobial susceptibility and genetic bases for resistance of infection-causing *Enterococcus* strains in Cuba]. **Revista Panamericana de Salud Publica = Pan American Journal of Public Health**, v. 30, n. 6, p. 549-554, 2011.

RAJAM, G. et al. Pneumococcal surface adhesin A (PsaA): a review. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 34, n. 3-4, p. 163-173, 2008.

RATHNAYAKE, I.; HARGREAVES, M.; HUYGENS, F. SNP diversity of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in a South East Queensland waterway, Australia, and associated antibiotic resistance gene profiles. **BMC Microbiology**, v. 11, p. 201, 2011.

RATHNAYAKE, I. U.; HARGREAVES, M.; HUYGENS, F. Antibiotic resistance and virulence traits in clinical and environmental *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 35, n. 5, p. 326-233, 2012.

REYNAUD AF GEIJERSSTAM, A. et al. Comparative analysis of virulence determinants and mass spectral profiles of Finnish and Lithuanian endodontic *Enterococcus faecalis* isolates. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 22, n. 2, p. 87-94, 2007.

REYNAUD AF GEIJERSSTAM, A. H. et al. Antimicrobial susceptibility and molecular analysis of *Enterococcus faecalis* originating from endodontic infections in Finland and Lithuania. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 21, n. 3, p. 164-168, 2006.

REYNOLDS, P. E. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of The European Society of Clinical Microbiology**, v. 8, n. 11, p. 943-950, 1989.

RICH, R. L. et al. Ace is a collagen-binding MSCRAMM from *Enterococcus faecalis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 38, p. 26939-26945, 1999.

ROBERTS, A. P.; MULLANY, P. A modular master on the move: the Tn916 family of mobile genetic elements. **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 6, p. 251-258, 2009.

ROBERTS, M. C. Update on acquired tetracycline resistance genes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 245, n. 2, p. 195-203, 2005.

ROBERTS, M. C. Environmental macrolide-lincosamide-streptogramin and tetracycline resistant bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 40, 2011.

ROCAS, I. N. et al. Polymerase chain reaction identification of microorganisms in previously root-filled teeth in a South Korean population. **Journal of Endodontics**, v. 30, n. 7, p. 504-508, 2004.

ROCAS, I. N.; SIQUEIRA, J. F., JR.; SANTOS, K. R. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. **Journal of Endodontics**, v. 30, n. 5, p. 315-320, 2004.

ROSSI-FEDELE, G.; ROBERTS, A. P. A preliminary study investigating the survival of tetracycline resistant *Enterococcus faecalis* after root canal irrigation with high concentrations of tetracycline. **International Endodontic Journal**, v. 40, n. 10, p. 772-777, 2007.

ROSSI-FEDELE, G. et al. Incidence and behaviour of Tn916-like elements within tetracycline-resistant bacteria isolated from root canals. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 21, n. 4, p. 218-222, 2006.

RUIZ-GARBAJOSA, P. et al. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of recombination. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 2220-2228, 2006.

SAHM, D. F. et al. In vitro susceptibility studies of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 33, n. 9, p. 1588-1591, 1989.

SCHWARZ, S. et al. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, n. 5, p. 519-542, 2004.

SEDGLEY, C.; BUCK, G.; APPELBE, O. Prevalence of *Enterococcus faecalis* at multiple oral sites in endodontic patients using culture and PCR. **Journal of Endodontics**, v. 32, n. 2, p. 104-109, Feb 2006.

SEDGLEY, C. M.; LENNAN, S. L.; CLEWELL, D. B. Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 19, n. 2, p. 95-101, 2004.

SEDGLEY, C. M. et al. Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic *Enterococcus* spp. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 20, n. 1, p. 10-19, 2005.

SHANKAR, N.; BAGHDAYAN, A. S.; GILMORE, M. S. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. **Nature**, v. 417, n. 6890, p. 746-750, 2002.

SHANKAR, N. et al. Enterococcal cytolysin: activities and association with other virulence traits in a pathogenicity island. **International Journal of Medical Microbiology: IJMM**, v. 293, n. 7-8, p. 609-618, 2004.

SHANKAR, N. et al. Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 7, p. 4366-4372, 2001.

SHANKAR, V. et al. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 1, p. 193-200, 1999.

SHARIFI, Y. et al. Survey of Virulence Determinants among Vancomycin Resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Isolated from Clinical Specimens of Hospitalized Patients of North west of Iran. **The Open Microbiology Journal**, v. 6, p. 34-39, 2012.

SHAW, J. H.; CLEWELL, D. B. Complete nucleotide sequence of macrolide-lincosamide-streptogramin B-resistance transposon Tn917 in *Streptococcus faecalis*. **Journal of Bacteriology**, v. 164, n. 2, p. 782-796, 1985.

SHEPARD, B. D.; GILMORE, M. S. Differential expression of virulence-related genes in *Enterococcus faecalis* in response to biological cues in serum and urine. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 8, p. 4344-4352, 2002.

SHIN, S. J. et al. Tissue levels of matrix metalloproteinases in pulps and periapical lesions. **Journal of Endodontics**, v. 28, n. 4, p. 313-315, 2002.

SILVA, J. et al. [Detection of virulence genes in aminoglycoside susceptible and resistant *Enterococcus faecalis*]. **Revista Chilena de Infectologia**, v. 30, n. 1, p. 17-22, 2013.

SINGH, K. V. et al. Importance of the collagen adhesin ace in pathogenesis and protection against *Enterococcus faecalis* experimental endocarditis. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 1, p. e1000716, 2010.

SIQUEIRA, J. F., JR.; ROCAS, I. N. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 97, n. 1, p. 85-94, 2004.

SOOD, S. et al. Enterococcal infections & antimicrobial resistance. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 128, n. 2, p. 111-121, 2008.

SUN, J.; SONG, X. Assessment of antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolated from chronic periodontitis in biofilm versus planktonic phase. **Journal of Periodontology**, v. 82, n. 4, p. 626-631, 2011.

SUN, J. et al. Occurrence, population structure, and antimicrobial resistance of enterococci in marginal and apical periodontitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 7, p. 2218-2225, 2009.

SUN, J.; SUNDSFJORD, A.; SONG, X. *Enterococcus faecalis* from patients with chronic periodontitis: virulence and antimicrobial resistance traits and determinants. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of The European Society of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 3, p. 267-272, 2012.

SUNDQVIST, G. et al. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 85, n. 1, p. 86-93, 1998.

TENG, F.; NANNINI, E. C.; MURRAY, B. E. Importance of *gls24* in virulence and stress response of *Enterococcus faecalis* and use of the GlS24 protein as a possible immunotherapy target. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 191, n. 3, p. 472-480, 2005.

THURLOW, L. R. et al. *Enterococcus faecalis* capsular polysaccharide serotypes C and D and their contributions to host innate immune evasion. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 12, p. 5551-5557, 2009.

THURLOW, L. R.; THOMAS, V. C.; HANCOCK, L. E. Capsular polysaccharide production in *Enterococcus faecalis* and contribution of CpsF to capsule serospecificity. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 20, p. 6203-6210, 2009.

TOMAYKO, J. F. et al. Comparison of the beta-lactamase gene cluster in clonally distinct strains of *Enterococcus faecalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 5, p. 1170-1174, 1996.

ULRICH, R. L.; HUGHES, T. A. A rapid procedure for isolating chromosomal DNA from *Lactobacillus* species and other Gram-positive bacteria. **Letters In Applied Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 52-56, 2001.

URWIN, R.; MAIDEN, M. C. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 479-487, 2003.

UTTLEY, A. H. et al. High-level vancomycin-resistant enterococci causing hospital infections. **Epidemiology and Infection**, v. 103, n. 1, p. 173-181, 1989.

VERGIS, E. N. et al. Association between the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin, and enterococcal surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of The Infectious Diseases Society of America**, v. 35, n. 5, p. 570-575, 2002.

VIDANA, R. et al. *Enterococcus faecalis* infection in root canals - host-derived or exogenous source? **Letters in Applied Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 109-115, 2011.

