

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO CLONAL E FATORES DE VIRULÊNCIA EM
ENTEROCOCOS ISOLADOS DE IMATUROS DE
Heliconius erato phyllis (LEPIDOPTERA – NYMPHALIDAE)**

ROSANA HUFF

Porto Alegre

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

Rosana Huff
Bióloga – UFRGS

**DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO CLONAL E FATORES DE VIRULÊNCIA EM
ENTEROCOCOS ISOLADOS DE IMATUROS DE
Heliconius erato phyllis (LEPIDOPTERA – NYMPHALIDAE)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestra em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Paula Guedes Frazzon

Porto Alegre

2018

iii

CIP - Catalogação na Publicação

Huff, Rosana

DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO CLONAL E FATORES DE
VIRULÊNCIA EM ENTEROCOCOS ISOLADOS DE IMATUROS DE
Heliconius erato phyllis (LEPIDOPTERA - NYMPHALIDAE)
/ Rosana Huff. -- 2018.

83 f.

Orientador: Ana Paula Guedes Frazzon.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Enterococcus. 2. Diversidade Genética . 3.
Resistência . 4. Fatores de Virulência . 5.
Heliconius erato phyllis. I. Guedes Frazzon, Ana
Paula, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“There is a pleasure in the pathless woods,
There is a rapture on the lonely shore,
There is society, where none intrudes,
By the deep Sea, and music in its roar:
I love not Man the less, but Nature more [...].”

George Gordon Byron

AGRADECIMENTOS

À Ana Paula Guedes Frazzon por tua orientação e por estares sempre tão presente e disposta a ajudar na solução de qualquer problema que surgiu durante todo o período do mestrado. Por tu seres além de uma orientadora incrível, ainda amiga, mãe e parceira de todos os teus alunos, por ter a sensibilidade de observar nossas individualidades como pessoa e como pesquisadores, e pela tua humildade e alegria que inspira e cativa todos a tua volta. Foi um privilégio trilhar esse caminho sob tua orientação!

A todos os colegas do Laboratório 222C pela ajuda em experimentos, pelo convívio, risadas e momentos diários de descontração. Em especial à IC Taiah Rajeh Rosin pela ajuda nos géis de eletroforese e à Gabriella Oliveira de Araujo pela parceria durante as aulas e apoio incondicional.

Ao professor Pedro Alves d'Azevedo da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) pela parceria para o desenvolvimento de todas as análises referentes à técnica de PFGE do presente estudo, bem como a todos os integrantes do Laboratório de Cocos Gram-Positivos, em especial à Rebeca Inhoque Pereira e à Renata Oliveira Soares pelos ensinamentos, paciência e parceria durante um ano de análises.

À Caroline Pissetti pela disponibilidade, paciência e parceria para as análises dos resultados do PFGE.

À minha família pela paciência e compreensão nos momentos de ausência, pelo apoio incondicional e por acreditarem em mim sempre. Mãe Iza M^a Cabral Fagundes Ferreira, pai Valter Sérgio Huff, mana Mariana Huff e mano Maurício Huff, vocês são a minha base e sou muito grata por todo apoio, amor e incentivo em todos os momentos. Amo vocês demais!

Aos amigos tão queridos que compartilharam comigo a alegria de ingressar na pós graduação, que me apoiaram durante esses dois anos e estiveram comigo entre sorrisos mas também nos momentos difíceis; em especial à Gabriella Oliveira de Araújo, ao Lucas Einsfeld e à Samantha Schaff de Godoi, esse trabalho tem um pouquinho de cada um de vocês também! Amo vocês!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) pela concessão da bolsa, sem a qual não seria possível realizar o presente estudo.

**DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO CLONAL E FATORES DE
VIRULÊNCIA EM ENTEROCOCOS ISOLADOS DE IMATUROS DE
Heliconius erato phyllis (LEPIDOPTERA – NYMPHALIDAE)¹**

Autora: Rosana Huff

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Paula Guedes Frazzon

RESUMO

Enterococcus estão presentes no trato gastrointestinal (TGI) de animais vertebrados e invertebrados, os quais podem adquirir estas bactérias através de mecanismos de transferência horizontal e vertical de micro-organismos. Pesquisas recentes descreveram a presença de *Enterococcus* em lepidópteros, porém estudos com borboletas do gênero *Heliconius* são escassos. Este trabalho teve como objetivo, a partir de uma bacterioteca de 178 *Enterococcus* sp. previamente isolados de fezes de imaturos de *Heliconius erato phyllis* detectar a presença de genes de resistência e virulência por PCR; avaliar fenotipicamente os fatores de virulência e a produção de compostos com atividade antimicrobiana; e avaliar o perfil clonal das cepas pela técnica de PFGE. Dos 178 enterococos, 55 apresentavam resistência a eritromicina e 11 a norfloxacin e/ou ciprofloxacina, porém não foi detectado nenhum gene relacionado a estes fenótipos de resistência. Quanto aos fatores de virulência testados nos 178 enterococos, 63 isolados amplificaram para o gene *esp*, 12 para *ace* e 2 para *gelE*. Os genes *agg* e *cylA* não foram detectados. Na análise fenotípica dos fatores de virulência, os dois *E. faecalis* positivos para *gelE* também foram positivos para a degradação da gelatinase e 130 enterococos apresentaram capacidade de hidrolisar hemácias. Para investigar a produção de substância antagonista, foram selecionados 26 enterococos; destes, 15 apresentaram atividade contra a bactéria indicadora *Listeria monocytogenes*. Oitenta e seis isolados foram selecionados para avaliar a relação clonal por PFGE, e foi possível observar a partir do dendrograma que os enterococos no TGI dos imaturos têm origem alimentar e materna. Conclui-se que os enterococos provenientes de amostras fecais de imaturos de *H. erato phyllis* possuem poucos genes relacionados a mecanismos de virulência comuns na área clínica. É possível que os *Enterococcus* produtores de substância antagonista desempenhem um papel importante no equilíbrio das comunidades microbianas do TGI deste inseto, e que ocorra a transferência vertical de micro-organismos das fêmeas para a prole para a espécie *H. erato phyllis*.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (90 p.) julho, 2018.

DETERMINATION OF CLONAL RELATIONSHIP AND VIRULENCE
FACTORS IN ENTEROCOCCI ISOLATED FROM IMMATURES OF
Heliconius erato phyllis (LEPIDOPTERA – NYMPHALIDAE)¹

Author: Rosana Huff

Advisor: Prof.^a Dr.^a Ana Paula Guedes Frazzon

ABSTRACT

Enterococcus is present in the gastrointestinal (GI) tract of vertebrates and invertebrates, which can acquire these bacteria through mechanisms of horizontal and vertical transfer of microorganisms. Recent research has described the presence of *Enterococcus* in Lepidoptera, but studies with butterflies of the genus *Heliconius* are scarce. This study had as objective, from a bacterioteca of 178 *Enterococcus* sp. previously isolated from fecal samples of immature *Heliconius erato phyllis* detect the presence of resistance and virulence genes by PCR; phenotypically assess the virulence factors and the production of compounds with antimicrobial activity; and to evaluate the clonal profile of the strains by PFGE. Of the 178 enterococci, 55 were resistant to erythromycin and 11 resistant to norfloxacin and/or ciprofloxacin, however was not detected any gene related to these resistance phenotypes. The virulence factors were tested in 178 enterococci, and 63 isolated amplified for the *esp* gene, 12 for *ace* and 2 for *gelE*. The *agg* and *cylA* genes were not detected. In the phenotypic analyzes, both *E. faecalis* positive to *gelE* gene were also positive for the degradation of gelatinase, and 130 enterococci showed ability to hydrolyze red blood cells. To investigate the production of antagonistic substance, 26 enterococci were selected and of these, 15 showed activity against the indicator bacteria *Listeria monocytogenes*. Eighty-six isolates were selected to evaluate the clonal profile by PFGE, and it was possible to observe in the dendrogram that the origin of the enterococci in GIT of immatures was the herbivory and maternal origin. It is concluded that the enterococci from fecal samples of immature *H. erato phyllis* possess few mechanisms of virulence-related genes, common in the clinical area. It is possible that the antagonistic substance-producing enterococci could play an important role in the equilibrium of the microbial communities of the GIT of this insect, and there is vertical transmission of enterococci from females to their offspring to the specie *H. erato phyllis*.

¹Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (90 p.) July, 2018.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	2
2.1	Objetivo Geral	2
2.2	Objetivos Específicos	2
2.2.1	Objetivo Específico 1	2
2.2.2	Objetivo Específico 2	2
2.2.3	Objetivo Específico 3	2
2.2.4	Objetivo Específico 4	2
3.	REVISÃO DA LITERATURA	3
3.1	Borboletas do gênero <i>Heliconius</i> (Lepidoptera – Nymphalidae)	3
3.2	Micro-organismos e Insetos	8
3.3	O Gênero <i>Enterococcus</i>	9
3.4	<i>Enterococcus</i> sp. e a Resistência a Antimicrobianos	11
3.4.1	Resistência Intrínseca e Adquirida	11
3.4.2	β -lactâmicos	12
3.4.3	Aminoglicosídeos	13
3.4.4	Macrolídeos	13
3.4.5	Quinolonas	13
3.4.6	Glicopeptídeos	14
3.5	<i>Enterococcus</i> e os Fatores de Virulência	15
3.6	Produção de Bacteriocinas	16
3.7	Eletroforese em Campo-Pulsado (PFGE)	18
4.	MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1	Origem das Amostras - <i>H. erato phyllis</i>	20
4.2	Bacterioteca de <i>Enterococcus</i> sp. Isolados de Amostras Fecais de Imaturos de <i>H. erato phyllis</i>	23
4.3	Detecção dos Genes de Resistência nos Enterococos	23
4.4	Avaliação Genotípica e Fenotípica dos Fatores de Virulência nos Enterococos	25
4.4.1	Detecção Genotípica dos Fatores de Virulência	25
4.4.2	Avaliação de Atividade da Gelatinase	26
4.4.3	Avaliação de Atividade Hemolítica	26
4.5	Detecção da Produção de Compostos com Atividade Antimicrobiana	27
4.5.1	Triagem dos Isolados Produtores de Substância Antagonista	27
4.5.2	Detecção Genotípica da Enterocina <i>mundticin</i> KS por PCR	28
4.6	Análise da Diversidade Genética dos Enterococos por PFGE	28
4.6.1	Extração do DNA Genômico	28
4.6.2	Digestão com enzima de Restrição <i>Sma</i> I	30
4.6.3	Separação dos Fragmentos de Restrição	31
4.7	Análise Estatística	31
5.	RESULTADOS	32

5.1	Detecção do Genes de Resistência e Fatores de Virulência	32
5.2	Análise Fenotípica dos Fatores de Virulência	34
5.3	Produção de Substância Antagonista	35
5.4	Avaliação da Diversidade Genética dos Enterococos Isolados de Fezes de Imaturos de Borboletas por PFGE	39
6.	DISCUSSÃO	42
6.1	<i>Enterococcus</i> e a Resistência a Antimicrobianos	42
6.2	Detecção Genotípica e Fenotípica dos Fatores de Virulência nos Enterococos	46
6.3	Produção de Compostos com Atividade Antimicrobiana.....	49
6.4	Análise da Diversidade Genética por PFGE	51
7.	CONCLUSÃO	56
8.	REFERÊNCIAS	58

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Detalhes da coleta de amostras fecais dos doze imaturos de <i>H. erato phyllis</i> utilizados no estudo.....	22
Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores, sequências de DNAs, temperaturas de anelamento (TA) e massa molecular geradas nas reações de PCR para os genes de resistência a macrolídeos (<i>ermA</i> , <i>ermB</i> , <i>ermC</i> , <i>msrC</i>) e quinolonas (<i>gyrA</i>), e para os fatores de virulência <i>gelE</i> , <i>cylA</i> , <i>ace</i> , <i>esp</i> e <i>agg</i>	25
Tabela 3. Origem, identificação e perfil de suscetibilidade a antimicrobianos dos <i>Enterococcus</i> utilizados para a técnica de PFGE.....	30
Tabela 4. Relação entre as espécies de enterococos isoladas de fezes de imaturos de <i>H. erato phyllis</i> positivas para amplificação dos genes de virulência por PCR.....	33
Tabela 5. Relação entre os locais de coleta das fêmeas de <i>H. erato phyllis</i> e os resultados positivos para amplificação dos genes de virulência por PCR.....	34
Tabela 6. <i>Enterococcus</i> da bacterioteca selecionados para análise de produção de substância antagonista contra <i>L. monocytogenes</i>	36
Tabela 7. Diâmetros dos halos observados nos <i>Enterococcus</i> positivos para a produção de substância antagonista contra <i>L. monocytogenes</i>	37

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Adulto de <i>H. erato phyllis</i> com proboscide contendo grãos de pólen. Insetário do Departamento de Genética – UFRGS.....	4
Figura 2. <i>P. suberosa</i> , indicada em setas amarelas, utilizada pelas fêmeas para ovoposição. Insetário do Departamento de Genética – UFRGS.....	5
Figura 3. Dormitório com três adultos de <i>H. erato phyllis</i> observado ao amanhecer, em insetário do Departamento de Genética – UFRGS.....	6
Figura 4. Adulto de <i>H. erato phyllis</i> em insetário do Departamento de Genética – UFRGS.....	7
Figura 5. Ciclo de vida de <i>H. erato phyllis</i> . A) Ovo no meristema apical de <i>P. suberosa</i> . B) Lagarta de primeiro estágio em <i>P. suberosa</i> . C) Lagarta de quinto estágio em <i>P. suberosa</i> . D) Pupa. Fotos: Jorge Bernardo-Silva.....	8
Figura 6. A) Locais de coleta das fêmeas de <i>H. erato phyllis</i> no Estado do RS; detalhe dos locais de coleta por fêmea: B) HEAB2; C) HES2; D) HEV2.	21
Figura 7. Adultos de <i>H. erato phyllis</i> alimentando-se em insetário do Departamento de Genética – UFRGS.....	22
Figura 8. Ilustração das fêmeas adultas e dos imaturos utilizados no estudo. Fêmea HEAB2 e proles 6, 7, 10, 11, 14; fêmea HEV2 e proles 9, 18, 26, 27, 29; fêmea HES2 e proles 3 e 17, totalizando 12 amostras. Os imaturos da mesma fêmea foram considerados irmãos, já que fêmeas de <i>H. erato phyllis</i> são monândricas. Ilustração: Gabriella Oliveira de Araujo.....	23
Figura 9. Teste fenotípico da enzima gelatinase. A) <i>E. casseliflavus</i> 6.12 utilizado como controle negativo (meio sólido) e <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 como controle positivo (meio líquido). B) Controle negativo e isolados <i>E. faecalis</i> 6.18 e 6.19 com resultado positivo (meio líquido).....	34
Figura 10. Teste fenotípico para atividade hemolítica. Setas vermelha e amarela indicam cepa positiva e negativa para atividade hemolítica, respectivamente.....	35
Figura 11. Halos formados pelos enterococos isolados de fezes de imaturos de borboletas frente a cepa teste <i>L. monocytogenes</i> em ensaio da sobrecamada. Setas indicam o local da inoculação dos <i>Enterococcus</i> por picada. A) 11.6 (negativo); B) 14.1; C) 14.2; D) 14.3; E) 14.4; F) 14.5; G) 14.7; H) 14.8; I) 14.9; J) 14.10; K) 14.12; L) 14.14; M) 14.15; N) 14.16; O) 14.17; P) 14.18.....	39

Figura 12. Dendrograma dos perfis clonais de *Enterococcus* isolados de amostras fecais de imaturos de *H. erato phyllis*, gerados a partir da fragmentação do DNA genômico pela enzima de restrição *Sma*I pela técnica de PFGE.....

40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus centígrados
µg	Microgramas
µM	Micromolar
µL	Microlitros
AACs	Acetiltransferases
ANTs	Nucleotidiltransferases
APHs	Fosfotransferases
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	Agar infusão cérebro e coração (<i>Brain Heart Infusion Agar</i>)
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
HCl	Ácido Clorídrico
kDa	Kilodaltons
m	Metros
M	Molar
mg	Miligramas
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitros
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
ng	Nanogramas
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PFGE	Eletroforese em Campo Pulsado (<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i>)
pH	Potencial Hidrogeniônico
PLP	Proteínas de Ligação à Penicilina
rpm	Rotações por minuto
TA	Temperatura de Anelamento
TBE	Tampão Tris Ácido-Bórico EDTA
TGI	Trato Gastrointestinal
TSA	Agar Triptona de Soja (<i>Tryptone soya agar</i>)

U	Unidade
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UPGMA	<i>Unweighted Pair Method Using Arithmetic Averages</i>
VRE	<i>Enterococcus</i> Resistentes a Vancomicina

1. INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Enterococcus* têm morfologia celular de cocos Gram-positivos, são catalase negativas, resistentes a altas concentrações de sal e capazes de hidrolisar a esculina na presença de sais biliares (Lebreton *et al.*, 2014). São amplamente distribuídas no solo, na vegetação, e em ambientes aquáticos e terrestres (Byappanahalli *et al.*, 2012). São frequentemente associadas a endocardites, infecções do trato urinário e septicemia em estudos clínicos (Hollenbeck & Rice, 2012). Possuem resistência intrínseca e adquirida a uma ampla variedade de antimicrobianos, motivo de preocupação tanto para saúde pública quanto em relação à disseminação destas cepas resistentes no ambiente (Miller *et al.*, 2014). Além de fazerem parte da microbiota normal do trato gastrointestinal (TGI) de humanos, bem como patógenos oportunistas na área clínica, diversas pesquisas apontam para sua ocorrência no ambiente, além de compor a microbiota normal do TGI dos mais diversos animais, dentre eles os invertebrados (Engel & Moran, 2013).