WANG, L. et al. Relationship of biofilm formation and *gelE* gene expression in *Enterococcus faecalis* recovered from root canals in patients requiring endodontic retreatment. **Journal of Endodontics**, v. 37, n. 5, p. 631-636, 2011.

WANG, Q. Q. et al. Prevalence of *Enterococcus faecalis* in saliva and filled root canals of teeth associated with apical periodontitis. **International Journal of Oral Science**, v. 4, n. 1, p. 19-23, 2012.

WILLIAMS, J. M. et al. Detection and quantitation of *E. faecalis* by real-time PCR (qPCR), reverse transcription-PCR (RT-PCR), and cultivation during endodontic treatment. **Journal of Endodontics**, v. 32, n. 8, p. 715-721, 2006.

ZEHNDER, M.; GUGGENHEIM, B. The mysterious appearance of enterococci in filled root canals. **International Endodontic Journal**, v. 42, n. 4, p. 277-287, 2009.

ZHANG, C. et al. Microbial diversity in failed endodontic root-filled teeth. **Chinese Medical Journal**, v. 125, n. 6, p. 1163-1168, 2012.

ZHU, X. et al. Prevalence, phenotype, and genotype of *Enterococcus faecalis* isolated from saliva and root canals in patients with persistent apical periodontitis. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 12, p. 1950-1955, 2010.

ZIMMERMANN, R. A.; MOELLERING, R. C., JR.; WEINBERG, A. N. Mechanism of resistance to antibiotic synergism in enterococci. **Journal of Bacteriology**, v. 105, n. 3, p. 873-879, 1971.

ZOLETTI, G. O. et al. Characterization of virulence factors and clonal diversity of *Enterococcus faecalis* isolates from treated dental root canals. **Research in Microbiology**, v. 162, n. 2, p. 151-158, 2011.

Capsule Locus Polymorphism among Distinct Lineages of *Enterococcus faecalis* Isolated from Canals of Root-filled Teeth with Periapical Lesions

Ericksa T. Pinheiro, PhD, MSc, BDS,* Pâmela P. Penas, BBiomedSc,* Marcos Endo, MSc, BDS,[†] Brenda P.F.A. Gomes, PhD, MSc, BDS,[†] and Marcia P.A. Mayer, PhD, MSc, BDS*

Abstract

Introduction: Although *Enterococcus faecalis* is a member of the normal microbiota, it is also a major cause of nosocomial infections. Some strains of *E. faecalis* produce capsule, which contributes to pathogenesis through evasion of host defenses, and its production is dependent on the capsule (*cps*) operon polymorphism. This study investigated *cps* locus polymorphism in distinct lineages of *E. faecalis* isolated from canals of root-filled teeth with periapical lesions.

Methods: Twenty-two *E. faecalis* isolates were evaluated regarding the *cps* operon polymorphism and genetic diversity. The 3 known CPS types were determined by polymerase chain reaction. This information was correlated with multilocus sequence typing data, which were used to define genetic lineages. **Results:** *cpsA* and *cpsB* were the only detected genes within the *cps* operon in 62.5% of *E. faecalis* strains (14/22), indicative of genotype CPS 1, which lacks capsule expression. The essential genes in the *cps* operon for capsule production were detected in the remaining strains, whereas 3 belonged to genotype CPS 5 and 5 strains to genotype CPS 2. A total of 14 sequence types (STs) were resolved in 22 *E. faecalis* isolates. Comparison with the *E. faecalis* international multilocus sequence typing database revealed that 9 STs were previously found, and that the 5 STs were novel. **Conclusions:** Certain *E. faecalis* genotypes from canals of root-filled teeth with periapical lesions belong to lineages associated with capsule expression and production of multiple virulence factors, which might account for their increased pathogenic potential. (*J Endod* 2012;38:58–61)

Key Words

Capsule, *Enterococcus faecalis*, genotypes, root canals

Enterococcus faecalis is a common inhabitant of the human gastrointestinal tract; however, multidrug-resistant strains are leading causes of hospital-acquired infections. The ability of *E. faecalis* to cause serious infections has been linked to variable traits that enhance the virulence of the organism, including aggregation substance, enterococcal surface protein Esp, endocarditis-associated and biofilm-associated pili Ebp, cytolysin toxin, and gelatinase (1). Recent studies have explored further mechanisms that *E. faecalis* uses to circumvent the host's innate immune response and establish infection (2, 3). It was shown that capsule-producing *E. faecalis* strains are more resistant to complement-mediated opsonophagocytosis than noncapsulated strains (2). Moreover, the presence of the capsule has been associated with the pathogenic lineages of *E. faecalis* isolated from hospitalized patients (4).

E. faecalis is able to colonize a variety of sites in humans, including the oral cavity. It is the most common bacterial species isolated or detected from canals of root-filled teeth with periapical lesions (5–7). Nevertheless, the question remains whether *E. faecalis* plays a role in the pathogenesis of apical periodontitis or is a mere survivor because of ecological selective pressure in root-filled teeth (8).

The apical periodontitis of root-filled teeth might develop or persist as a result of complex immune responses against the bacterial infection in the root canal system. Bacterial structural components might shed into the periradicular tissues and stimulate the development of host immune reactions (9). To evade the host defenses in the inflamed tissue, the expression of capsule by *E. faecalis* masks bacterial surface antigens, allowing the bacteria to resist to opsonophagocytosis (2).

The biosynthesis of capsular polysaccharides by *E. faecalis* is encoded by the *csp* operon, which includes 11 open reading frames (*cpsA* to *cpsK*) (10). However, only 7 open reading frames in the *cps* operon are essential for capsule production (*cpsC*, *cpsD*, *cpsE*, *cpsG*, *cpsI*, *cpsJ*, and *cpsK*) (3). Previous genetic evidence demonstrated that *E. faecalis* isolates can be classified in 1 of 3 capsule operon polymorphisms. CPS 1 presents only *cpsA* and *cpsB*; CPS 2 presents all 11 genes in the *cps* operon; and CPS 5 presents all genes except for *cpsF*. Furthermore, CPS 2 and 5 express the capsular polysaccharide, whereas CPS 1 does not (4).

Because of the frequent detection of *E. faecalis* in cases of endodontic failure, this study aimed to investigate capsule-producing *E. faecalis* strains among isolates from canals of root-filled teeth with periapical lesions by genetic analysis of the capsule (*cps*) operon.

From the *Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo; and [†]Department of Endodontics, Piracicaba Dental School, State University of Campinas, Piracicaba, Brazil.

Supported by funds from FAPESP 09/52661-5.

Address requests for reprints to Dr Ericksa T. Pinheiro, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Ed. Biomédicas II, Av. Lineu Prestes, 1374 São Paulo, SP 05508-900, Brazil. E-mail address: erickapinheiro@yahoo.com.br
0099-2399/\$ - see front matter

Copyright © 2012 American Association of Endodontists.
doi:10.1016/j.joen.2011.08.002

Materials and Methods

Clinical Material, Bacterial Strains, and DNA Extraction

The 22 *E. faecalis* strains used in this study were previously isolated from the canals of teeth with failed root canal treatments (5). The clinical data of these teeth were recorded, so that they could be correlated with the *cps* operon polymorphism: clinical symptoms, presence or absence of a sound coronal restoration, status of the root canal in terms of whether dry or wet (the term *wet canal* in this study means presence of exudate), and the radiographic quality of the root canal filling. Coronal restorations were categorized as defective if there were open margins, fracture, or recurrent decay. Initial root fillings were classified as good if no voids were present and were within 2 mm of the radiographic apex. If 1 or more of these criteria were not met, they were classified as poor.

All *E. faecalis* strains were identified at the species level by using rapid ID 32 STREP galleries and partial 16S rDNA sequencing (11). For chromosomal DNA isolation, Wizard Genomic DNA solutions (Promega, Madison, WI) were used with the modifications previously described by Ulrich and Hughes (12).