Borboletas do gênero *Heliconius* são organismos modelo para estudos evolutivos e ecológicos, porém pouco se sabe a respeito da microbiota destes insetos, bem como da diversidade de espécies de *Enterococcus* em seu TGI. Pesquisas já descreveram a presença deste gênero em lepidópteros, porém trabalhos envolvendo a borboleta *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera – Nymphalidae), comumente encontrada no sul do Brasil, ainda não foram realizados. Entre as pesquisas recentes com borboletas, destaca-se o estudo realizado por Hammer *et al.* (2014), que identificaram *Enterococcus* como o gênero mais abundante no TGI de adultos e imaturos de uma subespécie de *H. erato* do Panamá.

Assim, através deste trabalho pretende-se ampliar os conhecimentos a respeito da interação micro-organismo hospedeiro, através da análise da diversidade e dos fatores de virulência de *Enterococcus* sp. em amostras fecais de imaturos de *H. erato phyllis* provenientes de diferentes regiões do Rio Grande do Sul, Brasil.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar genotípica e fenotipicamente bactérias do gênero *Enterococcus* isoladas de amostras fecais de imaturos da borboleta *H. erato phyllis* (Lepidoptera – Nymphalidae) do Rio Grande do Sul – Brasil.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Objetivo específico 1

Detectar a presença dos genes de resistência *ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrC* e mutações no gene *gyrA* nos enterococos com resistência intermediária a eritromicina e quinolonas provenientes de fezes de imaturos da borboleta *H. erato phyllis*;

2.2.2 Objetivo específico 2

Analisar genotípica e fenotipicamente a presença de fatores de virulência em todos os enterococos isolados de fezes de imaturos da borboleta *H. erato phyllis*;

2.2.3 Objetivo específico 3

Verificar a capacidade dos *Enterococcus* sp. coletados das fezes de imaturos da borboleta *H. erato phyllis* produzirem compostos com atividade antimicrobiana;

2.2.4 Objetivo específico 4

Determinar a relação clonal entre os *Enterococcus* isolados de fezes de imaturos provenientes de diferentes fêmeas, pela técnica de *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE).

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Borboletas do gênero *Heliconius* (Lepidoptera – Nymphalidae)

Borboletas do gênero *Heliconius* possuem ampla distribuição, sendo encontradas desde a América do Sul até o sul do México. Estes insetos neotropicais são considerados como organismos modelo para diversos estudos devido à facilidade de criação e sua longevidade; dentre os estudos mais recentes estão: coevolução e plantas hospedeiras (de Castro *et al.*, 2018), evolução do padrão de coloração e comportamento (Finkbeiner *et al.*, 2017), fotorreceptores e dimorfismo sexual (McCulloch *et al.*, 2016), morfologia e evolução do cérebro (Montgomery *et al.*, 2016), expressão gênica e alimentação por pólen (Smith *et al.*, 2016), reconhecimento de parentesco e herdabilidade (De Nardin *et al.*, 2016), expressão gênica e mimetismo (Nadeau, 2016), embriogênese e evo-devo (Aymone *et al.*, 2014), dentre outros.

Uma característica que distingue este gênero dos demais lepidópteros é a capacidade de utilizarem tanto o néctar quanto o pólen como fonte de nutrientes (Figura 1); os grãos de pólen ficam retidos no aparelho bucal dos adultos, que liberam saliva e realizam movimentos de extensão e retração da proboscide a fim de ingerir os nutrientes liberados pelos grãos (Hikl & Krenn, 2011). Esta alimentação rica em nitrogênio é uma fonte importante de aminoácidos, e possibilita que as fêmeas ovipositem de forma constante durante toda a vida (em média, de um a quatro ovos por dia) (Gilbert, 1972). A ovoposição durante toda a vida adulta depende fortemente da alocação de recursos pelas fêmeas, permitindo que os imaturos permaneçam menos tempo nas fases larvais, ou seja, permaneçam menos tempo expostos à predação e a parasitoides, resultando em maior sobrevivência da prole (Gilbert, 1972). Além disso, esta alimentação está associada à longevidade dos adultos, os quais podem sobreviver por um período de até seis meses tanto em insetários quanto na natureza (Gilbert, 1972; Dunlap-Pianka *et al.*, 1977). A utilização do pólen também auxilia na diminuição da competição interespecífica, já que outros lepidópteros podem alimentar-se das mesmas flores, porém utilizando somente o néctar como fonte de nutrientes.



Figura 1. Adulto de *H. erato phyllis* com proboscide contendo grãos de pólen. Insetário do Departamento de Genética – UFRGS.

Diversas espécies da família *Passifloraceae*, os maracujás conhecidos como flor da paixão ou *passion vine flowers*, são utilizadas como planta hospedeira para ovoposição das fêmeas e alimentação das lagartas. Dentre elas, pode-se citar as espécies *Passiflora suberosa*, *P. misera*, *P. capsularis*, *P. alata*, *P. edulis* e *P. caerulea* (Menna-Barreto & Araújo, 1985) (Figura 2).

de Castro *et al.* (2018) reuniram em uma recente revisão os diferentes mecanismos de defesa utilizados por estas plantas contra os hospedeiros, como: a) produção de glicosídeos cianogênicos, para evitar a herbivoria; b) variações na morfologia foliar, a fim de evitar o reconhecimento e ovoposição pelas fêmeas (Dell'aglio *et al.*, 2016); c) presença de nectários extraflorais, que atuam como atrativos principalmente para formigas, predadoras de lagartas e ovos de *Heliconius* (Labeyrie *et al.*, 2001); d) tricomas, que dificultam a locomoção e herbivoria pelas imaturos (Gilbert, 1971); e) estruturas mimetizando ovos, a fim de desencorajar a ovoposição pelas fêmeas (Williams & Gilbert, 1981); e f) dentre outros, descritos para diversas espécies do gênero *Passiflora*. Os autores comparam estes mecanismos a uma “corrida armamentista” entre *Passiflora* e *Heliconius*. A coevolução que ocorreu entre estes organismos é evidenciada pelos diferentes mecanismos de defesa das passifloráceas, que exibiram características a fim de

desencorajar a ovoposição pelas fêmeas e a herbivoria pelas lagartas, ao mesmo tempo, seguido pela seleção de imaturos e adultos com adaptações capazes de superar tais novidades evolutivas das plantas.



Figura 2. *P. suberosa*, indicada em setas amarelas, utilizada pelas fêmeas para ovoposição. Insetário do Departamento de Genética – UFRGS.

Borboletas do gênero *Heliconius* realizam a busca visual por plantas hospedeiras, além do comportamento de inspeção das plantas por meio de quimiorreceptores localizados na proboscide, palpos labiais, antenas e pernas, antes da postura dos ovos (Briscoe *et al.*, 2013; Thiele *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2018); sendo assim, as fêmeas utilizam mais de uma estratégia para obter sucesso na identificação das plantas hospedeiras e na ovoposição.

Os glicosídeos cianogênicos produzidos pelas passifloráceas são tóxicos para os herbívoros que as ingerem, porém imaturos do gênero *Heliconius* são capazes de utilizar estas espécies de plantas como recurso. As lagartas assimilam e sequestram estes compostos liberados pelas folhas, tornando os indivíduos impalatáveis para os predadores que as ingerirem. Os compostos tóxicos são encontrados em maior concentração nos adultos, e também são transferidos das fêmeas aos ovos (Hay-Roe & Nation, 2007). Cardoso & Gilbert (2013) observaram a presença de compostos tóxicos em adultos recém-emergidos de três espécies de *Heliconius* (*H. charithonia*, *H. cydno* e *H. ethilla*), indicando que a defesa química

presente nos adultos se deve em parte à alimentação herbívora dos estádios imaturos, porém também pode ser sintetizada *de novo* pelos adultos.

A coloração vibrante dos adultos evidencia sua impalatabilidade e serve como alerta para os predadores. O fenômeno de convergência entre padrões de coloração aposemáticos nas diferentes espécies não palatáveis é comum, e é conhecido como mimetismo Mülleriano (Müller, 1879). Neste fenômeno, ambas as presas se beneficiam pela diminuição do risco individual de predação, decorrente do aprendizado e associação do padrão de coloração a uma experiência desagradável pelo predador (Merrill *et al.*, 2015). O mimetismo Mülleriano é observado nas diversas espécies do gênero *Heliconius*, sendo esta uma das grandes áreas de interesse e estudo para estes insetos.

Ao anoitecer, é possível observar a agregação de adultos em locais comuns na vegetação, formando dormitórios (Salcedo, 2010) (Figura 3) e cerca de duas horas após o amanhecer ocorre a dispersão destes locais. Finkbeiner *et al.* (2012) observaram que este comportamento diminui o risco de predação quando comparado a indivíduos solitários, beneficiando os adultos em agregação.



Figura 3. Dormitório com três adultos de *H. erato phyllis* observado ao amanhecer, em insetário do Departamento de Genética – UFRGS.

A subespécie *H. erato phyllis* (Figura 4) ocorre desde o nordeste do Brasil até o norte da Argentina. Estas borboletas são encontradas desde florestas até ambientes urbanos, apresentando grande plasticidade ecológica. As fêmeas

adultas ovopositam individualmente no meristema apical da planta hospedeira, e os imaturos possuem cinco estádios larvais (Figura 5). A planta hospedeira preferencialmente utilizada pelas lagartas é *P. misera*, porém a abundância e qualidade das plantas disponíveis no ambiente podem alterar esta preferência (Rodrigues & Moreira, 2002). Após a eclosão dos ovos as lagartas passam a se alimentar do tecido jovem da planta, proporcionando-as melhor sobrevivência e desenvolvimento quando comparado àquelas que se alimentam de folhas maduras (Rodrigues & Moreira, 2002).



Figura 4. Adulto de *H. erato phyllis* em insetário do Departamento de Genética – UFRGS.

Outro aspecto interessante da biologia destas borboletas é que, no estágio larval, apresentam comportamento canibal com reconhecimento de parentesco, ou seja, reconhecem e canibalizam preferencialmente lagartas não parentes (De Nardin *et al.*, 2016). A postura individual dos ovos pode ser relacionada ao comportamento canibal, já que em espécies que realizam posturas de vários ovos agrupados, com lagartas gregárias, não se observa o canibalismo.

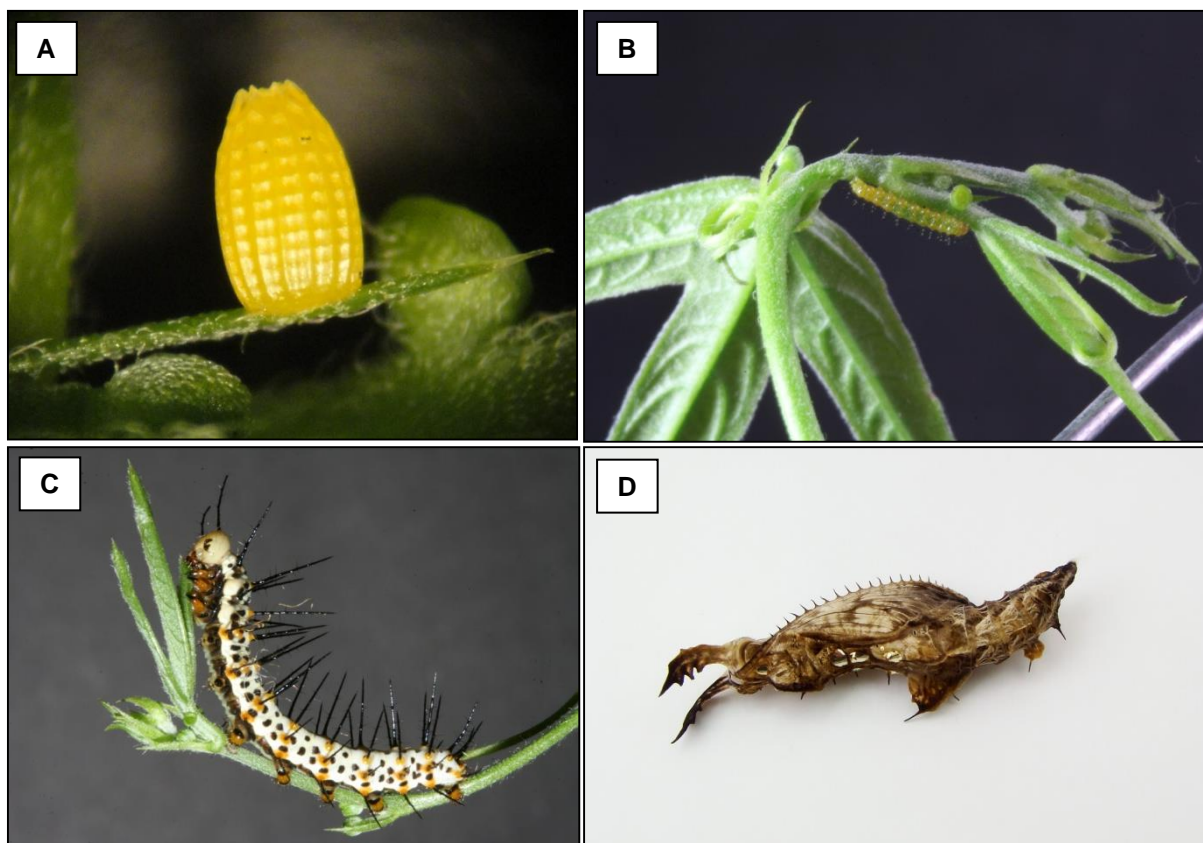


Figura 5. Ciclo de vida de *H. erato phyllis*. A) Ovo no meristema apical de *P. suberosa*. B) Lagarta de primeiro estágio em *P. suberosa*. C) Lagarta de quinto estágio em *P. suberosa*. D) Pupa. Fotos: Jorge Bernardo-Silva.

3.2 Micro-organismos e Insetos

Assim como ocorre para humanos e demais vertebrados, a diversificação e sucesso evolutivo dos insetos também depende em parte de suas interações com micro-organismos, os quais são responsáveis por aprimorar dietas pobres em nutrientes, auxiliar no desenvolvimento e maturação do sistema imune do hospedeiro, proteger o hospedeiro contra parasitas e patógenos, bem como auxiliar na detoxificação de compostos secundários presentes nos tecidos vegetais ingeridos pelos insetos (Dillon & Dillon, 2004; Douglas, 2009; Engel & Moran, 2013). A partir de técnicas moleculares independentes de cultivo, a identificação e descrição das comunidades microbianas que compõem o TGI dos insetos pode ser melhor compreendida, bem como as funções que tais micro-organismos desempenham para estes invertebrados. Aspectos quanto à microbiota da borboleta *H. erato phyllis* ainda são pouquíssimo estudados, sendo o trabalho de Hammer *et al.* (2014) o único estudo realizado até então, a partir de amostras de uma subespécie de *H.*

erato do Panamá. Estudos que investiguem a diversidade de espécies do gênero *Enterococcus* presentes no TGI da subespécie *H. erato phyllis* ainda não foram realizados.

A aquisição de micro-organismos nos insetos se dá tanto pela alimentação, quanto pela interação dos insetos com o ambiente. Em insetos eusociais como abelhas, formigas e cupins, as interações entre os adultos, bem como o cuidado parental com os imaturos, facilita a disseminação de micro-organismos (Engel & Moran, 2013). Dentre as regiões a serem colonizadas por micro-organismos pode-se citar o exoesqueleto dos insetos, local que está mais exposto ao ambiente; contudo, a descrição de uma microbiota residente nesta região corporal, como é descrito para humanos, por exemplo, ainda não é conhecida (Douglas, 2015). Outro local a ser colonizado é o TGI dos insetos, local de fácil acesso a nutrientes e que oferece proteção contra condições desfavoráveis do ambiente externo (como a dessecação); porém, a produção de enzimas e as diferentes variações de pH (pH 8 – 12 para lepidópteros, por exemplo) no TGI dos insetos também eliminam grande parte dos micro-organismos ingeridos (Douglas, 2015). Por fim, algumas espécies de insetos também podem ser infectadas a nível celular, e células do hospedeiro contendo tais micro-organismos são chamadas de bacteriocitos (Douglas, 2015).