Polymorphism of the *cps* Operon

The 3 known capsule operon polymorphisms previously described were investigated as described by McBride et al (4). The *cps* locus of CPS 1 consists of *cpsA* and *B*, followed by the non-capsule-related *hcb1* gene. The *cps* locus of CPS 2 consists of *cpsA*, *B*, *C*, *D*, *E*, *F*, *G*, *H*, *I*, *J*, *K*, followed by *hcb1*. The *cps* locus of CPS 5 consists of *cpsA*, *B*, *C*, *D*, *E*, *G*, *H*, *I*, *J*, *K*, followed by *hcb1*, with *cpsF* absent. The primers used in this study are listed in Table 1. Primers pair *cpsB5-F/hcb1-R* generated an amplification product of 950 base pairs (bp) from CPS 1 type strains. Primer pair *cpsEend-F/59cpsG-R* was used to amplify the region between *cpsE* and *cpsG* to detect the presence of *cpsF*, which distinguishes CPS 2 and 5 polymorphisms. An amplification product of 1098 bp indicated the presence of *cpsF* characteristic of CPS 2. Generation of a product of 199 bp indicated the presence of *cpsE* and *cpsG* but the absence of *cpsF*, as is characteristic of the CPS 5 polymorphism. Polymerase chain reaction (PCR) conditions for all amplification reactions were as follows: initial denaturation at 94°C for 5 minutes; 30 cycles at 94°C for 30 seconds, 52°C for 2 minutes, and 72°C for 2 minutes; and final extension at

72°C for 7 minutes. PCR products were submitted to electrophoresis in agarose gels and stained with ethidium bromide for visualization under UV light.

Multilocus Sequence Typing Analysis

Multilocus sequence typing (MLST) of *E. faecalis* isolates was performed as described previously (13). The 7 genes evaluated were *gdb* (glucose-6-phosphate dehydrogenase), *gyd* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), *pstS* (phosphate adenosine triphosphate binding cassette transporter), *gki* (putative glucokinase), *aroE* (shikimate 5-dehydrogenase), *xpt* (shikimate 5-dehydrogenase), and *yqiL* (acetyl-coenzyme A acetyltransferase). PCR conditions for all amplification reactions were as follows: initial denaturation at 94°C for 5 minutes; 30 cycles at 94°C for 30 seconds, 52°C for 30 seconds, and 72°C for 1 minute; and final extension at 72°C for 7 minutes (13). Reactions were performed in 25-μL volumes by using *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brazil). PCR products were purified with a kit from QIAGEN, Inc (Hilden, Germany) and sequenced with PCR forward and reverse primers, an ABI PRISM Big Dye cycle sequencing ready reaction kit (Perkin-Elmer, Applied Biosystems, Foster City, CA), and an ABI 3700 DNA sequencer (Perkin-Elmer).

For each isolate, each gene was amplified and sequenced with the specific forward or reverse primer. For each locus, a distinct allele number was assigned to every different sequence, in accordance with the *E. faecalis* MLST database (<http://efaecalis.mlst.net>). The allelic profile or sequence type (ST) was assigned in the order *gdb*, *gyd*, *pstS*, *gki*, *aroE*, *xpt*, and *yqiL* to a total of 7 integers corresponding to the allele numbers at the 7 loci. The relatedness between the different STs was investigated by using BioNumerics software (version 6.0; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) by the unweighted pair group method with arithmetic averages and the categorical coefficient of similarity. Isolates with the same allelic profile, and therefore the same ST, are regarded as members of a single clone or lineage (13).

Statistical Analysis

The data collected for each *E. faecalis* strain (CPS type, ST, and clinical data) were typed onto a spreadsheet and statistically analyzed by using SPSS for Windows (SPSS Inc, Chicago, IL). The Pearson χ^2 test or the one-sided Fisher exact test, as appropriate, was chosen to test the null hypothesis that there was no relationship between endodontic symptoms and signs and the presence of capsule-producing *E. faecalis* strains.

Results

All *E. faecalis* strains tested yielded 1 of the 3 CPS polymorphisms, on the basis of characteristic PCR products (Fig. 1). The most common type among the root canal isolates was CPS 1 (62.5%), indicating that these strains do not have in their chromosome the essential genes in the *cps* operon for capsule production. The CPS 2 and 5, which are associated with capsule-producing strains, were found in a lower prevalence, 16.7% and 20.8%, respectively.

A total of 22 *E. faecalis* isolates were resolved into 14 STs, of which 9 STs comprised only 1 isolate (Fig. 2). Nine STs were already reported in the database, comprising strains isolated from hospitalized patients, human community, animal reservoirs, and food in Europe and North and Latin America. In addition, 5 STs were demonstrated for the first time in this study, ST 394–398. Capsule (*cps*) locus polymorphisms were correlated with MLST data, and

TABLE 1. Primers Used in This Study

Primer name	Primer sequences (5' to 3')	Size (bp)
CPS types		
<i>cpsB5-F</i>	CCAGGACATGGTGGTATTTAGATC	950
<i>hcb1-R</i>	CGCCAATAAACAATCTTACCAGAGC	
<i>cpsEend-F</i>	GAACCTACAACAATTAATAAAGC	199/
<i>cpsG-R</i>	GCATAGTATGTTAAGATTGATCCA	1098
MLST		
<i>aroE-1</i>	TGGAAGAACTTTACGGAGACAGC	459
<i>aroE-2</i>	GTCCTGTCCATTGTTCAAAAGC	
<i>gdh-1</i>	GGCGCACTAAAAGATATGGT	530
<i>gdh-2</i>	CCAAGATTGGGCAACTTCGTCCCA	
<i>gki-1</i>	GATTTTGTGGGAATTGGTATGG	438
<i>gki-2</i>	ACCATTAAAGCAAAATGATCGC	
<i>gyd-1</i>	CAAAGTGCCTTAGCTCCAATGGC	395
<i>gyd-2</i>	CATTTCTGTGTACATCAAGC	
<i>pstS-1</i>	CGGAACAGGACTTTTCGC	583
<i>pstS-2</i>	ATTACATCACGTTCTACTTGC	
<i>xpt-1</i>	AAAATGATGGCCGTGTATTAGG	456
<i>xpt-2</i>	AACGTCACCGTCTCTCACTTA	
<i>yqiL-1</i>	CAGCTTAAGTCAAGTAAGTGCCG	436
<i>yqiL-2</i>	GAATATCCCTTCTGCTTGCT

Figure 1. PCR products of the 3 known CPS polymorphisms: an amplification product of 950 bp from CPS 1 type strains, a product of 1098 bp indicating the presence of *cpsF* characteristic of CPS 2, and a product of 199 bp indicating the presence of *cpsE* and *cpsG* but the absence of *cpsF*, as is characteristic of the CPS 5 polymorphism. M, 100-bp marker.

the 3 known *cps* operon polymorphisms (CPS) were consistent within individual STs (Fig. 2).

The *E. faecalis* CPS types, STs, and clinical features of each tooth are presented in Figure 2. There were no significant relationships

between endodontic symptoms and signs of root-filled teeth associated with periapical lesions and the presence of any particular *E. faecalis* CPS type ($P > .05$).

Discussion

Culture-dependent and molecular studies have reported a high prevalence of *E. faecalis* in cases of endodontic failure (5, 6). To promote disease, a pathogen should express a repertoire of virulence factors enabling colonization and survival in the target tissue and promotion of inflammation and host tissue destruction. The production of capsule seems to be a key factor in virulent isolates (4) of *E. faecalis* besides other virulence-associated factors (14).

The present data revealed that although most *E. faecalis* strains did not contain the essential genes for capsule production in the *cps* operon, classified as genotype cps 1, the capsule-producing genotypes of *E. faecalis* comprised 37.5% of root canal isolates. Capsules of *E. faecalis* inhibit the detection of lipoteichoic acid and/or other surface pathogen-associated molecular patterns, resulting in decreased cytokine production by macrophages (2). Furthermore, capsule production allows *E. faecalis* to evade clearance by macrophages and neutrophils (2, 15). Therefore, modulation of the immune response and resistance to phagocytosis might enable capsule-producing *E. faecalis* strains to evade the immune system and sustain successful long-term infection.

The MLST analysis reveals the genetic relatedness among isolates on the basis of similarity in housekeeping genes (16). The genetic diversity revealed by MLST in this study was similar to previous reports from

Figure 2. Dendrogram showing genetic relatedness by MLST analyses of 22 *E. faecalis* strains (S) isolated from canals of root-filled teeth with periapical lesions, their capsule (CPS) types, and clinical data. GE, good endodontic filling; GR, good restoration; HP, history of pain; N, no; NR, no restoration; P, pain; PE, poor endodontic filling; PR, poor restoration; R, restoration; RCF, root canal filling; Si, sinus tract; Sw, swelling; T, tooth; TR, temporary restoration; TTP, tenderness to percussion; W-D, wet (W) or dry (D) canal; Y, yes.

oral (11, 17, 18) and non-oral (4) *E. faecalis* isolates. Comparison of our data with the international MLST database revealed common STs among root canal isolates and strains isolated from hospitalized patients, feces of healthy individuals, animals, and food. Thus, the oral *E. faecalis* strains should be cross-transmitted from diverse sources, confirming previous findings (18). Also, the data support the hypothesis that food might be one possible source of *E. faecalis* in root canal infections (19), because STs 23, 25, 40, 72, and 133 detected in 9 of 22 cases were previously detected in food samples. Moreover, coronal leakage (by defective coronal restorations, old temporary restorative materials, or coronally unsealed teeth) was detected in most of these teeth and might have influenced the microbial findings.

The association of multiple virulence traits within a certain group of strains is highly suggestive of the existence of pathogenic lineages in *E. faecalis* (4) because of the presence of variable regions in the genome. More than 25% of the *E. faecalis* strain V583 genome is made up of mobile and exogenously acquired DNA, including a pathogenicity island (20). It has been recently reported that the transfer of a pathogenicity island among *E. faecalis* strains might be accompanied by chromosome-chromosome transfer of capsule genes as well (21).

Population structure analysis of the studied *E. faecalis* population revealed 2 major branches (Fig. 2). Except for one isolate, one of the branches (B) is formed exclusively by CPS type 1, indicative of absence of capsule production. On the other hand, branch A comprised both the capsulated (CPS 2 and 5) and noncapsulated (CPS1) genotypes as well. These data support the horizontal transfer of the *cps* operon hypothesis and suggest that other characteristics, including the expression of virulence factors, would be shared among the capsule producer strains. Furthermore, the observation that the *cps* operon polymorphisms were consistent within individual STs suggested that the capsule locus varies at a very low rate in *E. faecalis* species (4), differing from expected for an antigen recognized by the host defenses.

In the present study, 16.7% of the root canal samples were classified as CPS type 2. Interestingly, it has been shown that *E. faecalis* CPS 2 strains harbored a greater repertoire of antibiotic resistance cassettes and were more likely to possess multiple virulence factors than the other isolates (4), including capsulated CPS 5 isolates and the noncapsulated CPS 1. Furthermore, most of the CPS 2 isolates shared a similarity over 60%, as shown in Figure 2, which supports the hypothesis that these strains might share other common traits besides capsule production. However, no relationship was found between *E. faecalis* CPS 2 strains and endodontic symptoms of root-filled teeth associated with periapical lesions, bearing in mind that the number of symptomatic cases studied was very low.

This study demonstrated that *E. faecalis* obtained from root canals are highly diverse and that several isolates might produce capsule. In addition, those isolates classified in cluster A in the phylogenetic analysis belonging to genotype CPS 2 would form a lineage with increased pathogenic potential. Furthermore, the distribution of capsule locus polymorphisms, the genetic diversity, and genetic origins of root canal strains were parallel to previous findings regarding *E. faecalis* isolates from diverse clinical origins. However, it is important to note that the

functional significance of capsule locus polymorphisms and their role in the pathogenesis of endodontic disease should be further investigated.

Acknowledgments

The authors deny any conflicts of interest related to this study.

References

1. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* 2009;155:1749–57.
2. Thurlow LR, Thomas VC, Fleming SD, Hancock LE. *Enterococcus faecalis* capsular polysaccharide serotypes C and D and their contributions to host innate immune evasion. *Infect Immun* 2009;77:5551–7.
3. Thurlow LR, Thomas VC, Hancock LE. Capsular polysaccharide production in *Enterococcus faecalis* and contribution of CpsF to capsule serospecificity. *J Bacteriol* 2009;191:6203–10.
4. McBride SM, Fischetti VA, Leblanc DJ, Moellering RC Jr, Gilmore MS. Genetic diversity among *Enterococcus faecalis*. *PLoS One* 2007;2:e582.
5. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 2003;36:1–11.
6. Gomes BP, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. *J Endod* 2008;34:537–40.
7. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod* 2006;32:93–8.
8. Rocas IN, Siqueira JF Jr, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004;30:315–20.
9. Nair PN. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. *Periodontol* 2000 1997;13:121–48.
10. Hancock LE, Gilmore MS. The capsular polysaccharide of *Enterococcus faecalis* and its relationship to other polysaccharides in the cell wall. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:1574–9.
11. Pinheiro ET, Anderson MJ, Gomes BP, Drucker DB. Phenotypic and genotypic identification of enterococci isolated from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Oral Microbiol Immunol* 2006;21:137–44.
12. Ulrich RL, Hughes TA. A rapid procedure for isolating chromosomal DNA from *Lactobacillus* species and other Gram-positive bacteria. *Lett Appl Microbiol* 2001;32:52–6.
13. Ruiz-Garbajosa P, Bonten MJ, Robinson DA, et al. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of recombination. *J Clin Microbiol* 2006;44:2220–8.
14. Siqueira JF Jr, Rocas IN. Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. *Braz Dent J* 2007;18:267–80.
15. Huebner J, Wang Y, Krueger WA, et al. Isolation and chemical characterization of a capsular polysaccharide antigen shared by clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect Immun* 1999;67:1213–9.
16. Maiden MC. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2006;60:561–88.
17. Sedgley CM, Molander A, Flannagan SE, et al. Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic *Enterococcus* spp. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20:10–9.
18. Sun J, Song X, Kristiansen BE, et al. Occurrence, population structure, and antimicrobial resistance of enterococci in marginal and apical periodontitis. *J Clin Microbiol* 2009;47:2218–25.
19. Zehnder M, Guggenheim B. The mysterious appearance of enterococci in filled root canals. *Int Endod J* 2009;42:277–87.
20. Paulsen IT, Banerjee L, Myers GS, et al. Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science* 2003;299:2071–4.
21. Manson JM, Hancock LE, Gilmore MS. Mechanism of chromosomal transfer of *Enterococcus faecalis* pathogenicity island, capsule, antimicrobial resistance, and other traits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:12269–74.

Analysis of Genetic Lineages and Their Correlation with Virulence Genes in *Enterococcus faecalis* Clinical Isolates from Root Canal and Systemic Infections

Pâmela P. Penas, MSc,* Marcia P.A. Mayer, PhD, MSc,* Brenda P.F.A. Gomes, PhD, MSc,[†] Marcos Endo, MSc,[‡] Antonio C.C. Pignatari, PhD, MSc,[‡] Karen C. Bauab, MSc,[‡] and Ericka T. Pinheiro, PhD*[§]

Abstract

Introduction: *Enterococcus faecalis* is a member of the mammalian gastrointestinal microbiota but has been considered a leading cause of hospital-acquired infections. In the oral cavity, it is commonly detected from root canals of teeth with failed endodontic treatment. However, little is known about the virulence and genetic relatedness among *E. faecalis* isolates from different clinical sources. This study compared the presence of enterococcal virulence factors among root canal strains and clinical isolates from hospitalized patients to identify virulent clusters of *E. faecalis*.

Methods: Multilocus sequence typing analysis was used to determine genetic lineages of 40 *E. faecalis* clinical isolates from different sources. Virulence clusters were determined by evaluating capsule (*cps*) locus polymorphisms, pathogenicity island gene content, and antibiotic resistance genes by polymerase chain reaction.