Apesar de rico em fonte de nutrientes, o TGI dos insetos representa um ambiente instável para a colonização microbiana; a troca do exoesqueleto nas sucessivas mudas durante o estágio larval, como no caso das lagartas de lepidópteros, também renova parte dos tecidos do sistema digestivo, representando um desafio para a colonização do TGI por micro-organismos (Engel & Moran, 2013). Além disso, sabe-se que a complexidade do sistema digestivo dos insetos está diretamente relacionada à complexidade das comunidades microbianas residentes, e que as condições desse microambiente modulam a diversidade de micro-organismos ali presentes, mas também são moduladas pelas comunidades microbianas residentes, como no caso da diminuição de pH ocasionada pela colonização de *Enterococcus* (Dillon & Dillon, 2004).

3.3 O Gênero *Enterococcus*

Enterococcus são micro-organismos residentes da microbiota normal do TGI dos mais diversos animais, dentre eles os insetos. Atualmente estão descritas

58 espécies pertencentes ao gênero (LPSN, 2018), sendo *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. mundtii*, *E. durans*, *E. hirae* e *E. gallinarum* as mais comumente encontradas.

Em estudos realizados cerca de 40 anos atrás, pesquisadores já obtinham sucesso no isolamento e identificação das espécies *E. faecalis*, *E. faecium* e *E. casseliflavus* em oito ordens de insetos, a partir de amostras de besouros, moscas, abelhas, vespas, cupins, grilos, borboletas, dentre outros insetos, capturados em ambientes naturais (Martin & Mundt, 1972). Estudos mais recentes relataram a ocorrência de enterococos nas grandes ordens Coleoptera (Kim *et al.*, 2017), Hymenoptera (Audisio *et al.*, 2011) e Diptera (Ghosh *et al.*, 2014). Outros estudos também já descreveram a presença de enterococos em diversos insetos (Broderick *et al.*, 2004; Brinkmann *et al.*, 2008; Byappanahalli *et al.*, 2012; Engel & Moran, 2013; Holt *et al.*, 2015).

Um crescente número de estudos referentes à microbiota têm sido realizados com insetos da ordem Lepidoptera, e a abundância do gênero *Enterococcus* no TGI de imaturos e adultos destes insetos têm levantado questões importantes quanto à função destas bactérias nos invertebrados, e da sua importância na manutenção da saúde dos indivíduos (Hammer *et al.*, 2014; Holt *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016; Ruokolainen *et al.*, 2016; Snyman *et al.*, 2016; Teh *et al.*, 2016; Shao *et al.*, 2017).

Enterococcus pertencem ao Filo Firmicutes, são bactérias ácido-láticas, Gram-positivas, anaeróbias facultativas, com morfologia celular de cocos arranjados aos pares ou em cadeias curtas (Schleifer & Kilpper-Balz, 1984). Possuem temperatura ótima de crescimento de 35 °C, porém toleram variações de 10-45 °C. São capazes de crescer em pH de 4.5-10.0, na presença de sais biliares, além de suportarem concentrações de 6,5% de NaCl presentes no meio.

Sua capacidade de sobrevivência em diversos ambientes sob diferentes condições adversas faz com que estes micro-organismos sejam considerados ubíquos, podendo ser encontrados no solo, água, plantas, alimentos e no TGI de uma variedade de espécies incluindo humanos, outros mamíferos e insetos (Byappanahalli *et al.*, 2012; Lebreton *et al.*, 2014). Bactérias do gênero *Enterococcus* também são relatadas na área clínica como causadoras de endocardites e infecções do trato urinário (Hollenbeck & Rice, 2012), sendo as espécies *E. faecium* e *E. faecalis* as mais frequentemente associadas (Shepard & Gilmore, 2002). Além

disso, estas espécies têm sido relatadas como resistentes à maioria dos antimicrobianos comumente utilizados, tornando estes patógenos oportunistas como motivo de preocupação tanto para o tratamento de infecções quanto para a disseminação destas cepas resistentes no ambiente.

A combinação da facilidade de aquisição de mecanismos de resistência e virulência, aliado à capacidade de resistirem sob diferentes condições ambientais, facilita a seleção e disseminação de *Enterococcus* nos mais diversos ambientes (Shepard & Gilmore, 2002).

3.4 *Enterococcus* sp. e a Resistência a Antimicrobianos

Enterococos resistentes são motivo de preocupação para a saúde pública devido à dificuldade no tratamento de infecções hospitalares causadas por estas bactérias (endocardites, meningites e infecções do trato urinário), além de impactarem também o meio ambiente, já que estas cepas se disseminam facilmente e são capazes de colonizar uma ampla variedade de habitats.

Dois tipos de resistência são relatados para enterococos: resistência intrínseca, a qual está presente no cromossomo destas bactérias, e resistência adquirida, obtida através de elementos móveis como plasmídeos ou transposons, além de mutações esporádicas (Miller *et al.*, 2014).

3.4.1 Resistência Intrínseca e Adquirida

A resistência intrínseca dos enterococos, já foi relatada para o grupo dos β -lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas), para clindamicina e baixos níveis de aminoglicosídeos (gentamicina e estreptomicina) (Garrido *et al.*, 2014).

Bactérias do gênero *Enterococcus* também podem adquirir resistência a uma ampla variedade de antimicrobianos, dentre eles: cloranfenicol, clindamicina, estreptomicina, tetraciclina, altos níveis de aminoglicosídeos, penicilina e vancomicina (Murray, 1990).

Evidências sugerem que a enzima β -lactamase, responsável pela clivagem do anel presente nos β -lactâmicos, inativando o antibiótico, relatada em cepas de *E. faecalis* ocorreu pela aquisição do *operon* de β -lactamase de *Staphylococcus aureus*, evidenciando a habilidade deste gênero em adquirir condicionantes de resistência de outros gêneros bacterianos (Shepard & Gilmore, 2002; Miller *et al.*, 2014). A aquisição de plasmídeos carreadores de genes que

codificam resistência a antibióticos facilita a disseminação de cepas resistentes não somente entre uma espécie, mas também entre gêneros bacterianos, como o exemplo de *Enterococcus* e *S. aureus* citado anteriormente. Mutações que conferem resistência também acarretam um custo ao *fitness* do micro-organismo, porém mutações compensatórias podem ser acumuladas rapidamente, anulando estes efeitos negativos, tornando esta cepa resistente altamente persistente na população e de difícil eliminação (Dzidic & Bedeković, 2003).

Devido à proximidade e abundância de micro-organismos, o microambiente do TGI é muito favorável para a ocorrência de transferências gênicas e aquisição de elementos móveis entre diferentes espécies de bactérias. No caso de ambientes hospitalares, a disseminação de cepas resistentes devido ao uso de agentes antimicrobianos se deve tanto pela seleção de cepas resistentes, quanto pelo desequilíbrio da microbiota normal do hospedeiro, que possivelmente realizaria de forma natural a regulação e equilíbrio dos micro-organismos patogênicos. Sendo assim, através de mutações esporádicas e aquisição de elementos móveis como plasmídeos e transposons, o mecanismo de ação de diversos antimicrobianos pode ser inativado, fazendo com que seu uso não seja mais eficaz contra a bactéria em questão (Hollenbeck & Rice, 2012).

3.4.2 β -lactâmicos

Os β -lactâmicos, como a penicilina e ampicilina, são moléculas análogas aos precursores de pentapeptídeos, e interferem na síntese do peptidoglicano presente na parede celular bacteriana através da ligação a proteínas de ligação a penicilina (PLP), que atuam de forma essencial neste processo (Hollenbeck & Rice, 2012). Este mecanismo de ação destes antimicrobianos os torna ideais, já que não são tóxicos às células eucarióticas (Miller *et al.*, 2014).

Contudo, enterococos (principalmente *E. faecium*) possuem resistência intrínseca a baixas concentrações de β -lactâmicos devido à presença de mutações nos genes *pbp5*, que codificam uma PLP com baixa afinidade a estes compostos. Cepas de *E. faecium* também apresentam resistência a altas concentrações destes antimicrobianos (Shepard & Gilmore, 2002). A ocorrência de cepas resistentes a essa classe de antimicrobianos é relatada desde 1970.

3.4.3 Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos atuam inibindo a síntese protéica através de ligações na subunidade 30S ribossomal. Para que esta ligação ocorra, é necessário que o composto seja capaz de entrar na célula, porém enterococos possuem uma baixa permeabilidade celular a estas moléculas, tornando-os resistentes a baixas concentrações deste grupo de antibióticos (Garrido *et al.*, 2014).

A ação sinérgica de aminoglicosídeos com β -lactâmicos pode ser utilizada a fim de facilitar a entrada deste antibiótico na célula, porém altos níveis de resistência podem ser adquiridos devido a mutações na subunidade 30S ribossomal, ou devido à atuação de enzimas que inativam o composto, como as fosfotransferases (APHs), acetiltransferases (AACs) e nucleotidiltransferases (ANTs), diminuindo a afinidade dos aminoglicosídeos pelo ribossomo bacteriano e tornando a ação sinérgica dos compostos ineficaz para estas cepas (Garrido *et al.*, 2014; Miller *et al.*, 2014).

3.4.4 Macrolídeos

A eritromicina, um antimicrobiano da classe dos macrolídeos, atua inibindo a síntese protéica devido à sua ligação na molécula 23S rRNA da subunidade 50S ribossomal. São descritos três principais mecanismos para a resistência a estes compostos: a) modificações no alvo devido a mutações pontuais ou metilação da subunidade 23S do rRNA, diminuindo a afinidade e ligação dos macrolídeos; b) hidrólise do anel de lactona do macrolídeo e c) produção de bombas de efluxo capazes de remover o antibiótico do interior da célula bacteriana (Jensen *et al.*, 1999; Garrido *et al.*, 2014).

Em enterococos o mecanismo de resistência mais observado para este antimicrobiano ocorre devido à metilação da porção 23S do rRNA (Garrido *et al.*, 2014). Os principais genes responsáveis por este mecanismo de resistência são: *ermA*, *ermB*, *ermC* e *ermTR* que codificam metiltransferases, além dos genes *mefA*, *mefE*, *msrA*, *msrC* e *mreA*, os quais codificam bombas de efluxo que removem o antibiótico do interior da célula (Garrido *et al.*, 2014). Estes mecanismos de resistência podem ser transferidos através de elementos genéticos móveis.

3.4.5 Quinolonas

A classe das quinolonas, como os antimicrobianos norfloxacin e

ciprofloxacina, atua inibindo a atividade da DNA girase ou da topoisomerase IV, impossibilitando que o mecanismo de replicação do DNA atue de forma correta (Miller *et al.*, 2014). A enzima DNA girase possui função essencial para a célula, realizando quebras e novas ligações de forma a diminuir a supertorção da dupla fita de DNA durante o processo de transcrição; já a topoisomerase IV participa da separação da dupla fita de DNA no processo de divisão celular (Miller *et al.*, 2014). Ambas as enzimas são tetrâmeros constituídos por duas subunidades: na enzima DNA girase formadas pelas proteínas GyrA e GyrB, e na topoisomerase IV pelas proteínas ParC e ParE (Swanberg & Wang, 1987; Miller *et al.*, 2014).

A resistência a estes antimicrobianos ocorre devido a mutações pontuais no gene *gyrA* na subunidade GyrA da DNA girase ou no gene *parC* da subunidade ParC da topoisomerase IV, alterando a afinidade de ligação do antibiótico, tendo como consequência sua ineficácia; além disso, outros mecanismos já foram relatados como a presença de bombas de efluxo (*emeA* e *efrAB*) e proteínas Qnr, que atuam evitando a formação do complexo quinolona-girase (Garrido *et al.*, 2014).

3.4.6 Glicopeptídeos

A classe de glicopeptídeos, como a vancomicina e a teicoplanina, atua formando complexos com a região terminal dos precursores de peptideoglicano, inibindo a síntese de parede celular nas células bacterianas (Hollenbeck & Rice, 2012). A resistência dos enterococos a esta classe está associada aos genes que diminuem a afinidade dos precursores aos antimicrobianos, resultando na síntese normal de parede celular (Shepard & Gilmore, 2002). A disseminação de enterococos resistentes a vancomicina (VRE) é motivo de preocupação, já que estas bactérias têm sido associadas como principais patógenos causadores de infecções nosocomiais, principalmente a espécie *E. faecium* (Hollenbeck & Rice, 2012).

São descritos nove genes de resistência aos glicopeptídeos, *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM*, e *vanN*, adquiridos através de plasmídeos ou transposons, e do gene cromossomal *vanC* (Miller *et al.*, 2014).

Os determinantes para a resistência a glicopeptídeos mais relevantes clinicamente são *vanA* e *vanB*, os quais fazem parte de *operons* que codificam um sistema regulatório de dois componentes, com enzimas envolvidas na reciclagem de

precursores D-Ala-D-Ala do peptídeo glicano à D-Ala-D-Lac (Guzman *et al.*, 2016); ambos os *operons* são localizados em transposons e podem ser transferidos e detectados tanto em *E. faecium*, quanto em *E. faecalis*. Apesar de frequentemente isolados de amostras clínicas, enterococos resistentes a vancomicina já foram encontrados em animais selvagens, destacando a importância da disseminação destas cepas resistentes no ambiente (Mallon *et al.*, 2002).

3.5 Enterococos e os Fatores de Virulência

Além de apresentarem genes que conferem resistência aos compostos antimicrobianos, os enterococos também possuem genes cromossômicos ou podem adquirir genes que facilitam a colonização e persistência no hospedeiro. Dentre os genes que codificam fatores de virulência, os mais relatados são os relacionados a proteínas de superfície codificada pelo gene *agg*, que expressa uma substância de agregação, adesina de colágeno codificada pelo gene *ace* e a proteína de superfície extracelular, envolvida também na formação de biofilme, codificada pelo gene *esp*. Também estão associados ao aumento da virulência em cepas de *Enterococcus sp.* os genes *gelE*, que codifica a enzima gelatinase, e *cylA*, que codifica a enzima citolisina.

A substância de agregação (Agg) é uma proteína de superfície de *E. faecalis* necessária para o contato celular durante a conjugação, bem como para aprimorar a adesão das bactérias às células eucarióticas (Medeiros *et al.*, 2014). Estas proteínas são importantes componentes do sistema de transferência gênica bacteriano, já que atuam mediando o contato entre o micro-organismo doador e o receptor, facilitando a transferência de plasmídeos (Mundy *et al.*, 2000). A expressão destas proteínas é responsável pela formação de grandes agregados e contribui para a patogênese nos processos de infecção; a expressão de *agg* também está relacionada ao aumento da hidrofobicidade da superfície celular dos *Enterococcus sp.* (Fisher & Phillips, 2009). Outra proteína de superfície celular é a adesina de colágeno (Ace), responsável pela associação das bactérias às proteínas da matriz extracelular do hospedeiro, aprimorando o sucesso na interação entre patógeno e hospedeiro.

As proteínas de superfície extracelular são codificadas pelo gene *esp*, frequentemente associado a cepas causadoras de infecção na área clínica. A Esp é uma grande proteína de parede celular responsável por promover adesão,

colonização e evasão do sistema imune do hospedeiro (Fisher & Phillips, 2009). O gene *esp* está relacionado à ilhas de patogenicidade das espécies *E. faecalis* e *E. faecium* (Mundy *et al.*, 2000; Garsin *et al.*, 2014). Este fator de virulência aprimora a persistência destes micro-organismos no hospedeiro durante as infecções (Upadhyaya *et al.*, 2009), sendo associado à persistência de infecções do trato urinário e na formação de biofilme.

As proteínas extracelulares que degradam moléculas do hospedeiro são também consideradas como fatores que tornam estes micro-organismos mais virulentos durante as infecções. O fator de virulência *gelE* é um gene cromossomal e está associado à produção da enzima gelatinase, principalmente em *E. faecalis*. Esta enzima é liberada para o meio extracelular e é capaz de hidrolisar substâncias como a gelatina, caseína, hemoglobina, além de outros peptídeos bioativos do hospedeiro (Koch *et al.*, 2004; Fisher & Phillips, 2009).

Outra enzima produzida e liberada para o meio externo é a citolisina, codificada por um *operon* contendo oito genes (*cylR1*, *cylR2*, *cyLL*, *cyLS*, *cyIM*, *cyB*, *cylA*, *cylI*), que pode tanto estar presente no cromossomo, quanto em plasmídeos bacterianos (Mundy *et al.*, 2000; Koch *et al.*, 2004; Medeiros *et al.*, 2014). A atividade da enzima citolisina já foi observada a partir da degradação de eritrócitos em meio enriquecido com sangue proveniente de humano, de cavalo ou coelho (Koch *et al.*, 2004; Upadhyaya *et al.*, 2009). Além da atividade hemolítica, a citolisina também possui atividade bacteriostática contra outras bactérias Gram-positivas (Mundy *et al.*, 2000; Koch *et al.*, 2004).

3.6 Produção de Bacteriocinas

Bacteriocinas são metabólitos produzidos pelos micro-organismos, que possuem ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Estes peptídeos podem ser simples ou muito complexos, e sua característica não tóxica os torna candidatos a aplicações biotecnológicas, sendo utilizados para combater patógenos humanos e animais, bem como na preservação de alimentos (Ahmad *et al.*, 2017).

As bacteriocinas podem ser classificadas em diferentes grupos de acordo com suas características genéticas, seu tamanho, modo de ação contra bactérias, termo estabilidade, estrutura química, suscetibilidade enzimática, cepas produtoras, dentre outras características (Kaškonienė *et al.*, 2017). Podem ser termoestáveis ou não (peptídeos maiores tendem a ser termolábeis). Estes peptídeos possuem

diversos mecanismos de ação contra as bactérias, como ligação em componentes da parede ou membrana celular para formação de poros, bem como lise ou inibição de sua síntese (Ahmad *et al.*, 2017). Estes compostos têm potencial de ação sinérgica com o uso de antibióticos, propiciando melhor ação dos mesmos.

Ambientes como o TGI, que apresentam grande densidade de micro-organismos competindo por nutrientes e pela colonização do hospedeiro, são muito favoráveis para a produção e disseminação de elementos móveis contendo genes para as bacteriocinas. A produção de peptídeos antimicrobianos nestes ambientes é capaz de diminuir a competição e modular as comunidades microbianas residentes neste nicho ecológico. Assim, eliminar competidores com consequente aumento da disponibilidade de nutrientes para o crescimento das cepas torna a produção destes peptídeos muito vantajosa para os micro-organismos (Jones, 2016; Rios *et al.*, 2016).

A obtenção destes peptídeos se dá através de um *screening* de atividade inicial, utilizando o sobrenadante de um crescimento bacteriano contendo as bacteriocinas, seguido da purificação e caracterização do composto bioativo em estudo. Podem ser realizados testes de aquecimento e resfriamento, variações de pH, salinidade e exposição da bacteriocina à enzimas proteolíticas, a fim de avaliar sua estabilidade para potencial aplicação biotecnológica (Kaškonienė *et al.*, 2017).

Na indústria de alimentos os peptídeos purificados podem ser adicionados em produtos, a fim de aprimorar sua conservação e segurança contra possíveis contaminações por patógenos como *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*. Além disso, as cepas produtoras de bacteriocinas podem ser adicionadas diretamente no alimento como culturas *starter* ou culturas protetoras (Alvarez-Sieiro *et al.*, 2016).

Bacteriocinas produzidas por enterococos são conhecidas como enterocinas; estes peptídeos já foram encontrados em cepas de *Enterococcus* sp. provenientes de diversas origens, dentre elas amostras clínicas, de alimentos, rejeitos, em fezes e no TGI de animais e humanos, além de outras amostras ambientais (Ness *et al.*, 2014).

Enterococcus são bactérias comensais do TGI, o que as torna potenciais micro-organismos a serem utilizados como probióticos, com intuito de beneficiar nossa saúde. Com relação a aplicações biotecnológicas envolvendo *Enterococcus* sp. produtores de enterocinas, o uso de cepas que não possuem genes

responsáveis por conferir maior virulência é desejável (Lebreton *et al.*, 2014), principalmente devido à transferência facilitada destes elementos para demais bactérias no microambiente intestinal.

Os artigos mais recentes relatam cepas produtoras de enterocinas isoladas de amostras fecais (Al-Seraih *et al.*, 2017), amostras clínicas (Geldart & Kaznessis, 2017), leite materno (Kivanç *et al.*, 2016), mecônio (Al-Atya *et al.*, 2016), vinho (Dündar, 2016), pepino fermentado (Gao *et al.*, 2016), leite de cabra cru (Perin *et al.*, 2016), ceco intestinal de frangos (Shehata *et al.*, 2016), dentre outros. As bacteriocinas mais frequentemente encontradas em enterococos são codificadas pelos genes *entA*, *entB*, *entP* e *mundticinKS*.

3.7 Eletroforese em Campo-Pulsado (PFGE)

A eletroforese em campo pulsado, do inglês *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE), é uma técnica considerada como padrão ouro para determinação do perfil clonal de cepas de *Enterococcus* sp. (Turabelidze *et al.*, 2000).

Esta técnica é realizada a partir da extração e clivagem de grandes fragmentos de DNA cromossomal (Murray *et al.*, 1990). Após a clivagem com a enzima de restrição apropriada, é aplicado campo elétrico chamado campo pulsado sob os fragmentos de DNA cromossomal. A denominação campo pulsado é utilizada, pois o campo elétrico é aplicado de forma alternada, em três diferentes ângulos; a cada alteração na direção da corrente elétrica ocorre troca da direção de migração e reorganização das moléculas de DNA (Magalhães *et al.*, 2005). Os ângulos aplicados, bem como a voltagem utilizada podem ser ajustados por determinado período de tempo, de acordo com cada protocolo e espécie analisada. Em seguida é possível observar no gel de agarose, a partir de impregnação com brometo de etídeo, por exemplo, diferentes bandas correspondentes aos fragmentos gerados, caracterizando o perfil da cepa analisada. A interpretação é feita a partir da visualização e comparação de bandas existentes ou não em cada amostra, e pode ser feita a partir de programas de bioinformática (Tenover *et al.*, 1995).

A técnica de PFGE é muito utilizada em estudos epidemiológicos, a fim de investigar a origem e disseminação das cepas causadoras de surtos importantes (Somily *et al.*, 2016; Marchi *et al.*, 2017; Danino *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018). A partir da comparação dos perfis de fragmentação obtidos são gerados

dendrogramas de acordo com a similaridade genética entre as cepas, e é possível investigar a origem e disseminação de linhagens patogênicas entre as populações humanas e animais.

Apesar de menos numerosos, estudos utilizando a técnica de PFGE não se restringem à área clínica, e também são realizados com cepas provenientes de amostras de animais e do ambiente, sendo que estas análises podem auxiliar, por exemplo, em estudos envolvendo a ecologia das populações microbianas (Donabedian *et al.*, 2010; Furukawa *et al.*, 2011; Ahmad *et al.*, 2011; Stępień-Pyśniak *et al.*, 2018).

O PFGE é uma técnica amplamente utilizada, porém demanda tempo para ser executada, logo caso a pesquisa realizada necessite de um resultado rápido, esta técnica pode não ser a melhor opção para caracterização das cepas (Hazirolan *et al.*, 2017; Lytsy *et al.*, 2017).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Origem das Amostras – *H. erato phyllis*

Entre novembro de 2014 e março de 2015 foram coletadas, com auxílio de redes entomológicas, fêmeas adultas já fecundadas da borboleta *H. erato phyllis* em três locais do Estado do RS, Brasil: Estação Agronômica de Águas Belas (30° 02' 18.1" S; 51° 01' 23.0" W), Viamão (30° 09' 40.5" S; 50° 55' 01.5" W) e São Francisco de Paula (29° 26' 34.1" S; 50° 36' 48.8" W), as quais receberam o código de HEAB2, HEV2 e HES2, respectivamente (Figura 6). As fêmeas foram transportadas e isoladas em insetários no Laboratório de Genética Ecológica e Evolução da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), com dimensões de 2,3m x 3m x 3m (largura, comprimento, altura), aproximadamente.

Os insetários continham plantas que simulavam condições naturais, incluindo *P. suberosa*, utilizada pelas fêmeas para ovoposição. Diariamente foi realizada a alimentação das borboletas com uma mistura contendo água, mel e pólen, bem como a coleta dos ovos com auxílio de pincéis (Figura 7).

Os ovos coletados foram transportados para o laboratório e depositados em potes de criação individuais contendo papel úmido ao fundo, a fim de manter a umidade do microambiente. Diariamente foi realizada a higienização dos recipientes e a alimentação das lagartas com lotes de *P. suberosa*. Foram coletadas fezes de lagartas nas 48 horas do quinto estágio, com auxílio de colher plástica descartável (Tabela 1).

As fezes foram armazenadas em microtubos de 1,5 mL, transportadas para o Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do ICBS/UFRGS e mantidas a -80°C até o seu processamento. No total foram coletadas 12 amostras de fezes, sendo cinco de fezes de imaturos da fêmea HEAB2, cinco de imaturos da fêmea HEV2 e dois de imaturos da fêmea HES2 (Figura 8).

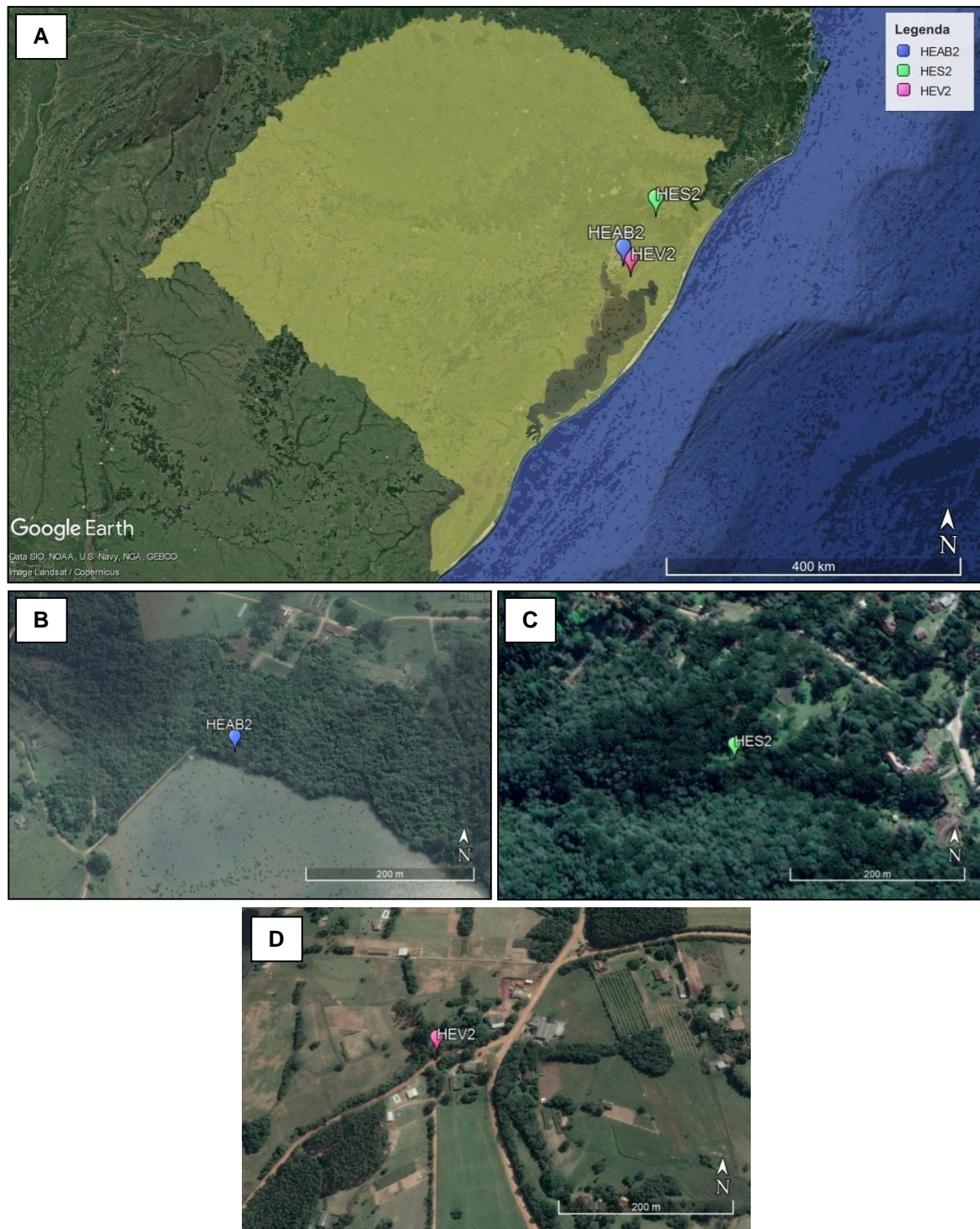


Figura 6: A) Locais de coleta das fêmeas de *H. erato phyllis* no Estado do RS; detalhe dos locais de coleta por fêmea: B) HEAB2; C) HES2; D) HEV2.



Figura 7: Adultos de *H. erato phyllis* alimentando-se em insetário do Departamento de Genética – UFRGS.

Tabela 1. Detalhes da coleta de amostras fecais dos doze imaturos de *H. erato phyllis* utilizados no estudo.

Fêmea	Imaturos	Data da eclosão dos imaturos	Data da coleta das amostras
HEAB2	6	20 nov. 2014	03 dez. 2014
	7	21 nov. 2014	03 dez. 2014
	10	22 nov. 2014	04 dez. 2014
	11	23 nov. 2014	04 dez. 2014
	14	28 nov. 2014	09 dez. 2014
HEV2	9	04 fev. 2015	16 fev. 2015
	18	12 fev. 2015	24 fev. 2015
	26	28 fev. 2015	09 mar. 2015
	27	26 fev. 2015	09 mar. 2015
	29	02 mar. 2015	10 mar. 2015
HES2	3	*	*
	17	01 abr. 2015	12 abr. 2015

*dados não disponíveis

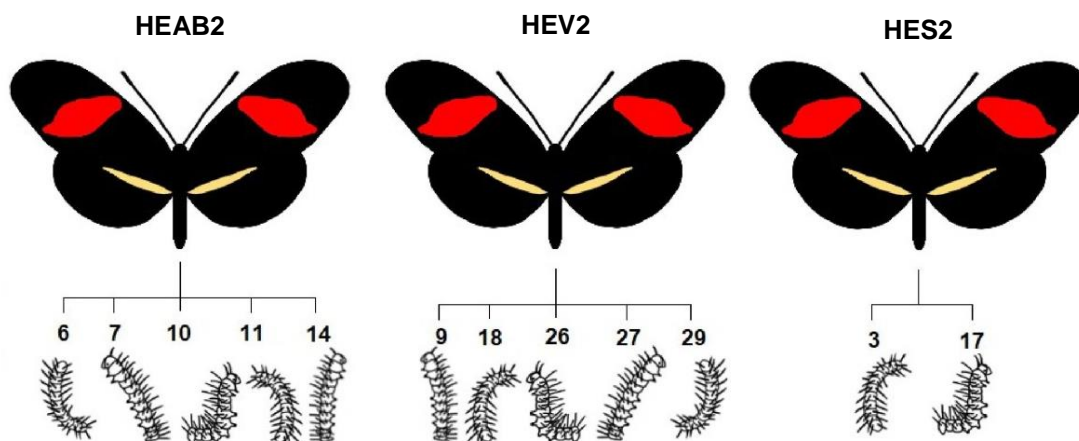


Figura 8: Ilustração das fêmeas adultas e dos imaturos utilizados no estudo. Fêmea HEAB2 e proles 6, 7, 10, 11, 14; fêmea HEV2 e proles 9, 18, 26, 27, 29; fêmea HES2 e proles 3 e 17, totalizando 12 amostras. Os imaturos da mesma fêmea foram considerados irmãos, já que fêmeas de *H. erato phyllis* são monândricas. Ilustração: Gabriella Oliveira de Araujo.

4.2 Bacterioteca de *Enterococcus* sp. Isolados de Amostras Fecais de Imaturos de *H. erato phyllis*

Cento e setenta e oito enterococos utilizados no presente estudo fazem parte da bacterioteca do Laboratório 222-C do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) – UFRGS. Todos os enterococos foram isolados de amostras fecais dos imaturos de *H. erato phyllis*, identificados e classificados quanto ao perfil de suscetibilidade a antimicrobianos entre março de 2015 e abril de 2016. Dos 178 enterococos isolados, 125 foram identificados como *E. casseliflavus*, 33 como *E. mundtii*, dois como *E. faecalis* e 18 como *Enterococcus* sp (Huff, 2016).

Em relação aos fenótipos de resistência, das 178 cepas, 120 apresentaram níveis de resistência a pelo menos um dos antibióticos testados. Cem enterococos apresentaram resistência à rifampicina, 55 à eritromicina e 11 à norfloxacin e/ou ciprofloxacina (Huff, 2016).

4.3 Detecção dos Genes de Resistência nos Enterococos

A determinação da presença dos genes de resistência nos enterococos com fenótipos resistentes foi realizada empregando a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). Para os 55 enterococos resistentes a eritromicina foram testadas a presença dos genes *ermA*, *ermB*, *ermC* e *msrC*. Já para os 11

enterococos que apresentaram resistência à norfloxacin e/ou ciprofloxacina, foi investigada a presença de mutação no gene *gyrA*.

As sequências de DNA dos oligonucleotídeos iniciadores, suas respectivas temperaturas de anelamento e massas moleculares em pares de bases (pb) esperadas são mostradas na Tabela 2. Os controles positivos utilizados nas reações foram: *Enterococcus* sp. 485 para *erm(B)* (Medeiros, 2011), *E. faecalis* M1.7 para *erm(C)* (Costa, 2018), *E. faecium* P4-1 para *msrC* (Prichula, 2015) e *E. faecalis* ATCC 29212 para mutação no gene *gyrA*.