Results: The clinical isolates from hospitalized patients formed a phylogenetically separate group and were mostly grouped in the clonal complex 2, which is a known virulent cluster of *E. faecalis* that has caused infection outbreaks globally. The clonal complex 2 group comprised capsule-producing strains harboring multiple antibiotic resistance and pathogenicity island genes. On the other hand, the endodontic isolates were more diverse and harbored few virulence and antibiotic resistance genes. In particular, although more closely related to isolates from hospitalized patients, capsule-producing *E. faecalis* strains from root canals did not carry more virulence/antibiotic genes than other endodontic isolates. **Conclusions:** *E. faecalis* isolates from endodontic infections have a genetic and virulence profile different from pathogenic clusters of hospitalized patients' isolates, which is most likely due to niche

specialization conferred mainly by variable regions in the genome. (*J Endod* 2013;39:858–864)

Key Words

Antibiotic resistance, *Enterococcus faecalis*, genotypes, root canals, virulence factors

Although classically considered a commensal of the human gastrointestinal tract rather than a specialized pathogen, *Enterococcus faecalis* has become relevant in hospital-acquired bloodstream, urinary tract, and surgical wound infections. Previous studies that used multilocus sequence typing (MLST) to differentiate isolates of *E. faecalis* at a subspecies level have shown the emergence of specific genetic lineages in hospital-acquired infections, in which several new antibiotic resistances and virulence traits have converged (1, 2). Furthermore, the presence of a capsule has been associated with pathogenic lineages of *E. faecalis* isolated from hospitalized patients (2).

In the oral cavity, *E. faecalis* has been frequently detected from canals of root-filled teeth with periapical lesions by both culture and molecular methods (3–7). Recently, MLST analysis has revealed that certain *E. faecalis* genotypes from canals of root-filled teeth with periapical lesions belonged to lineages associated with capsule expression (8). Moreover, most of the capsulated isolates shared high genetic similarity, which suggests that these strains might share other common traits besides capsule production. Thus, we hypothesized that the capsule-producing strains in root canals would also carry multiple virulence genes, as reported for isolates from hospitalized patients, which would increase their pathogenic potential.

Pathogenicity islands (PAIs) are distinct genetic elements on bacterial chromosomes, acquired by horizontal gene transfer, that encode various virulence factors (9). The *E. faecalis* PAI was first identified among antibiotic-resistant clinical isolates (10). Genetic analysis has shown that diverse mobile elements acquired by horizontal transfer have been incorporated into the *E. faecalis* PAI, which has contributed to increases in the pathogenic potential of certain lineages (11). The genetic content of the *E. faecalis* PAI seems to be enriched among infection-derived isolates from hospitals and consists of virulence determinants as well as several additional genes that are rare in non-infection-derived isolates (2, 10, 11). Therefore, it has been suggested that PAIs, or parts thereof, may be useful markers for detecting pathogenic enterococcal

From the *Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo; [†]Department of Endodontics, Piracicaba Dental School, State University of Campinas, Piracicaba; [‡]LEMC/ALERTA, Federal University of São Paulo, São Paulo; and [§]Department of Endodontics, Dental School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Supported by funds from FAPESP 09/52661-5.

Address requests for reprints to Dr Ericka Tavares Pinheiro, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Ed. Biomédicas II, Av. Lineu Prestes, 1374, São Paulo, SP 05508-900, Brazil. E-mail address: erickapinheiro@yahoo.com.br 0099-2399/\$ - see front matter

Copyright © 2013 American Association of Endodontists.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2013.01.009>

strains (10). In this study we investigated the PAI genetic content of *E. faecalis* isolates from root canal infections and hospitalized patients to identify virulence clusters. In addition, genes conferring resistance to different antibiotic classes were studied.

The aims of the present study were as follows:

1. To investigate the prevalence of virulence and antibiotic resistance genes in a previously MLST capsule-characterized strain collection and in a new collection comprising blood culture, urogenital, and catheter isolates
2. To compare the population structure of *E. faecalis* isolates from different sources
3. To investigate whether virulence clusters were associated with endodontic infections

Materials and Methods

Bacterial Strains and DNA Extraction

A total of 40 strains of *E. faecalis* were evaluated. The 21 endodontic strains were previously isolated from the canals of teeth with failed root canal treatments (3). The non-oral strains were previously isolated from patients admitted to São Paulo Hospital, a Federal University of São Paulo affiliated hospital, during a vancomycin-resistant enterococcus surveillance program (12, 13). This collection included *E. faecalis* isolates from bloodstream, respiratory, urinary tract, surgical wound infections, and strains from rectal samples from intensive care units. Strains were identified at the species level by conventional methods and partial 16S recombinant DNA sequencing. DNA extraction was performed by using Wizard Genomic DNA solutions (Promega, Madison, WI) following the modifications previously described by Ulrich and Hughes (14).

PAI and Antibiotic Resistance Genes

The *E. faecalis* PAI genes *esp* (enterococcal surface protein), *cytB* (cytolysin production), *gls24*-like (general stress protein), *nuc-1* (staphylococcus homologue nuclease), *psaA* (*Streptococcus pneumoniae* homologue metal-binding protein), and *cbb* (bile salt hydrolase) were investigated by polymerase chain reaction (PCR) on the basis of previous protocols established by McBride et al (2). In addition, the antibiotic resistance genes *vanA* (vancomycin resistance), *aac6'-aph2''* (high-level aminoglycoside resistance), *ermB* (erythromycin resistance), and *tetM* (tetracycline resistance) were studied.

All primers used in this study are shown in Table 1. PCRs were performed in 25- μ L volumes by using Taq DNA polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brazil). The PCR conditions were generally as follows: initial denaturation at 95°C for 5 minutes, followed by 30 cycles of denaturation at 94°C–96°C for 15–60 seconds, annealing at a temperature that depended on the primer (Table 1), and extension at 72°C for 30–90 seconds. The final extension was 72°C for 5–10 minutes. The PCR products were submitted to electrophoresis in agarose gels and stained with ethidium bromide for visualization under ultraviolet light. The PCR positive controls were multidrug-resistant strains previously isolated during a vancomycin-resistant enterococcus surveillance program (12), and the negative control was ultrapure water. Resistance against all antibiotics tested in this study was confirmed by both phenotypic and genotypic tests. The PCR product for each gene was purified with a kit from QIAGEN, Inc (Hilden, Germany) and sequenced with PCR forward and reverse primers, an ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Perkin-Elmer, Applied Biosystems, Foster City, CA), and an ABI 3700 DNA sequencer (Perkin-Elmer). The resulting sequences of the amplified products were compared with the NCBI GenBank database and showed 100% similarity with the respective investigated genes.

Capsule Operon Polymorphisms

Capsule (*cps*) operon polymorphisms of the endodontic strains were investigated in our previous study (8). The systemic infection isolates were then assessed in the present study to compare capsule differences between the isolates. The *csp* operon includes 11 open reading frames (*cpsA* to *cpsK*); however, only 7 are essential for capsule production (*cpsC*, *cpsD*, *cpsE*, *cpsG*, *cpsI*, *cpsJ*, and *cpsK*) (15). There are 3 known capsule operon polymorphisms, and they were investigated in this study as described by McBride et al (2). The *cps* polymorphism CPS 1 consists of *cpsA* and *cpsB*, followed by the *hcp1* gene; for that reason, CPS 1-type strains do not produce capsule. The *cps* polymorphism CPS 2 consists of *cpsA*, *cpsB*, *cpsC*, *cpsD*, *cpsE*, *cpsF*, *cpsG*, *cpsH*, *cpsI*, *cpsJ*, *cpsK*, and *hcp1*. CPS 5 is identical to CPS 2 except it lacks *cpsF*; therefore, both CPS 2 and CPS 5 strains can produce the capsular polysaccharide. Primer pair *cpsB5-F/hcp1-R* generated an amplification product of 950 base pairs (bp) from CPS 1-type strains. Primer pair *cpsEend-F/59cpsG-R* was used to amplify the region between *cpsE* and *cpsG* to detect the presence of *cpsF*, which distinguished CPS 2 from CPS 5. An amplification product of 1098 bp indicated the presence of *cpsF*, characteristic of CPS 2. A product of 199 bp indicated the presence of *cpsE* and *cpsG* but the absence of *cpsF*, characteristic of CPS 5 (Table 1). PCR conditions for both amplification reactions were as follows: initial denaturation at 94°C for 5 minutes; 30 cycles at 94°C for 30 seconds, 52°C for 2 minutes, and 72°C for 2 minutes; and final extension at 72°C for 7 minutes.