A reação de PCR foi otimizada para um volume total de 25 µL, contendo: 1x de tampão *Taq* DNA polimerase (Ludwig Biotecnologia), 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Ludwig Biotecnologia), 1,5 mM de MgCl₂ (com exceção para o gene *gyrA* que foi utilizada a concentração de 3 mM de MgCl₂), 200 µM de dNTPs (Ludwig Biotecnologia), 1U de *Taq* DNA Polimerase (Ludwig Biotecnologia), 100 ng de DNA e água MilliQ para completar o volume.

Para a amplificação foi utilizado o termociclador 2720 *Thermal Cycler* nas seguintes condições:

- *ermA*, *ermB* e *ermC*: 3 minutos a 93 °C, seguido por 35 ciclos de 1 minuto a 93 °C, 1 minuto a 52 °C e 1 minuto a 72 °C, e uma extensão final de 5 minutos a 72 °C.

- *msrC*: 5 minutos a 94 °C, seguido por 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 52 °C e 1 minuto a 72 °C, e uma extensão final de 5 minutos a 72 °C.

- *gyrA*: 5 minutos a 94 °C, seguido por 40 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 52 °C e 1 minuto a 72 °C, e uma extensão final de 5 minutos a 72 °C.

Após a reação de PCR, os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com SYBR® *Safe DNA Gel Stain* em fotodocumentador.

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores, sequências de DNAs, temperaturas de anelamento (TA) e massa molecular geradas nas reações de PCR para os genes de resistência a macrolídeos (*ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrC*) e quinolonas (*gyrA*), e para os fatores de virulência *gelE*, *cylA*, *ace*, *esp* e *agg*.

Oligonucleotídeos Iniciadores	Sequência	TA (°C) ³	Tamanho do produto de PCR (pb) ⁴	Referência
erm(A)_F¹	TCTAAAAAGCATGTAAAAGAA	52	645	Sutcliffe <i>et al.</i> (1996)
erm(A)_R	CTTCGATAGTTTATTAATATTAGT			
erm(B)_F¹	GAAAAGGTACTCAACCAAATA	52	639	Sutcliffe <i>et al.</i> (1996)
erm(B)_R	AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC			
erm(C)_F¹	TCAAAACATAATATAGATAAAA	52	642	Sutcliffe <i>et al.</i> (1996)
erm(C)_R	GCTAATATTGTTTAAATCGTCAAT			
msrC_3¹	AAGGAATCCTTCTCTCTCCG	52	343	Werner <i>et al.</i> (2001)
msrC_4	GTAACAAAATCGTTCCCG			
gyrA_F¹	ATGAACGAATTGGGT	52	250	Rathnayake <i>et al.</i> (2011)
gyrA_R	AATTTTACTCATACGTGCTT			
gelE_TE9²	ACCCCGTATCATTGGTTT	50	419	Eaton & Gasson (2001)
gelE_TE10	ACGCATTGCTTTTCCATC			
cylA_TE17²	TGGATGATAGTGATAGGAAGT	59	517	Eaton & Gasson (2001)
cylA_TE18	TCTACAGTAAATCTTTTCGTCA			
ace1_F²	AAAGTAGAATTAGATCCACAC	59	320	Mannu <i>et al.</i> (2003)
ace2_R	TCTATCACATTCGGTTGCG			
ESP46²	TTACCAAGATGGTTCTGTAGGCAC	60	913	Shankar <i>et al.</i> (1999)
ESP47	CCAAGTATACTTAGCATCTTTTGG			
agg_TE3²	AAGAAAAAGAAGTAGACCAAC	60	1553	Eaton & Gasson (2001)
agg_TE4	AAACGGCAAGACAAGTAAATA			

1: Genes de resistência *ermA* [*erm(A)_F* e *erm(A)_R*], *ermB* [*erm(B)_F* e *erm(B)_R*], *ermC* [*erm(C)_F* e *erm(C)_R*], *msrC* (*msrC_3* e *msrC_4*), e *gyrA* (*gyrA_F* e *gyrA_R*); 2: Genes de virulência *gelE* (*gelE_TE9* e *gelE_TE10*), *cylA* (*cylA_TE17* e *cylA_TE18*), *ace* (*ace1_F* e *ace2_R*), *esp* (*ESP46* e *ESP47*) e *agg* (*agg_TE3* e *agg_TE4*); 3: TA - temperatura de anelamento; 4: pb - pares de bases.

4.4 Avaliação Genotípica e Fenotípica dos Fatores de Virulência nos Enterococos

4.4.1 Detecção Genotípica dos Fatores de Virulência

A presença dos genes *gelE*, *cylA*, *ace*, *esp* e *agg*, que codificam para fatores de virulência, foi testada em todos os 178 enterococos da bacterioteca, pela técnica de PCR (Tabela 2).

Os controles positivos utilizados nas reações foram: *E. faecalis* ATCC

29212 para *gelE*, *E. faecalis* 8 para *cylA* (Medeiros, 2011), *E. faecalis* C12 para *ace* (Medeiros, 2011), *E. mundtii* HEAB2-14.3 para *esp* (este trabalho), e *E. faecalis* M2.15 para *agg* (Costa, 2018).

A reação de PCR foi otimizada para um volume total de 25 µL, contendo: 1x de tampão *Taq* DNA polimerase (Ludwig Biotecnologia), 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Ludwig Biotecnologia), 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs (Ludwig Biotecnologia), 1U de *Taq* DNA Polimerase (Ludwig Biotecnologia), 100 ng de DNA e água MilliQ para completar o volume. Para a amplificação foi utilizado o termociclador 2720 *Thermal Cycler* nas seguintes condições: 5 minutos a 94 °C, seguido por 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto na temperatura de anelamento ideal para cada gene (Tabela 2), 1 minuto a 72 °C, e uma extensão final de 5 minutos a 72 °C. Para o gene *agg* foram utilizados 30 ciclos, e a extensão final a 72 °C durante 10 minutos.

Após a reação de PCR, os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com SYBR[®] *Safe DNA Gel Stain* em fotodocumentador.

4.4.2 Avaliação de Atividade da Gelatinase

As cepas que apresentaram amplificação para o gene *gelE* foram submetidas à prova fenotípica da atividade da enzima gelatinase, segundo Marra *et al.*, (2007) com adaptações.

Os enterococos positivos para o gene *gelE* foram previamente reativados em agar BHI a 37 °C por 24 horas. Em seguida, os isolados foram semeados por picada em tubos contendo meio gelatina (0,8% ágar nutriente e 12% gelatina), bem como o controle positivo *S. aureus* ATCC 25923. Os tubos foram incubados a 37 °C por 72 horas. Após a incubação os tubos foram refrigerados a 4 °C por 30 minutos e, em seguida, foi verificada a consistência do meio de cultura comparada ao controle positivo. Os resultados foram considerados positivos para a expressão da enzima gelatinase quando observada a consistência líquida do meio de cultura.

4.4.3 Avaliação de Atividade Hemolítica

A atividade hemolítica foi testada para todos os enterococos isolados das fezes de imaturos de borboletas. As bactérias foram previamente reativadas em agar BHI a 37 °C por 24 horas. Em seguida, foram semeadas por picada em agar base

TSA suplementado com 5% de sangue de carneiro (NewProv).

As placas foram incubadas a 37 °C por 24 a 48 horas. Após a incubação, quando verificada a presença de um halo ao redor da colônia (hemólise total ou parcial) os resultados foram considerados positivos, e na ausência do halo considerados como negativos.

4.5 Detecção da Produção de Compostos com Atividade Antimicrobiana

A capacidade dos enterococos isolados das fezes dos imaturos de borboleta produzirem compostos com atividade antimicrobiana, como enterocinas e compostos ácidos, foi investigada nas cepas que não apresentavam resistência a nenhum antimicrobiano testado previamente (Huff, 2016), bem como, preferencialmente, não apresentavam resultado positivo para amplificação dos fatores de virulência testados. Estas características foram evitadas a fim de que, caso detectado, o composto pudesse ser futuramente isolado e purificado de uma cepa não relacionada a fenótipos ou genótipos associados a cepas mais virulentas.

4.5.1 Triagem dos Isolados Produtores de Substância Antagonista

O ensaio para verificar a produção de compostos foi realizado contra a cepa padrão de *L. monocytogenes* ATCC 7644, pela técnica de dupla camada, segundo Tagg & McGiven (1971), com adaptações. Os enterococos isolados foram reativadas em agar BHI e incubadas a 37 °C por 24 horas. A pureza das colônias foi verificada e em seguida uma colônia foi semeada por picada em triplicata em nova placa dividida em dois setores contendo agar BHI, com nova incubação a 37 °C por 24 horas; neste dia também foi realizada a semeadura da cepa padrão em agar BHI, incubada a 30 °C por 24 horas.

Após a incubação da cepa padrão, foi realizada uma suspensão em solução salina estéril a 0,85% correspondente a 0,5 na escala MacFarland; 100 µL desta suspensão foi transferido para Erlenmeyer contendo agar BHI semi-sólido (0,7% agar) previamente preparado e fundido a 45 °C. Esta suspensão foi vertida sobre as placas com crescimento de enterococos em picada, formando uma sobrecamada. As placas foram novamente incubadas a 37 °C por 24 horas. Após a incubação a formação de halos ao redor do inóculo de enterococos foi considerado como resultado positivo para a produção de substância antagonista. O diâmetro dos halos das triplicatas foram medidos e registrados.

4.5.2 Detecção Genotípica da Enterocina *mundticinKS* por PCR

A presença do gene *mundticinKS* pela técnica de PCR foi avaliada nos enterococos com resultado positivo para a produção de substância antagonista. Foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores MunKS-F (TGAGAGAAGGTTTAAGTTTTGAAGAA) e MunKS-R (TCCACTGAAATCCATGAATGA) (Zendo *et al.*, 2005). A reação de PCR foi otimizada para um volume total de 25 µL, contendo: 1x de tampão *Taq* DNA polimerase (Ludwig Biotecnologia), 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Ludwig Biotecnologia), 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs (Ludwig Biotecnologia), 1U de *Taq* DNA Polimerase (Ludwig Biotecnologia), 100 ng de DNA e água MilliQ para completar o volume.

Para a amplificação foi utilizado o termociclador 2720 *Thermal Cycler* nas seguintes condições: 3 minutos a 94 °C, seguido por 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C, 1 minuto a 72 °C, e uma extensão final por 5 minutos a 72 °C. Na reação foi utilizado o controle positivo *E. mundtii* J5 (Comerlato, 2015). O produto esperado de 380 pares de base foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com SYBR® *Safe DNA Gel Stain* em fotodocumentador.

4.6 Análise da Diversidade Genética dos Enterococos por PFGE

Para análise do perfil clonal dos enterococos isolados dos imaturos provenientes de diferentes mães foi empregada a técnica de PFGE. Foram selecionados 86 enterococos conforme os seguintes critérios: origem materna (fezes de lagartas da fêmea HEAB2, HEV2 e HES2), espécie de *Enterococcus* e perfil de suscetibilidade a antimicrobianos (Tabela 3).

4.6.1 Extração do DNA Genômico

A extração de DNA genômico foi realizada segundo Murray *et al.* (1990) e Saeedi *et al.* (2002) com modificações. Os isolados selecionados foram reativados em agar BHI a 37 °C por 24 horas. A pureza das colônias foi verificada e em seguida uma colônia isolada foi transferida para microtubo contendo 1 mL de caldo BHI (Himedia®), seguido de incubação a 35 °C por 5 horas. Após a incubação foi realizada centrifugação (10 minutos a 3.000 rpm) e descarte do sobrenadante. O *pellet* contendo crescimento bacteriano foi ressuspenso com 300 µL de solução

PIV (NaCl 1M, Tris HCl 10 mM [Vetec®], pH 7,6), seguido de nova centrifugação da suspensão (10 minutos a 3.000 rpm) e descarte do sobrenadante. Esta lavagem foi realizada três vezes consecutivas. Após a última centrifugação e descarte do sobrenadante o *pellet* foi homogeneizado com nova solução PIV e 300 µL de Agarose Low-Melting Point (Invitrogen®) a 1,8% em tampão PIV. O conteúdo foi homogeneizado e transferido para moldes. Os moldes foram mantidos a 4 °C durante 10 minutos para solidificação dos blocos. Em seguida foi realizada a confecção dos *plugs* com cerca de 2 mm cada a partir de cortes dos blocos de agarose contendo células bacterianas solidificados. Para cada amostra foram confeccionados três *plugs*.

Após a aquisição de células bacterianas no interior dos blocos de agarose, foram realizados tratamentos enzimáticos para a extração do DNA genômico. Os *plugs* foram transferidos para tubos e tratados com solução de lise EC: (6 mM Tris-HCl [Vetec®] pH 7,6; 1 M NaCl [Vetec®], 100 mM EDTA [Vetec®] pH 7,5; 0,5% [p/v] de Brij 58 [Sigma-Aldrich®], 0,5 % [p/v] de lauril sarcosinato de sódio [Sigma-Aldrich®], 0,2% de desoxicolato de sódio [Sigma-Aldrich®], 1 mg/mL de lisozima [Sigma-Aldrich®] e 10 U/mL de mutanolisina [Sigma-Aldrich®]), incubados a 37 °C por 18 a 24 horas sob leve agitação. Após a incubação a solução EC foi descartada e foi adicionada aos tubos a solução para proteólise ESPK: (0,5M EDTA [Vetec®], pH 8,0; 1% [p/v] lauril sarcosinato de sódio [Sigma-Aldrich®], 0,1 mg/mL proteinase K [Sigma-Aldrich®]), seguido de incubação a 50 °C por 1 hora sob leve agitação. Em seguida a solução ESPK foi descartada e adicionou-se aos tubos nova solução para proteólise ESPK, seguido de nova incubação a 50 °C por mais 1 hora sob agitação.

Após o tratamento enzimático, a solução ESPK foi descartada e os *plugs* foram lavados com tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 7,6; 0,1 mM EDTA [Vetec®]) durante 20 minutos à temperatura ambiente. O tampão foi descartado e foram realizadas mais três lavagens sucessivas com tampão TE. Após a última lavagem adicionou-se novo tampão TE e os *plugs* foram armazenados a 4 °C até a retomada das análises.

Tabela 3. Origem, identificação e perfil de suscetibilidade a antimicrobianos dos *Enterococcus* utilizados para a técnica de PFGE.

Fêmea	Espécie	Imaturos	ID do isolado	Suscetibilidade aos Antimicrobianos ^{2,3,4}					
				RIF	ERI	NOR	CIP		
HEAB2	<i>E. casseliflavus</i>	6, 7, 10 e 11	6.12 ¹ , 6.20, 7.23, 10.10, 11.8, 11.18	R	S	S	S		
		6, 7 10 e 11	6.2, 6.4, 7.22, 10.5, 10.12, 11.9	R	I	S	S		
		7 e 11	7.6, 7.9, 7.11, 11.6	S	S	S	S		
		7	7.2, 7.3, 7.19	R	S	I	S		
		7	7.20, 7.21	S	I	S	S		
		7	7.13	S	I	I	S		
		7	7.16	S	I	I	I		
		7 e 10	7.17, 10.17	R	I	I	S		
		10	10.7	R	I	I	I		
		10	10.8, 10.9	R	I	S	I		
			<i>E. faecalis</i>	6	6.18, 6.19	I	I	S	S
			<i>E. mundtii</i>	14	14.1, 14.3, 14.5, 14.7, 14.9, 14.12	S	S	S	S
			<i>Enterococcus</i> sp.	6 e 7	6.5, 7.15	R	I	S	S
				7 e 14	7.12, 14.14, 14.16	S	S	S	S
		10	10.6	R	S	S	S		
HEV2	<i>E. casseliflavus</i>	9	9.1, 9.3, 9.4	S	S	S	S		
		9	9.5, 9.9, 9.14, 9.17, 9.20, 9.24	S	I	S	S		
		18 e 26	18.15, 26.2, 26.9, 26.20	R	S	S	S		
		18	18.2, 18.4, 18.6, 18.16, 18.18, 18.21	R	I	S	S		
		26, 27 e 29	26.14, 26.21, 27.3, 27.16, 29.2, 29.19	S	S	S	S		
			<i>E. mundtii</i>	26, 27 e 29	26.14, 26.21, 27.3, 27.16, 29.2, 29.19	S	S	S	S
	<i>Enterococcus</i> sp.	18 e 26	18.3, 18.10, 26.5	R	S	S	S		
		26 e 29	26.19, 29.14, 29.20	S	S	S	S		
HES2	<i>E. casseliflavus</i>	3	3.2, 3.15, 3.20, 3.22	S	S	S	S		
			<i>E. mundtii</i>	3	3.4, 3.16, 3.18, 3.19, 3.21, 3.24	S	S	S	S
			<i>Enterococcus</i> sp.	17	17.10, 17.14, 17.16	S	S	S	S

¹ 6.12 indica cepa 12, isolada da amostra de fezes da lagarta 6, da fêmea HEAB2. A mesma construção de legenda foi utilizada para todas as cepas.

² RIF, Rifampicina (5 µg); ERI, Eritromicina (15 µg); NOR, Norfloxacin (10 µg); CIP, Ciprofloxacina (5 µg).

³ S, Sensível; I, Intermediário; R, Resistente.

⁴ Os isolados eram sensíveis aos outros sete antimicrobianos testados [gentamicina (120 µg), tetraciclina (30 µg), estreptomicina (300 µg), vancomicina (30 µg), cloranfenicol (30 µg), nitrofurantoína (300 µg), ampicilina (10 µg)].

4.6.2 Digestão com enzima de Restrição *Sma*I

Para cada enterococos selecionando apenas um *plug* foi escolhido para o prosseguimento das análises. O *plug* contendo o DNA genômico foi transferido para um microtubo e pré-incubado com tampão da endonuclease de restrição *Sma*I (Invitrogen®) em temperatura ambiente por 30 minutos. Após a incubação adicionou-se ao tampão 20 U da endonuclease de restrição *Sma*I e os microtubos foram incubados a 37 °C por 16 horas para clivagem do DNA genômico.

4.6.3 Separação dos Fragmentos de Restrição

Após a incubação com enzima de restrição *Sma*I, os *plugs* foram fundidos a 72 °C por 5 minutos e transferidos para poços do gel de agarose (Agargen) 1% (p/v) previamente preparado em tampão TBE 0,5X (Sigma-Aldrich®) (pH 8,4). À solução tampão de corrida TBE 0,5X utilizada na cuba de eletroforese foi adicionado tiouréia na concentração de 50 µM. Foi utilizado marcador molecular “*Lambda Ladder PFG Marker*” (New England Biolabs) no centro do gel.

A separação dos fragmentos de restrição foi realizada utilizando o equipamento CHEF DRII (Bio-Rad) com programação ótima sugerida por Saeedi *et al.* (2002), à temperatura de 11 °C. Após 24 horas, o gel foi removido do equipamento, transferido para recipiente apropriado e corado com brometo de etídeo (Ludwig Biotecnologia) à concentração de 0,5 µg/mL por 20 minutos, e descorado duas vezes por 20 minutos cada. O gel foi observado e fotografado em transiluminador (Molecular Imager®, Gel Doc™ XR+ With Image Lab™ Software, Bio-Rad). Para análise dos perfis gerados foi utilizado o programa “GelCompar II” v. 6.6 11, e o percentual de similaridade foi estimado pelo Coeficiente de *Dice*. Os dendrogramas foram gerados pelo método UPGMA (Unweighted *Pair Method Using Arithmetic Averages*) com tolerância de 1%. Foram considerados clones as cepas com similaridade superior a 90%.

4.7 Análise Estatística

A partir das análises citadas foram gerados dados qualitativos, os quais foram analisados na forma de percentuais.

5. RESULTADOS

5.1 Detecção dos Genes de Resistência e Fatores de Virulência

Os 55 enterococos que apresentavam resistência intermediária a eritromicina (50 *E. casseliflavus*, dois *E. faecalis* e três *Enterococcus* sp.) e foram submetidos no presente estudo à análise da presença dos genes *ermA*, *ermB*, *ermC* e *msrC*, não apresentaram resultado positivo para a amplificação dos genes testados (Apêndice 1).

A análise da PCR para detecção da mutação no gene *gyrA*, dos onze enterococos (10 *E. casseliflavus* e 1 *Enterococcus* sp.) que apresentavam níveis de resistência a norfloxacin e/ou ciprofloxacina foi negativa para todas as amostras (Apêndice 2).

Para os genes de virulência, conforme o Apêndice 3 e Tabela 4, das 178 cepas analisadas, 100% foram negativas para a amplificação dos genes *cylA* e *agg*. A ocorrência do gene *gelE* só foi detectada em dois (1,12%) enterococos pertencentes à espécie *E. faecalis*. Estes *E. faecalis* também apresentaram resultado positivo para o gene *ace*.

Para o fator de virulência relacionado ao gene *esp* foi possível observar que 63 (35,39%) das 178 cepas apresentaram resultado positivo para a amplificação. Destes, 37 eram da espécie *E. casseliflavus*, 23 *E. mundtii* e três *Enterococcus* sp. (Tabela 4). Apesar da maioria dos positivos serem *E. casseliflavus*, quando comparado ao número total de enterococos desta espécie é possível notar que 29,6% dos isolados apresentaram o gene *esp*. Já para a espécie *E. mundtii* a presença do gene *esp* foi mais evidente, detectada em 69,7% dos isolados que pertencem a esta espécie na bacterioteca. Em relação ao gene *ace*, apenas 12 (6,7%) do total de 178 cepas testadas foram positivas para a amplificação do gene. Destes, 9 eram *E. mundtii*, 2 *E. faecalis* e 1 *Enterococcus* sp.

A relação entre os locais de coleta das fêmeas de *H. erato phyllis* e os resultados positivos para amplificação dos genes de virulência pode ser visto na Tabela 5. O gene *gelE* só foi detectado nas duas cepas de *E. faecalis*, ambas isoladas de imaturos associados a localidade de Águas Belas. Quanto ao gene *esp*, é possível notar que, dos 63 positivos, 43 (68,25%) estão associados à Estação Agronômica de Água Belas, 15 (23,80%) à Viamão e 5 (7,93%) à São Francisco de Paula. Sendo assim, o gene *esp* foi mais frequentemente associado à enterococos

isolados de imaturos com a origem materna de Águas Belas. Apesar de apenas 5 enterococos relacionados à São Francisco de Paula terem amplificado para *esp*, um menor número de cepas foram isoladas das lagartas provenientes desta localidade (apenas 16 do total de 178 enterococos). Sendo assim, estes 5 positivos correspondem à 31,25% do total de enterococos associados com este local de coleta (5, do total de 16). Logo, possivelmente o segundo local em que o gene *esp* foi mais frequente foi em enterococos isolados de imaturos associados à cidade de São Francisco de Paula, seguido da cidade de Viamão.

Considerando o total de 12 amplificações para o gene *ace*, 6 (50%) enterococos oriundos de imaturos associados a Viamão apresentaram resultados positivos para o gene (Tabela 5). Estes 6 enterococos representam apenas 9,27% do total de enterococos isolados para esta localidade (6, do total de 64); sendo assim, é possível que o fator de virulência codificado pelo gene *ace* esteja presente de forma mais pronunciada em enterococos associados à cidade de São Francisco de Paula, em que se observou 4 amplificações positivas (4 – 25%, do total de 16 enterococos associados com imaturos provenientes desta região).

Tabela 4. Relação entre as espécies de enterococos isoladas de fezes de imaturos de *H. erato phyllis* positivas para amplificação dos genes de virulência por PCR.

Espécies (n)	Cepas positivas (%) para amplificação dos genes de virulência				
	<i>gelE</i>	<i>cylA</i>	<i>esp</i>	<i>agg</i>	<i>ace</i>
<i>E. casseliflavus</i> (125)	0	0	37 (29,60)	0	0
<i>E. faecalis</i> (2)	2 (100)	0	0	0	2 (100)
<i>E. mundtii</i> (33)	0	0	23 (69,69)	0	9 (27,27)
<i>Enterococcus</i> sp. (18)	0	0	3 (16,66)	0	1 (5,50)
Total (178)	2 (1,12)	0	63 (35,39)	0	12 (6,74)

Tabela 5. Relação entre os locais de coleta das fêmeas de *H. erato phyllis* e os resultados positivos para amplificação dos genes de virulência por PCR.

Origem	Cepas positivas (%) para amplificação dos genes de virulência		
	<i>gelE</i>	<i>esp</i>	<i>ace</i>
HEAB2	2 (100)	43 (68,25)	2 (16,66)
HEV2	0	15 (23,80)	6 (50)
HES2	0	5 (7,93)	4 (33,33)
Total	2	63	12

5.2 Análise Fenotípica dos Fatores de Virulência

Os dois *E. faecalis* (6.18 e 6.19) positivos para amplificação do gene *gelE* foram submetidas ao teste fenotípico para avaliar a atividade da enzima gelatinase. Após as 72 horas de incubação e 30 minutos de refrigeração do meio a 4° C foi possível observar a consistência líquido do meio de cultura para ambas as amostras (Figura 9). Sendo assim, as cepas foram positivas para a atividade da enzima gelatinase.

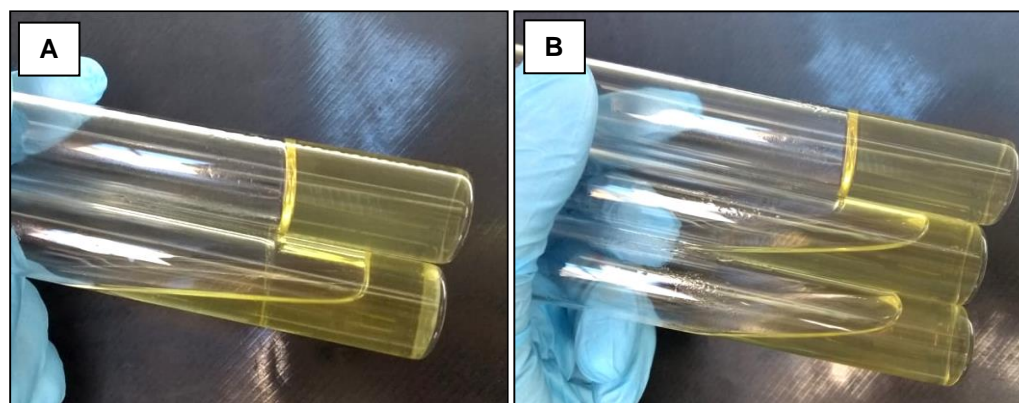


Figura 9. Teste fenotípico da enzima gelatinase. A) *E. casseliflavus* 6.12 utilizado como controle negativo (meio sólido) e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como controle positivo (meio líquido). B) Controle negativo e isolados *E. faecalis* 6.18 e 6.19 com resultado positivo (meio líquido).

Mesmo sem resultados positivos para amplificação do gene *cytA*, que codifica a enzima citolisina, todos os enterococos foram submetidos à prova fenotípica para análise da atividade hemolítica. Das 178 cepas testadas, 130 (73%) foram capazes de realizar a hemólise total ou parcial do sangue de carneiro

(Apêndice 3, Figura 10). Dentre as cepas positivas, 114 (87,7%) pertencem à espécie *E. casseliflavus*, 3 (2,3%) à *E. mundtii* e 13 (10%) *Enterococcus* sp. Os *E. faecalis* não apresentaram resultado positivo para o teste fenotípico da hemólise.

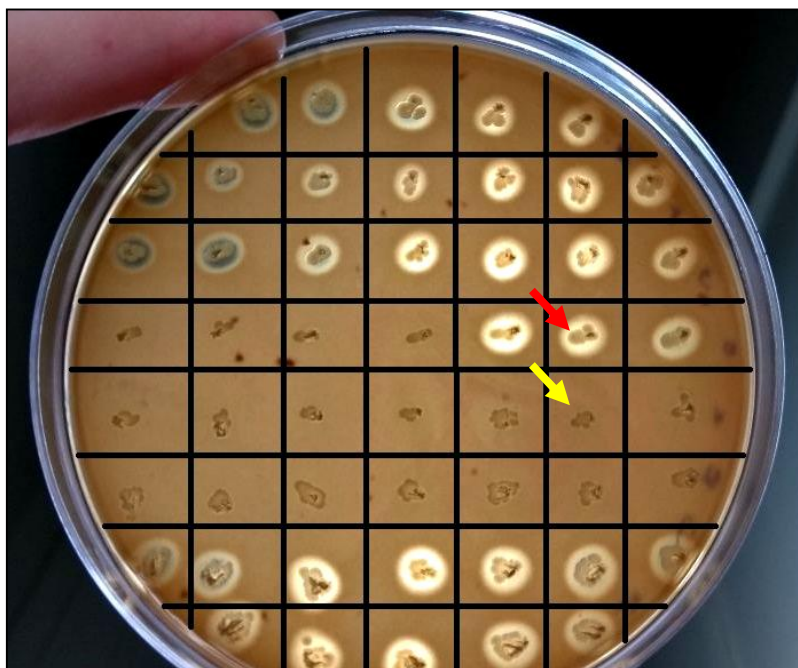


Figura 10. Teste fenotípico para atividade hemolítica. Setas vermelha e amarela indicam cepa positiva e negativa para atividade hemolítica, respectivamente.

5.3 Produção de Substância Antagonista

Para a análise de produção de substância antagonista foram avaliados 26 enterococos isolados das fezes de imaturos (Tabela 6). Estes enterococos não apresentaram resistência aos antimicrobianos e também não apresentaram resultado positivo para os fatores de virulência codificados pelos genes *gelE*, *cylA*, *agg* e *ace*. Vinte (14.1, 14.2, 14.3, 14.4, 14.5, 14.7, 14.8, 14.9, 14.10, 14.14, 14.15, 14.16, 14.17, 14.18, 26.1, 26.11, 26.12, 27.18, 29.2, 3.16) das 26 cepas testadas apresentaram resultado positivo para a amplificação do gene *esp* (Apêndice 3), porém as mesmas não foram excluídas do experimento, já que a proteína de superfície codificada pelo gene *esp* pode auxiliar a fixação destes micro-organismos no microambiente intestinal destes insetos, sendo assim, a colonização de *Enterococcus* sp. que possuem o gene *esp* e produzem bacteriocinas no TGI destes imaturos pode ser benéfica e auxiliar no equilíbrio da microbiota e na manutenção da saúde do hospedeiro.

Tabela 6. *Enterococcus* da bacterioteca selecionados para análise de produção de substância antagonista contra *L. monocytogenes*.

Origem	Espécie (n)	Imaturo	ID Cepa
HEAB2	<i>E. casseliflavus</i> (2)	14	14.15*, 14.18*
	<i>E. mundtii</i> (11)	14	14.1*, 14.2*, 14.3*, 14.4*, 14.5*, 14.7*, 14.8*, 14.9*, 14.10*, 14.12*, 14.17*
	<i>Enterococcus</i> sp.(2)	14	14.14*, 14.16*
HEV2	<i>E. mundtii</i> (5)	26	26.1, 26.6, 26.11, 26.12, 26.21
	<i>E. mundtii</i> (2)	27	27.17, 27.18
	<i>E. mundtii</i> (1)	29	29.2
	<i>Enterococcus</i> sp. (1)	29	29.14
HES2	<i>E. mundtii</i> (2)	3	3.4, 3.16

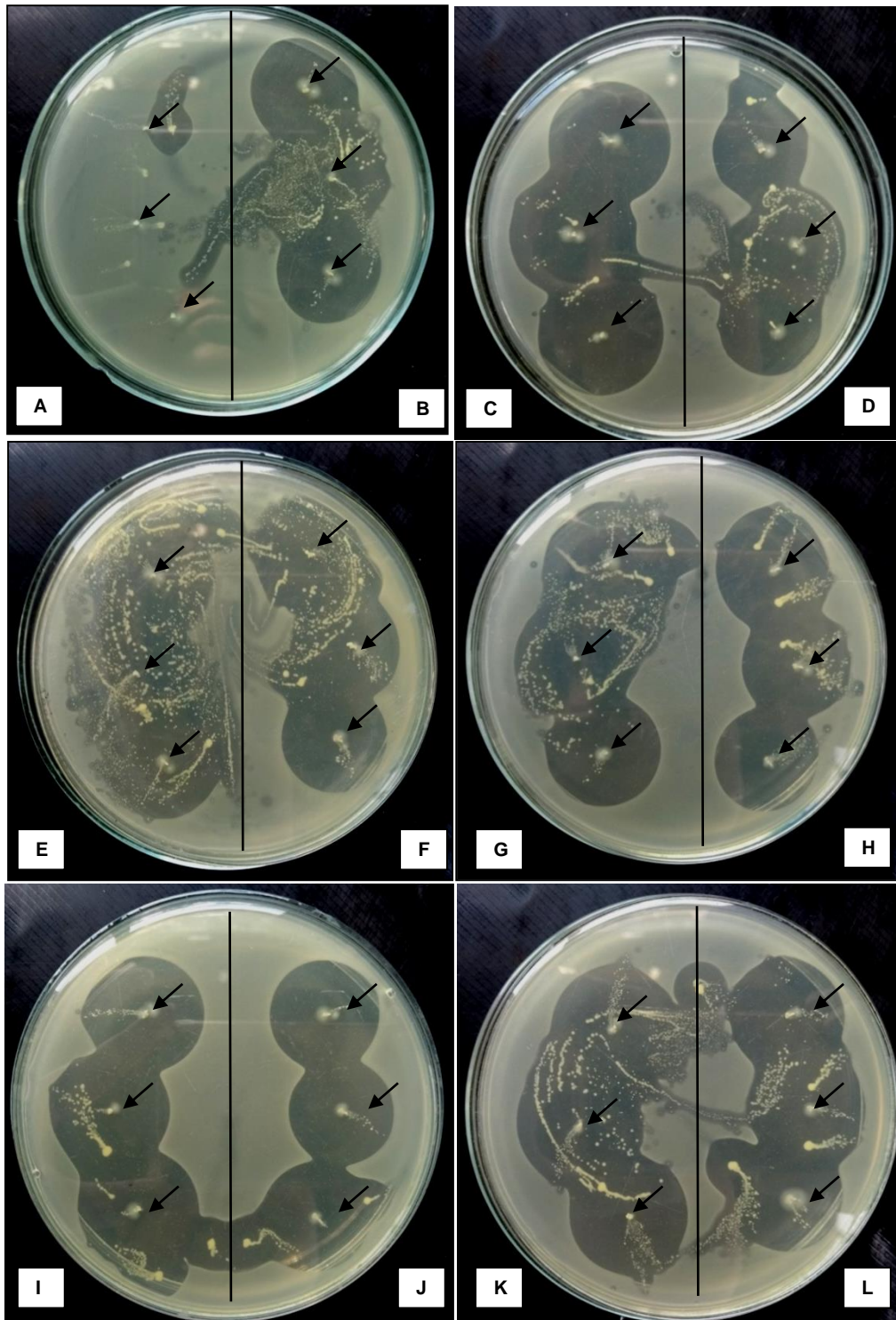
*: isolados que apresentaram atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes*.