MLST Analysis

The population structure of endodontic and systemic *E. faecalis* strains was determined by MLST (1). The 7 genes evaluated were *gdb* (glucose-6-phosphate dehydrogenase), *gyd* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), *psfS* (phosphate adenosine triphosphate binding cassette transporter), *gki* (putative glucokinase), *aroE* (shikimate 5-dehydrogenase), *xpt* (shikimate 5-dehydrogenase), and *yqiL* (acetyl-coenzyme A acetyltransferase). PCR conditions for MLST were as follows: initial denaturation at 94°C for 5 minutes; 30 cycles at 94°C for 30 seconds, 52°C for 30 seconds, and 72°C for 1 minute; and final extension at 72°C for 7 minutes. Reactions were performed in 25- μ L volumes by using Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA). PCR products were purified with a kit from QIAGEN (Chatsworth, CA) and sequenced with PCR forward and reverse primers, an ABI PRISM BigDye Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Perkin-Elmer, Applied Biosystems), and an ABI 3700 DNA sequencer (Perkin-Elmer). For each locus, a distinct allele number was assigned to every sequence in accordance with the *E. faecalis* MLST database (<http://efaecalis.mlst.net>). The allelic profile or sequence type (ST) was assigned in the order *gdb*, *gyd*, *psfS*, *gki*, *aroE*, *xpt*, and *yqiL* to a total of 7 integers corresponding to the allele numbers at the 7 loci. The relatedness between the different STs was investigated by using BioNumerics software (version 6.0; Applied Maths, Saint-Martens-Latem, Belgium) by the unweighted pair group method with arithmetic averages and the categorical coefficient of similarity. Isolates with the same allelic profile, and therefore the same ST, were regarded as members of a single clone or lineage. The clonal cluster (CC) was defined as an ST represented by more than 3 isolates, along with any single-locus variants and double-locus variants of these STs.

Results

The MLST analysis of 40 *E. faecalis* isolates revealed 18 STs, including 1 first demonstrated in this study (ST 472). Our hospital collection formed a phylogenetically separate group and was mostly grouped in CC2, comprising ST 2 and ST 6, which included 63.1%

TABLE 1. Primers and PCR Conditions Used in This Study

	Primer name	Primer sequence	Size (bp)	Annealing temperature (°C)
Antibiotic resistance	<i>vanA</i>	vanB-F 5' - CCCGAATTTCAAATGATTGAAAA - 3'	457	62
		vanB-R 5' - CGCCATCCTCTGCAAAA - 3'		
	<i>aac6'-aph2''</i>	HLG-1 5' - CTGATGAGATAGTCTATGGTATGGATC - 3'	375	62
		HLG-2 5' - GCCACACTATCATAACCACTACCG - 3'		
	<i>ermB</i>	ermB-1 5' - CGACGAAACTGGCTAAAATAAGTAAAC - 3'	408	52
		ermB-2 5' - GAGGTATGGCGGGTAAAGTTTATTAAG - 3'		
	<i>tetM</i>	tetM-1 5' - GGACAAAGGTACAACGAGGAC - 3'	445	55
		tetM-2 5' - GGTATCATGTTTCCCTCTATTACC - 3'		
PAI genes				
<i>Esp</i>	esp-F	5' - CGATAAAGAAGAGAGCGGAG - 3'	539	52
	esp-R	5' - GCAAACCTACATCCACGTC - 3'		
<i>cylB</i>	cylB-F	5' - GGAGAATTAGTGTTTAGAGCG - 3'	522	52
	cylB-R	5' - GCTTCATAACCATTGTTACTATAGAAAC - 3'		
<i>cylM</i>	cylM-F	5' - AAGATTGTCTGTGCCATGGA - 3'	159	52
	cylM-R	5' - TACTCACTCCCGGCAACCTT - 3'		
<i>gls24-like</i>	gls24-F	5' - GCATTAGATGAGATTGATGGTC - 3'	446	52
	gls24-R	5' - GCGAGGTTTCAGTTTCTTC - 3'		
<i>nuc-1</i>	nuc-F	5' - GTGTAAGAAGTTACTGAAAATGTTACTC - 3'	332	52
	nuc-R	5' - GCGTTTTTTGTAGTAATGTTCCATCTACG - 3'		
<i>psaA</i>	psaA-F	5' - CTATTTTCGACGAAGTGATG - 3'	540	52
	psaA-R	5' - CGCATAGTAACATCACCATCTTG - 3'		
<i>Cbh</i>	cbhK-F	5' - CTCATAGGATCCATCACCACATCAC - 3'	~580	52
	cbhK-R	5' - TGGCTGGAATCACTTTTCAGGCTAT - 3'		
CPS types				
CPS 1	cpsB5-F	5' - CCAGGACATGGTGGTATTTTAGATC - 3'	950	52
	hcp1-R	5' - CGCCAATAAACAATCTTTACCAGAGC - 3'		
CPS 2/CPS 5	cpsEend-F	5' - GAACCTACAACAATTAATAAAGC - 3'	1098/199	52
	cpsG-R	5' - GCATAGTATGTTAAGATTGATCCA - 3'		
MLST				
<i>aroE</i>	aroE-1	5' - TGGAAAACCTTTACGGAGACAGC - 3'	459	52
	aroE-2	5' - GTCCTGTCCATTGTTCAAAAAGC - 3'		
<i>Gdh</i>	gdh-1	5' - GGCGCACTAAAAGATATGGT - 3'	530	52
	gdh-2	5' - CCAAGATTGGGCACTTCGTCCTCA - 3'		
<i>Gki</i>	gki-1	5' - GATTTTGTGGGAATTGGTATGG - 3'	438	52
	gki-2	5' - ACCATTAAAGCAAAATGATCGC - 3'		
<i>Gyd</i>	gyd-1	5' - CAAACTGCTTAGCTCCAATGGC - 3'	395	52
	gyd-2	5' - CATTTCGTTGTCATACCAAGC - 3'		
<i>pstS</i>	pstS-1	5' - CGGAACAGGACTTTTCGC - 3'	583	52
	pstS-2	5' - ATTTACATCACGTTCTACTTGC - 3'		
<i>Xpt</i>	xpt-1	5' - AAAATGATGGCCGTGTATTAGG - 3'	456	52
	xpt-2	5' - AACGTCACCGTTTCTTCACTTA - 3'		
<i>yqiL</i>	yqiL-1	5' - CAGCTTAAGTCAAGTAAGTGCCG - 3'	436	52
	yqiL-2	5' - GAATATCCCTCTGCTGTGCT - 3'		

(12 of 19) of the hospital strains. On the other hand, endodontic isolates were mostly resolved into different STs with 1 isolate each. The CC analysis revealed that STs 25, 62, 97, and 133 were closely related and formed CC25, which comprised 42.8% (9 of 21) of the endodontic isolates. Moreover, most endodontic isolates were not closely related to *E. faecalis* isolates from hospitalized patients (Fig. 1).

Data of *cps* locus polymorphisms, antibiotic resistance, and PAI genes of *E. faecalis* isolates from root canal and hospitalized patients are presented in Figure 2. The characteristics of *E. faecalis* isolates were correlated with MLST data (Fig. 1). In contrast with endodontic isolates, the *cps* operon analysis of the hospitalized patients' isolates revealed that 13 of 19 strains (68.4%) had the essential genes for capsule production; most of them were CPS 5 (10 of 19) and belonged to CC2.

All but 1 isolate from hospitalized patients (94.7%) carried at least 3 antibiotic resistance genes: *vanA*, *aac6'-aph2''*, and *ermB* genes. On the other hand, the analysis of the endodontic collection revealed that 47.6% of the isolates (10 of 21) carried both *ermB* and *tetM*; 1 of them also had *aac6'-aph2''*. Furthermore, *vanA* was not detected within endodontic isolates (Fig. 1).