Dos 26 isolados testados, 15 (57,7%) apresentaram formação de halo ao redor das colônias de enterococos (Tabela 7, Figura 11), e 11 (42,3%) não apresentaram atividade antimicrobiana durante o crescimento em contato com a bactéria indicadora *L. monocytogenes*, sem que se observasse a formação de halo após a incubação. Os isolados positivos para o teste pertenceram às espécies *E. mundtii* (n=11), *E. casseliflavus* (n=2) e *Enterococcus* sp. (n=2), todos provenientes da fêmea HEAB2, isolados de fezes do imaturo 14 (Figura 11).

Os enterococos positivos para o ensaio da sobrecamada que apresentaram halo ao redor das colônias indicando atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* foram submetidos à PCR para o gene *mundticinKS*. As 15 cepas apresentaram resultado positivo para a amplificação do gene.

Tabela 7. Diâmetros dos halos observados nos enterococos positivos para a produção de substância antagonista contra *L. monocytogenes*.

Espécie	ID Cepa	Diâmetro dos Halos (mm)			Média do diâmetro dos Halos das triplicatas (mm)
<i>E. mundtii</i>	14.1	25	29	24	26
<i>E. mundtii</i>	14.2	26	28	28	27,3
<i>E. mundtii</i>	14.3	22	26	24	24
<i>E. mundtii</i>	14.4	32	30	29	30,3
<i>E. mundtii</i>	14.5	25	25	24	24,7
<i>E. mundtii</i>	14.7	28	26	25	26,3
<i>E. mundtii</i>	14.8	25	25	24	24,7
<i>E. mundtii</i>	14.9	24	25	25	24,7
<i>E. mundtii</i>	14.10	24	23	24	23,7
<i>E. mundtii</i>	14.12	30	27	25	27,3
<i>Enterococcus</i> sp.	14.14	25	27	24	25,3
<i>E. casseliflavus</i>	14.15	25	27	25	25,7
<i>Enterococcus</i> sp.	14.16	24	23	24	23,7
<i>E. mundtii</i>	14.17	27	26	26	26,3
<i>E. casseliflavus</i>	14.18	27	27	28	27,3



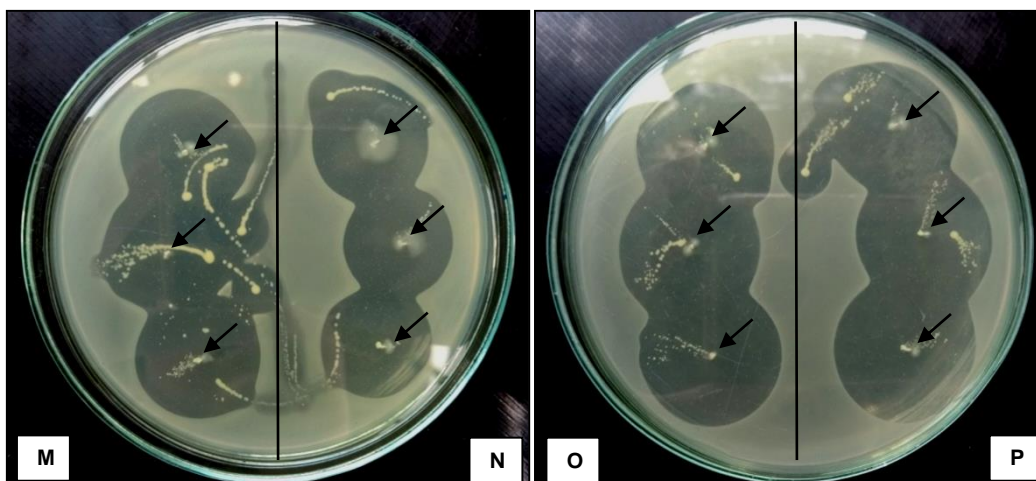


Figura 11. Halos formados pelos enterococos isolados de fezes de imaturos de borboletas frente a cepa teste *L. monocytogenes* em ensaio da sobrecamada. Setas indicam o local da inoculação dos *Enterococcus* por picada. A) 11.6 (negativo); B) 14.1; C) 14.2; D) 14.3; E) 14.4; F) 14.5; G) 14.7; H) 14.8; I) 14.9; J) 14.10; K) 14.12; L) 14.14; M) 14.15; N) 14.16; O) 14.17; P) 14.18.

5.4 Avaliação da Diversidade Genética dos enterococos isolados de fezes de imaturos de borboletas por PFGE

A análise do perfil de fragmentação do DNA genômico dos enterococos utilizando a enzima de restrição *Sma*I, revelou 35 perfis. Destes, 19 (54,30%) compostos por cepas com mais de 90% de similaridade entre si (perfis clonais), e 16 (45,70%) por somente uma cepa (*singleton*) (Figura 12). Dos 19 perfis clonais de enterococos, 15 (P1, P2, P3, P4, P5, P6, P10, P11, P12, P13, P14, P16, P17, P18 e P19) foram compostos por isolados provenientes da mesma lagarta, ou seja, da mesma amostra de fezes, sendo que os perfis P1, P2, P3, P5, P10, P11, P12 e P17 apresentaram padrão indistinguível de bandas, com 100% de homologia entre os enterococos, sendo considerados como clones idênticos.

Os perfis clonais P7, P8, P9 e P15 foram constituídos por cepas oriundas de lagartas irmãs, e apontam que a origem dos enterococos nas fezes dos imaturos pode ter uma origem tanto via herbivoria, quanto pela transferência vertical das fêmeas para a prole. Os enterococos que constituíram os perfis clonais P7, P8 e P9 foram isolados da prole da fêmea HEAB2, e nestes agrupamentos pode-se observar que a relação entre as bactérias pode estar relacionada com a alimentação, uma vez que os *E. casseliflavus* dos perfis clonais P7 e P8 e os *Enterococcus* sp. do perfil clonal P9 foram isolados dos imaturos 6, 7, 10 e 11, que eclodiram entre 20/11/2014 e 23/11/2014, foram alimentadas com plantas hospedeiras provenientes do mesmo

lote de folhas (Tabela 1), além da coleta de fezes também ter sido realizada no mesmo período (entre 03/12/2014 e 04/12/2014) (Tabela 1). Por outro lado, a possibilidade de transferência vertical de enterococos da mãe para a prole pode ser observada no perfil clonal P15, em que as cepas de *E. mundtii* e *Enterococcus* sp. foram isoladas da prole da fêmea HEV2, das fezes dos imaturos 18, 26, 28 e 29, que eclodiram em períodos distintos, entre 12/02/2014 e 02/03/2015, foram alimentadas com plantas hospedeiras oriundas de diferentes lotes de folhas e também tiveram as fezes coletadas em diferentes períodos de tempo, entre 24/02/2015 e 10/03/2015 (Tabela 1).

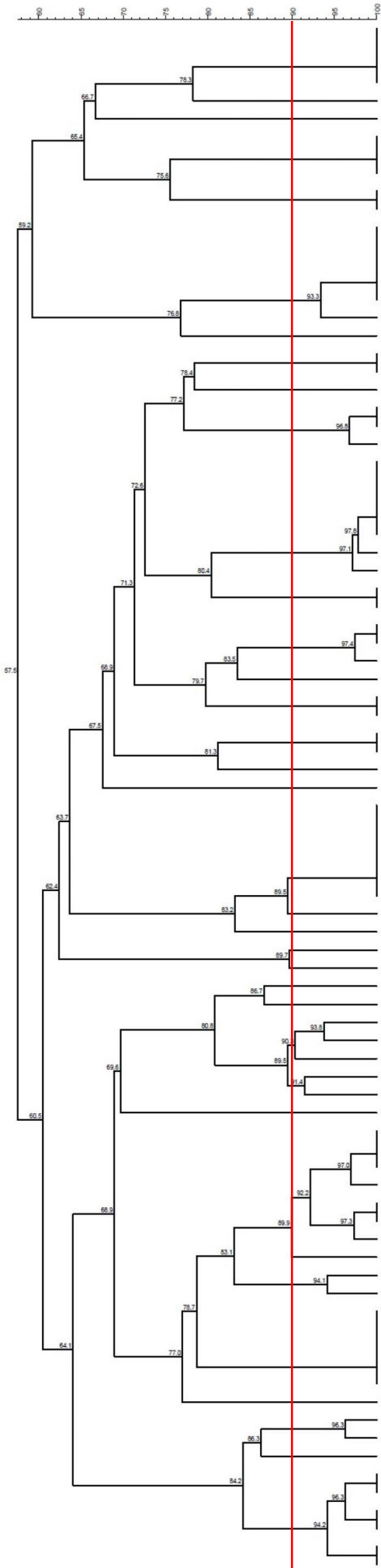
Quanto aos perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos, dos 19 perfis clonais, 10 (52,6%) consistiram de enterococos que apresentaram idêntico perfil de suscetibilidade aos onze antimicrobianos no teste de disco difusão previamente realizado (P1, P2, P3, P5, P6, P8, P10, P12, P16 e P17). Já os perfis P4, P7, P9, P11, P13, P14, P15, P18 e P19 (9 – 47,4%) diferiram em maior ou menor extensão para os perfis de suscetibilidade.

Os perfis clonais P4, P9, P11, P15 e P18 apresentaram apenas um *Enterococcus* que diferiu no perfil de suscetibilidade para apenas um antibiótico dos onze testados; o perfil P19 também diferiu em apenas um antibiótico, porém para dois dos seis *Enterococcus* que constituíram este perfil clonal.

Os perfis P7 e P13 apresentaram *Enterococcus* que diferiram para três dos onze antimicrobianos testados; o perfil P7 foi o que apresentou maior variação, sem que fosse possível estabelecer um padrão de suscetibilidade aos antimicrobianos eritromicina, norfloxacin e ciprofloxacina neste perfil clonal. Já o perfil P13 foi constituído por três *Enterococcus*, e somente um deles diferiu quanto ao perfil de suscetibilidade, porém para três antimicrobianos: rifampicina, eritromicina e norfloxacin.

Por fim, o perfil clonal P14, apesar de constituído apenas por dois *Enterococcus*, apresentou diferença para quatro dos onze antimicrobianos testados: rifampicina, eritromicina, norfloxacin e ciprofloxacina.

Figura 12. Dendrograma dos perfis clonais de *Enterococcus* isolados de amostras fecais de imaturos de *H. erato phyllis*, gerados a partir da fragmentação do DNA genômico pela enzima de restrição *Sma*I pela técnica de PFGE.



Isolate	Specie	RIF	ERI	NOR	CIP	Profile
HES2-3.15	<i>E. casseliflavus</i>	S	S	S	S	}
HES2-3.2	<i>E. casseliflavus</i>	S	S	S	S	
HES2-3.20	<i>E. casseliflavus</i>	S	S	S	S	
HES2-3.22	<i>E. casseliflavus</i>	S	S	S	S	
HEV2-26.5	<i>Enterococcus</i> spp.	R	S	S	S	singleton
HEV2-18.2	<i>E. casseliflavus</i>	R	I	S	S	singleton
HES2-17.10	<i>Enterococcus</i> spp.	S	S	S	S	}
HES2-17.14	<i>Enterococcus</i> spp.	S	S	S	S	
HES2-17.16	<i>Enterococcus</i> spp.	S	S	S	S	
HEAB2-6.18	<i>E. faecalis</i>	I	I	S	S	}
HEAB2-6.19	<i>E. faecalis</i>	I	I	S	S	
HEV2-18.16	<i>E. casseliflavus</i>	R	I	S	S	}
HEV2-18.18	<i>E. casseliflavus</i>	R	I	S	S	
HEV2-18.21	<i>E. casseliflavus</i>	R	I	S	S	
HEV2-18.4	<i>E. casseliflavus</i>	R	I	S	S	
HEV2-18.6	<i>E. casseliflavus</i>	R	I	S	S	}
HEV2-18.15	<i>E. casseliflavus</i>	R	S	S	S	
HEV2-18.10	<i>Enterococcus</i> spp.	R	S	S	S	
HEAB2-6.2	<i>E. casseliflavus</i>	R	I	S	S	}
HEAB2-6.4	<i>E. casseliflavus</i>	R	I	S	S	
HEAB2-7.22	<i>E. casseliflavus</i>	R	I	S	S	singleton
HEV2-26.2	<i>E. casseliflavus</i>	R	S	S	S	}
HEV2-26.9	<i>E. casseliflavus</i>	R	S	S	S	
HEV2-26.20	<i>E. casseliflavus</i>	R	S	S	S	
HEAB2-10.12	<i>E. casseliflavus</i>	R	I	S	S	}
HEAB2-10.17	<i>E. casseliflavus</i>	R	I	I	S	
HEAB2-10.5	<i>E. casseliflavus</i>	R	I	S	S	
HEAB2-11.9	<i>E. casseliflavus</i>	R	I	S	S	
HEAB2-7.2	<i>E. casseliflavus</i>	R	S	I	S	}
HEAB2-7.3	<i>E. casseliflavus</i>	R	S	I	S	
HEAB2-10.8	<i>E. casseliflavus</i>	R	I	S	I	
HEAB2-10.10	<i>E. casseliflavus</i>	R	S	S	S	}
HEAB2-11.8	<i>E. casseliflavus</i>	R	S	S	S	
HEAB2-10.6	<i>Enterococcus</i> spp.	R	S	S	S	}
HEAB2-7.15	<i>Enterococcus</i> spp.	R	I	S	S	
HEAB2-6.5	<i>Enterococcus</i> spp.	R	I	S	S	
HEAB2-7.12	<i>Enterococcus</i> spp.	S	S	S	S	singleton
HEAB2-6.12	<i>E. casseliflavus</i>	R	S	S	S	}
HEAB2-6.20	<i>E. casseliflavus</i>	R	S	S	S	
HEAB2-11.18	<i>E. casseliflavus</i>	R	S	S	S	}
HEAB2-11.6	<i>E. casseliflavus</i>	S	S	S	S	
HEAB2-10.7	<i>E. casseliflavus</i>	R	I	I	I	
HEAB2-10.9	<i>E. casseliflavus</i>	R	I	S	I	singleton
HEAB2-14.1	<i>E. mundtii</i>	S	S	S	S	}
HEAB2-14.12	<i>E. mundtii</i>	S	S	S	S	
HEAB2-14.3	<i>E. mundtii</i>	S	S	S	S	
HEAB2-14.5	<i>E. mundtii</i>	S	S	S	S	
HEAB2-14.7	<i>E. mundtii</i>	S	S	S	S	
HEAB2-14.9	<i>E. mundtii</i>	S	S	S	S	}
HEAB2-14.14	<i>Enterococcus</i> spp.	S	S	S	S	
HEAB2-14.16	<i>Enterococcus</i> spp.	S	S	S	S	singleton
HEAB2-7.13	<i>E. casseliflavus</i>	S	I	I	S	singleton
HEAB2-7.21	<i>E. casseliflavus</i>	S	I	S	S	singleton
HEAB2-7.20	<i>E. casseliflavus</i>	S	I	S	S	singleton
HEAB2-7.6	<i>E. casseliflavus</i>	S	S	S	S	singleton
HEAB2-7.11	<i>E. casseliflavus</i>	S	S	S	S	}
HEAB2-7.9	<i>E. casseliflavus</i>	S	S	S	S	
HEAB2-7.17	<i>E. casseliflavus</i>	R	I	I	S	
HEAB2-7.16	<i>E. casseliflavus</i>	S	I	I	I	}
HEAB2-7.23	<i>E. casseliflavus</i>	R	S	S	S	
HEAB2-7.19	<i>E. casseliflavus</i>	R	S	I	S	singleton
HEV2-27.16	<i>E. mundtii</i>	S	S	S	S	}
HEV2-29.19	<i>E. mundtii</i>	S	S	S	S	
HEV2-29.2	<i>E. mundtii</i>	S	S	S	S	
HEV2-27.3	<i>E. mundtii</i>	S	S	S	S	
HEV2-29.14	<i>Enterococcus</i> spp.	S	S	S	S	
HEV2-29.20	<i>Enterococcus</i> spp.	S	S	S	S	}
HEV2-26.19	<i>Enterococcus</i> spp.	S	S	S	S	
HEV2-18.3	<i>Enterococcus</i> spp.	R	S	S	S	
HEV2-26.14	<i>E. mundtii</i>	S	S	S	S	}
HEV2-26.21	<i>E. mundtii</i>	S	S	S	S	
HES2-3.16	<i>E. mundtii</i>	S	S	S	S	
HES2-3.18	<i>E. mundtii</i>	S	S	S	S	}
HES2-3.19	<i>E. mundtii</i>	S	S	S	S	
HES2-3.21	<i>E. mundtii</i>	S	S	S	S	
HES2-3.4	<i>E. mundtii</i>	S	S	S	S	}
HES2-3.24	<i>E. mundtii</i>	S	S	S	S	
HEV2-9.1	<i>E. casseliflavus</i>	S	S	S	S	
HEV2-9.5	<i>E. casseliflavus</i>	S	I	S	S	}
HEV2-9.9	<i>E. casseliflavus</i>	S	I	S	S	
HEV2-9.3	<i>E. casseliflavus</i>	S	S	S	S	}
HEV2-9.4	<i>E. casseliflavus</i>	S	S	S	S	
HEV2-9.14	<i>E. casseliflavus</i>	S	I	S	S	
HEV2-9.17	<i>E. casseliflavus</i>	S	I	S	S	
HEV2-9.20	<i>E. casseliflavus</i>	S	I	S	S	
HEV2-9.24	<i>E. casseliflavus</i>	S	I	S	S	