The PAI gene analysis revealed that 94.7% of the isolates (18 of 19) from hospitalized patients presented at least 3 of the 6 genes

studied. Their order of prevalence was *psaA* (94.7%), *nuc1* (78.9%), *esp* (73.7%), *gls24-like* (52.6%), *cylB* (47.4%), and *cbh* (15.8%) (Fig. 2). In contrast, most of the endodontic isolates presented only 1 or 2 of these genes. The most prevalent genes were *cbh* (76.2%) and *esp* (57.1%). The *psaA*, *gls24-like*, and *cylB* genes were not detected within our endodontic collection (Fig. 2).

E. faecalis isolates from hospitalized patients were mostly grouped in CC2, which comprised capsule-producing strains that contained most of the antibiotic resistance and PAI genes. The CC2 strains carried 3 or 4 antibiotic resistance genes and 4 or 5 PAI genes simultaneously. In contrast, few antibiotic resistance or PAI genes were detected within endodontic isolates. In particular, although more closely related to isolates from hospitalized patients, CPS 2 endodontic isolates did not carry more virulence/antibiotic genes than other endodontic isolates. Therefore, no specific virulent cluster of *E. faecalis* was found in association with endodontic failure, differing from that found in hospitalized patients' isolates.

Discussion

MLST analysis reveals genetic relatedness among isolates on the basis of similarity in housekeeping genes. This study used MLST to

Figure 1. Dendrogram showing genetic relatedness of 40 *E. faecalis* strains isolated from root-filled canals (RC) and from hospitalized patients (M), their capsule (CPS) types, PAI genes, and antibiotic resistance genes. The phylogenetic tree was based on the matrix of pairwise differences in MLST allelic sequences as determined by unweighted pair group method with arithmetic mean, and 1 *E. faecium* clinical strain was used to root the tree. *In addition to STs 25, 23, and 97, CC 25 also includes STs 62 and 133, which are not assigned in the figure.

characterize the genetic phylogeny of *E. faecalis* isolates from different clinical sources and to analyze the associations of particular genotypes with virulence. Population structure analysis revealed that *E. faecalis* isolates from root canal infections and hospitalized patients were not closely related. Most of the isolates from hospitalized patients with

systemic infections were classified as CC2, a known virulent cluster of *E. faecalis* that has caused infection outbreaks globally (2). The latter was not found in our endodontic collection, which is in agreement with previous MLST analysis from marginal and apical periodontitis isolates (16).

Figure 2. Distribution of CPS types, antibiotic determinants, and PAI genes in *E. faecalis* isolates from root-filled canals (RC) and from hospitalized patients (M).

Although many endodontic isolates did not cluster into a clonal complex, our data reveal that 42.8% of the isolates belonged to CC25, which has been previously reported in the oral cavity (16) but is rarely found in non-oral human infections (11, 17). Remarkably, CC25 isolates have also been frequently found in food samples, especially in cheeses contaminated with *E. faecalis* (18). These findings support the hypothesis that the *E. faecalis* found in the root canal system is most likely of exogenous origin (19, 20). Endodontic infections with *E. faecalis* may not be derived from the patient's own normal microflora (20). Therefore, 1 possible source of *E. faecalis* is contamination of the unsealed root canal by food-borne strains, which are usually transient in the oral cavity but may become colonizers of the root canal system (19, 20).

To investigate the presence of virulence clusters in our collection, capsule locus polymorphisms, 6 PAI regions, and 4 antibiotic resistance genes were assessed. We found that CC2 cluster isolates presented more PAI and antibiotic resistance genes than other lineages. Moreover, all CC2 strains were classified into genotypes CPS 5 and CPS 2, indicative of capsule production. Our findings indicate the presence of a virulence cluster particularly adapted to the hospital environment, as shown in previous reports (1, 2, 17, 21).

In contrast, most endodontic isolates were CPS 1 (non-capsule producers), harboring 2 or fewer virulence and/or antibiotic resistance genes. This is in agreement with McBride et al (2), who have found a reduced number of virulence and antibiotic resistance genes in CPS type 1 lineages from a diverse collection of *E. faecalis* isolates. They have also shown that CPS type 2 strains harbor more virulence and antibiotic resistance traits than other CPS lineages. Conversely, in this study, CPS 2 endodontic isolates showed a reduced PAI gene content. This finding suggests that PAI variations occur independently of other regions of the chromosome, including the *cps* operon, which is in agreement with previous findings (2, 11). Moreover, our findings support the hypothesis that PAI is highly variable in gene content, which is largely dependent on the environmental conditions in which the bacterium lives (9, 11).

The *E. faecalis* PAI encodes proteins of many different functions, including proteins with known or potential roles in virulence. Shankar

et al (10) showed that at least 1 of the proteins found within this PAI, the enterococcal surface protein (Esp), was highly associated with infection-derived isolates of *E. faecium*. This protein is encoded by the *esp* gene, which is located in the prototype PAI and has not been described as occurring in any other genetic element (11). Therefore, *E. faecalis* isolates positive for *esp* in this study give evidence for the presence of the PAI in these strains.

Esp is a surface adhesion protein found in both *E. faecium* and *E. faecalis*. In the latter, Esp is a putative virulence factor involved in colonization of the urinary tract (22). Shankar et al (23) have reported that the *esp* gene is common in *E. faecalis* isolates from endocarditis and bacteremia and rare in fecal isolates. Likewise, we found a high prevalence of *esp* (73.7%) in isolates from hospitalized patients, supporting the hypothesis that Esp plays a role in enterococcal systemic infections. Moreover, most endodontic strains studied carried the *esp* gene (57.1%), which is in agreement with previous studies that reported *esp* in 40% (24) and 61% of endodontic isolates (25). The high prevalence of *esp* within endodontic isolates suggests that Esp may be a potential virulence trait that participates in root canal colonization.

Another putative virulence determinant studied was the *cylB* gene, which participates in cytolysin production. This protein can be encoded on the chromosome within the PAI or by conjugative plasmids (10, 26). Cytolysin, also called hemolysin, is a toxin that lyses human, rabbit, and horse erythrocytes and is bactericidal to many gram-positive bacteria (26). It is expressed by some strains of *E. faecalis* and has been associated with increased virulence. Cytolysin is produced by a complex process that involves 8 genes within the cytolysin operon, including *cylA*, *cylB*, *cylM*, *cylLL*, and *cylLS*, which are essential for its production (26, 27). Therefore, the lack of a *cylB* gene in this study is indicative of deficiency in cytolysin production, which was the case for all endodontic isolates investigated. Similarly, Sedgley et al (25) have previously reported that none of their endodontic enterococcal isolates was hemolytic. These findings suggest that cytolysin may have little or no relevance for the pathogenicity of *E. faecalis* in post-treatment root canal infection. In contrast, *cylB* was found in almost half of the isolates from hospitalized patients, which is in agreement with previous findings of medical isolates (28, 29). However, because we did not investigate

the phenotype expression of cytolysin in clinical isolates from hospitalized patients, we cannot draw any conclusion about its role in systemic infections.

In addition to coding for known virulence factors, the *E. faecalis* PAI encodes other traits that may contribute to pathogenicity or survival in different environments (10). Bile salt hydrolase is known to contribute to a bacterium's ability to survive in the gastrointestinal tract. In this study, *cbb* was found in many endodontic isolates, which is in agreement with previous findings from commensal strains (2). Gls24-like protein is homologous to Gls24, a general stress response protein whose expression in *E. faecalis* is induced on nutrient starvation and physical or chemical stresses (30). Moreover, it has been suggested that Gls24 may give a selective advantage to enterococcal survival in an environment containing bile salts (31). In this study, the majority of CC2 strains from hospitalized patients harbored the *gls24*-like gene, which is in accordance with previous findings (2). CC2 strains also carried most PAI genes sampled in this study, including homologues of virulence factors in other bacteria, such as *psaA* and *nuc1*, which encode a *Streptococcus pneumoniae* homologue protein and staphylococcal homologue nuclease, respectively. Our results are in agreement with previous studies (2, 10), which have reported that the genetic content of the *E. faecalis* PAI is enriched among infection-derived isolates, suggesting that these additional genes may contribute to enterococcal survival or proliferation in hospital infections. In contrast, most PAI genes studied were not detected or were detected at low frequency in our endodontic collection, which suggests that *gls24*-like, *psaA*, or *nuc1* may not be relevant to *E. faecalis* adaptation or survival in the root canal system environment.

Previous studies evaluating *E. faecalis* endodontic isolates have identified other potential virulence factors that were not investigated in this work, including production of gelatinase and expression of adherence factors such as adhesin of collagen from enterococci or aggregation substance (24, 25). Interestingly, aggregation substance, which promotes bacterial clumping, may also be encoded by the *E. faecalis* PAI (10). Further data on the detection of surface adhesion and gelatinase determinants would add relevant information on the virulence profile of our endodontic collection.

In this study, the cluster with the most PAI genes, CC2, also carried the most antibiotic resistance genes, which is in agreement with previous findings (2). CC2 strains exhibited a genotype associated with resistance to multiple antibiotics, such as vancomycin, aminoglycosides, erythromycin, and tetracycline. McBride et al (2) suggested that CC2 strains are especially proficient at DNA exchange, which may contribute to their acquisition of multiple antibiotic resistance determinants in a hospital environment. In contrast, no vancomycin resistance gene was present in any strain of endodontic origin, and only 1 isolate carried the gene conferring high-level gentamicin resistance, which is in agreement with previous reports on oral *E. faecalis* isolates (16, 32, 33). However, the present study observed a high prevalence of *ermB* and *tetM* genes in endodontic isolates, which agrees with previous findings showing that oral *E. faecalis* might represent a reservoir of resistance to tetracycline and erythromycin (16, 32–34).

This study demonstrated that there are major genetic differences between the *E. faecalis* isolates from root canal infections and those from hospitalized patients, especially in MLST genes, capsule operon polymorphisms, PAI content, and antibiotic resistance determinants. MLST analysis revealed that CC2 isolates were common in hospitalized patients and CC25 in endodontic infections. Despite the presence of CC2, which harbors the capsule operon, enriched PAI gene content, and multiple antibiotic resistance, no other virulence cluster was identified. The genetic variation of *E. faecalis* isolates from different clinical sources is most likely due to niche specialization, which is conferred

mainly by variable genetic elements, including the PAI. Most endodontic isolates had the *esp* gene within the PAI, which may contribute to root canal colonization. Moreover, some *E. faecalis* strains can also produce an antiphagocytic capsule that may help to evade the immune system and sustain successful long-term infection. In heavily infected root canals, these virulence factors may contribute to the pathogenesis of post-treatment disease.

Acknowledgments

The authors deny any conflicts of interest related to this study.

References

- Ruiz-Garbajosa P, Bonten MJ, Robinson DA, et al. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of recombination. *J Clin Microbiol* 2006;44:2220–8.
- McBride SM, Fischetti VA, Leblanc DJ, et al. Genetic diversity among *Enterococcus faecalis*. *PLoS One* 2007;2:e582.
- Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, et al. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 2003;36:1–11.
- Rocas IN, Siqueira JF Jr, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004;30:315–20.
- Gomes BP, Pinheiro ET, Jacinto RC, et al. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. *J Endod* 2008;34:537–40.
- Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998;31:1–7.
- Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;85:86–93.
- Pinheiro ET, Penas PP, Endo M, et al. Capsule locus polymorphism among distinct lineages of *Enterococcus faecalis* isolated from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *J Endod* 2012;38:58–61.
- Gal-Mor O, Finlay BB. Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. *Cell Microbiol* 2006;8:1707–19.
- Shankar N, Baghdadyan AS, Gilmore MS. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature* 2002;417:746–50.
- McBride SM, Coburn PS, Baghdadyan AS, et al. Genetic variation and evolution of the pathogenicity island of *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* 2009;191:3392–402.
- Gales AC, Sader HS, Ribeiro J, et al. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated in Brazilian hospitals participating in the SENTRY Program (2005–2008). *Braz J Infect Dis* 2009;13:90–8.
- d'Azevedo PA, Santiago KA, Furtado GH, et al. Rapid detection of vancomycin-resistant enterococci (VRE) in rectal samples from patients admitted to intensive care units. *Braz J Infect Dis* 2009;13:289–93.
- Ulrich RL, Hughes TA. A rapid procedure for isolating chromosomal DNA from *Lactobacillus* species and other Gram-positive bacteria. *Lett Appl Microbiol* 2001;32:52–6.
- Thurlow LR, Thomas VC, Hancock LE. Capsular polysaccharide production in *Enterococcus faecalis* and contribution of CpsF to capsule serospecificity. *J Bacteriol* 2009;191:6203–10.
- Sun J, Song X, Kristiansen BE, et al. Occurrence, population structure, and antimicrobial resistance of enterococci in marginal and apical periodontitis. *J Clin Microbiol* 2009;47:2218–25.
- Freitas AR, Novais C, Ruiz-Garbajosa P, et al. Clonal expansion within clonal complex 2 and spread of vancomycin-resistant plasmids among different genetic lineages of *Enterococcus faecalis* from Portugal. *J Antimicrob Chemother* 2009;63:1104–11.
- Jamet E, Akary E, Poisson MA, et al. Prevalence and characterization of antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* in French cheeses. *Food Microbiol* 2012;31:191–8.
- Zehnder M, Guggenheim B. The mysterious appearance of enterococci in filled root canals. *Int Endod J* 2009;42:277–87.
- Vidana R, Sullivan A, Billstrom H, et al. *Enterococcus faecalis* infection in root canals: host-derived or exogenous source? *Lett Appl Microbiol* 2011;52:109–15.
- d'Azevedo PA, Furtado GH, Medeiros EA, et al. Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus* strains eight years apart from its first isolation in Sao Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2008;50:195–8.
- Shankar N, Lockett CV, Baghdadyan AS, et al. Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Infect Immun* 2001;69:4366–72.
- Shankar V, Baghdadyan AS, Huycke MM, et al. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infect Immun* 1999;67:193–200.

24. Zoletti GO, Pereira EM, Schuenck RP, et al. Characterization of virulence factors and clonal diversity of *Enterococcus faecalis* isolates from treated dental root canals. *Res Microbiol* 2011;162:151–8.
25. Sedgley CM, Molander A, Flannagan SE, et al. Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic *Enterococcus* spp. *Oral Microbiol Immunol* 2005; 20:10–9.
26. Shankar N, Coburn P, Pillar C, et al. Enterococcal cytolysin: activities and association with other virulence traits in a pathogenicity island. *Int J Med Microbiol* 2004;293: 609–18.
27. Hallgren A, Claesson C, Saeedi B, et al. Molecular detection of aggregation substance, enterococcal surface protein, and cytolysin genes and *in vitro* adhesion to urinary catheters of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* of clinical origin. *Int J Med Microbiol* 2009;299:323–32.
28. Eaton TJ, Gasson MJ. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:1628–35.
29. Coque TM, Patterson JE, Steckelberg JM, Murray BE. Incidence of hemolysin, gelatinase, and aggregation substance among enterococci isolated from patients with endocarditis and other infections and from feces of hospitalized and community-based persons. *J Infect Dis* 1995;171:1223–9.
30. Giard JC, Laplace JM, Rince A, et al. The stress proteome of *Enterococcus faecalis*. *Electrophoresis* 2001;22:2947–54.
31. Giard JC, Rince A, Capioux H, et al. Inactivation of the stress- and starvation-inducible *gls24* operon has a pleiotrophic effect on cell morphology, stress sensitivity, and gene expression in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* 2000;182: 4512–20.
32. Sun J, Song X. Assessment of antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolated from chronic periodontitis in biofilm versus planktonic phase. *J Periodontol* 2011;82:626–31.
33. Sun J, Sundsfjord A, Song X. *Enterococcus faecalis* from patients with chronic periodontitis: virulence and antimicrobial resistance traits and determinants. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31:267–72.
34. Poeta P, Igrejas G, Goncalves A, et al. Influence of oral hygiene in patients with fixed appliances in the oral carriage of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* and *Enterococcus* isolates. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009; 108:557–64.