6. DISCUSSÃO

6.1 *Enterococcus* e a Resistência a Antimicrobianos

Devido ao intenso uso de antimicrobianos, bactérias resistentes do gênero *Enterococcus* têm sido cada vez mais relatadas como motivo de preocupação (Remschmidt *et al.*, 2017). Apesar de serem naturalmente encontrados nos mais diversos ambientes (Byappanahalli *et al.*, 2012) e serem micro-organismos comensais na microbiota normal do TGI de humanos e animais (Lebreton *et al.*, 2014), enterococos (principalmente as espécies *E. faecalis* e *E. faecium*) frequentemente são relatados como patógenos oportunistas no ambiente hospitalar.

Além dos problemas de resistência no ambiente hospitalar, atualmente é comum a ocorrência destes micro-organismos resistentes tanto em animais de criação (de Jong *et al.*, 2018) quanto em animais selvagens (Oravcova *et al.*, 2014; Lozano *et al.*, 2016; Prichula *et al.*, 2016; Ben Yahia *et al.*, 2018).

Enterococos fazem parte das comunidades microbianas do TGI de diferentes ordens de invertebrados, dentre elas a ordem lepidoptera. Contudo, a maioria das pesquisas envolvendo a microbiota destes insetos tem o enfoque na descrição de comunidades microbianas a partir de métodos moleculares, e metodologias de isolamento e análise dos fenótipos de suscetibilidade a antimicrobianos raramente são realizadas.

Pesquisas envolvendo a ocorrência de bactérias resistentes em invertebrados são interessantes, já que estes animais são amplamente distribuídos nos mais diversos ambientes e sua ocorrência em áreas urbanas pode tornar estes animais como carreadores bem sucedidos de bactérias resistentes. Srámová *et al.* (1992) isolaram bactérias presentes na superfície do corpo de artrópodes capturados dentro e fora de instituições de saúde, e relataram a presença de micro-organismos resistentes a diversos antimicrobianos, dentre eles bactérias do gênero *Enterococcus*. A ocorrência de micro-organismos resistentes, mesmo que de forma transiente, na superfície corporal de insetos pode atuar como um veículo de bactérias portadoras de plasmídeos e elementos móveis contendo genes de resistência de ambientes hospitalares para o exterior com facilidade, intensificando a disseminação destas cepas resistentes no ambiente.

Macovei *et al.* (2006) também descreveram enterococos resistentes relacionados a artrópodes; os autores relataram a presença de 205 *Enterococcus*

(181 *E. faecalis*, 14 *E. faecium* e 10 *E. casseliflavus*) isolados de moscas de cinco estabelecimentos de alimentação dos EUA, os quais apresentaram resistência a tetraciclina, eritromicina, ciprofloxacina, estreptomicina e cloranfenicol, indicando que este inseto pode ter papel importante na ecologia e transmissão de bactérias, incluindo enterococos resistentes a antimicrobianos. Diferente dos resultados para os enterococos resistentes a eritromicina do presente estudo, que não apresentaram nenhum dos genes de resistência investigados, os autores encontraram que a maioria dos *E. faecalis* isolados resistentes a eritromicina também foram positivos para amplificação do gene *ermB* (78,3%).

Larson *et al.* (2008) relataram a presença de *E. faecium* com perfis de resistência a oito antibióticos, dentre eles eritromicina e cloranfenicol, isolados de insetos coletados de locais de armazenamento em fábricas de ração animal nos Estados Unidos, porém os autores não investigaram a presença de genes de resistência nas cepas descritas. Trabalho semelhante foi realizado por Channaiah *et al.* (2010), em que foram isolados 154 enterococos de amostras de 95 insetos; os autores relataram resistência aos antibióticos tetraciclina, estreptomicina, eritromicina, canamicina, ciprofloxacina, ampicilina e cloranfenicol; dentre os 22 enterococos que apresentaram resistência a eritromicina, apenas 10 foram positivos para a amplificação do gene *ermB*. A abundância de resíduos orgânicos em locais de criação de animais torna estes ambientes como locais atrativos para determinados insetos, os quais entram em contato com os dejetos e matéria orgânica e tornam-se propensos à disseminação de cepas resistentes (Zurek & Ghosh, 2014).

Insetos coletados em fazendas de criação de suínos nos Estados Unidos apresentaram diversas espécies de *Enterococcus* (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus* e *E. hirae*), os quais apresentaram resistência a diversos antimicrobianos, dentre eles tetraciclina, eritromicina, estreptomicina e canamicina (Ahmad *et al.*, 2011); quando investigada a presença do gene *ermB* para as cepas resistentes a eritromicina, as espécies *E. faecalis* e *E. casseliflavus* apresentaram cerca de 50% de prevalência, já *E. faecium* e *E. hirae* apresentaram cerca de 20% de prevalência do gene.

Estudos que descrevam o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de cepas isoladas de lepidópteros são escassos. Já foram realizados trabalhos a fim de elucidar a resposta das comunidades microbianas presentes na mariposa *Plutella*

xylostella (Lepidoptera; Plutellidae) após a administração de antimicrobianos a fim de avaliar a resposta observada nestes insetos considerados como importantes pragas agrícolas (Lin *et al.*, 2015); outro estudo recente avaliou a administração de antimicrobianos em dietas artificiais durante a criação de *Spodoptera litura* (Lepidoptera; Noctuidae), também considerado como praga agrícola, a fim de avaliar seu *fitness* e sobrevivência (Thakur *et al.*, 2016).

O presente estudo avaliou a ocorrência dos genes de resistência *ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrC* e *gyrA* em *Enterococcus* isolados do lepidóptero comumente encontrado no RS, *H. erato phyllis*. As cepas analisadas eram sensíveis à maioria dos antimicrobianos testados previamente (Huff, 2016). Dentre os fenótipos de resistência observados, a maior frequência foi associada ao antibiótico rifampicina, porém o mecanismo molecular associado a esta resistência não foi investigado no presente estudo. A resistência à rifampicina ocorre devido a uma variedade de mutações nos genes *rpoB*, que codificam a subunidade β da RNA polimerase (Garrido *et al.*, 2014; Miller *et al.*, 2014); sendo assim, enterococos podem adquirir resistência a esta substância através de mutações pontuais que podem ocorrer em diversas regiões do gene, tornando difícil a identificação de tal perfil genotípico de resistência a partir das análises por PCR utilizadas como metodologia no presente estudo. Portanto, somente foi investigada a presença dos genes relacionados aos fenótipos de resistência à eritromicina, norfloxacin e ciprofloxacina nos enterococos da bacterioteca.

As cepas da bacterioteca apresentaram níveis intermediários de resistência ao macrolídeo (eritromicina) e às quinolonas (norfloxacin e ciprofloxacina).

Como já comentado anteriormente, a resistência a eritromicina pode estar associada aos genes *ermA*, *ermB* e *ermC*, responsáveis pela metilação da subunidade 23S do rRNA, bem como ao gene *msrC*, responsável pela expressão de bombas de efluxo. No presente estudo, em todas as cepas que apresentaram perfil de resistência à eritromicina foi pesquisada a ocorrência de tais genes, porém em 100% dos casos não foi encontrado resultado positivo para a amplificação destes genes de resistência. Como já citado, trabalhos anteriores também já relataram a ocorrência de resultados negativos para a amplificação dos genes *erm* em isolados com fenótipo de resistência a eritromicina. Entretanto, para a maioria das cepas testadas frequentemente é encontrada a associação do genótipo positivo para o

gene *ermB*. Contudo, vale ressaltar que, apesar de não terem sido realizados experimentos de Concentração Inibitória Mínima, os *Enterococcus* isolados de imaturos de borboletas apresentaram cepas com perfis intermediários de resistência a este macrolídeo; a ocorrência destes genes geralmente é associada a fenótipos de alta resistência a eritromicina, principalmente nas cepas isoladas de amostras clínicas. Sendo assim, a resistência destas bactérias não está associada aos genes comumente citados para enterococos, porém outros mecanismos genéticos podem estar associados a estes fenótipos e mais estudos são necessários para inferir com maior propriedade quais mecanismos moleculares estão relacionados a resistência à eritromicina em *Enterococcus* provenientes de imaturos de *H. erato phyllis*.

As quinolonas possuem outro alvo celular, a replicação do DNA bacteriano. Para enterococos frequentemente se associa de mutações no gene *gyrA* para os fenótipos de resistência a esta classe de antimicrobianos. Os fenótipos de resistência às quinolonas também foram intermediários conforme estudos realizados previamente (Huff, 2016). Assim como no caso dos aminoglicosídeos, nenhuma das 11 cepas testadas teve resultado positivo para a detecção da mutação no gene *gyrA*, comumente associado aos fenótipos resistentes, e possivelmente a ocorrência dos fenótipos de resistência pode ser associada a outros mecanismos de resistência não investigados no presente estudo.

É incontestável que a ocorrência e disseminação de cepas resistentes se intensificou devido ao uso de antimicrobianos, porém é interessante ressaltar que a resistência ocorre naturalmente no meio ambiente (Martínez, 2008; Allen *et al.*, 2010). Muitos antimicrobianos utilizados clinicamente possuem uma origem natural, ou seja, são produzidos pelo metabolismo de micro-organismos. A produção de tais compostos pode auxiliar a persistência destes organismos pela competição com outros micro-organismos nos ambientes naturais. É esperado que bactérias que produzam tais substâncias necessitem de mecanismos próprios para que as mesmas não atuem de forma prejudicial para sua própria sobrevivência (Martínez, 2008).

Baixas concentrações de antibióticos nos ambientes naturais podem atuar como moléculas sinalizadoras e aumentar taxas de mutação, recombinação gênica e transferência horizontal nos micro-organismos, bem como estimular a expressão de mecanismos de resistência e virulência, como a formação de biofilme (Fajardo & Martínez, 2008).

Além disso, outros mecanismos relacionados às diferentes pressões de seleção exercidas pelos ambientes naturais também atuam como fonte de variabilidade e de seleção de mecanismos de defesa dos micro-organismos. Um deles é a expressão de bombas de efluxo; a presença de substâncias tóxicas no ambiente, como metais pesados, atua como pressão de seleção sobre os organismos, favorecendo o crescimento e disseminação de bactérias capazes de sobreviver na presença destes compostos (Martinez *et al.*, 2009). Logo, apesar de muito intensificada, a ocorrência de cepas resistentes não é um evento novo que surgiu com a era dos antibióticos, e sempre fez parte da evolução e sobrevivência dos micro-organismos nos ambientes naturais.

6.2 Detecção Genotípica e Fenotípica dos Fatores de Virulência nos Enterococos

Como citado anteriormente, *Enterococcus* apresentam genes constitutivos e adquiridos que codificam proteínas associados ao maior sucesso na colonização do hospedeiro, assim como na fixação e persistência destas bactérias em superfícies ambientais. A facilidade de *Enterococcus* realizarem trocas de material genético entre espécies do mesmo gênero, e também de diferentes gêneros microbianos, facilita a disseminação destes fatores de virulência.

É comum a ocorrência de genes de virulência em cepas provenientes de amostras clínicas (Duprè *et al.*, 2003; Marra *et al.*, 2007; Rathnayake *et al.*, 2012; Shokoohizadeh *et al.*, 2018), contudo trabalhos também já descreveram enterococos expressando estes genes em amostras de alimentos e de animais.

Em estudo recente realizado com *E. faecalis* isolados de amostras clínicas (urina, sangue e secreção cervical) e de alimentos (batata, batata doce, leite pasteurizado, queijo colonial, dentre outros) provenientes de Porto Alegre, foi observada maior prevalência dos genes *agg*, *esp* e *cylA* para esta espécie, sendo que o gene *esp* somente foi detectado nas amostras clínicas (Medeiros *et al.*, 2014); os autores também detectaram os genes de virulência *gelE* e *ace* de forma prevalente tanto nas amostras clínicas quando nos alimentos, ressaltando a ocorrência e disseminação destes genes fora do ambiente hospitalar (Medeiros *et al.*, 2014). Este resultado corrobora em parte com o que foi observado no presente estudo, em que se detectou a presença dos genes *gelE* e *ace* nos dois *E. faecalis* da bacterioteca, porém os genes *agg*, *esp* e *cylA* não foram encontrados para esta

espécie.

O gene *ace*, que codifica a adesina ao colágeno, não foi detectado em nenhum dos enterococos isolados de amostras fecais de imaturos de *H. erato phyllis*. Similar aos resultados do presente estudo, Mannu *et al.* (2003) também não detectaram a presença do gene *ace* em todos os 94 *E. faecium* isolados de amostras clínicas, de alimentos e de animais em estudo comparativo.

O gene *cyIA*, que codifica a enzima extracelular citolisina, também não foi detectado em nenhum dos 178 enterococos da bacterioteca, porém foi encontrada alta prevalência de atividade hemolítica entre os isolados (73%). Similar ao presente estudo, Macovei *et al.* (2007) relataram que um número expressivo de *E. casseliflavus* (40,7%) isolados de amostras de alimentos dos Estados Unidos não apresentaram amplificação para o gene *cyIA*, mas eram capazes de hidrolizar hemácias de gado; os autores também relataram baixa prevalência do gene *gelE*, como nos enterococos aqui analisados, indicando baixa virulência das cepas.

Animais selvagens também já foram relatados como carreadores de enterococos que apresentam genes de virulência. Poeta *et al.* (2005) identificaram 140 enterococos de amostras fecais de aves e mamíferos selvagens em Portugal; foi observada prevalência do gene *gelE* (75,3%) nos *E. faecalis* analisados, e o gene *esp* foi o menos frequente dentre as amostras. Em outro estudo no qual foram isolados enterococos de amostras de castores selvagens da Polônia, não foi encontrado o gene *agg* para nenhuma das cinco espécies de *Enterococcus* identificadas (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. durans* e *E. thailandicus*) (Leuková *et al.*, 2015); estes resultados corroboram com o que foi observado para os enterococos isolados de imaturos de *H. erato phyllis*, nos quais não foi possível detectar o gene *agg* que codifica a substância de agregação em *Enterococcus*.

Conforme citado para genes de resistência, estudos avaliando a detecção de fatores de virulência em enterococos provenientes de amostras de insetos também são escassos; sendo assim, os estudos de Macovei *et al.* (2006), Channaiah *et al.* (2010) e Ahmad *et al.*, (2011) também serão utilizados como comparativos para os resultados do presente estudo.

A partir das análises realizadas por Channaiah *et al.* (2010) em 154 enterococos de amostras de 95 insetos coletados de locais de armazenamento em fábricas de ração animal nos Estados Unidos, a atividade da enzima gelatinase foi mais frequentemente associada a *E. faecalis*; as espécies *E. casseliflavus*, *E.*

gallinarum e *E. hirae* não foram positivas para amplificação do gene *cyIA*, porém apresentaram fenótipo de degradação das hemácias humanas, sendo que *E. casseliflavus* foi a espécie que apresentou maior frequência na atividade hemolítica. Todos estes resultados corroboram com o apresentado no presente estudo, em que o gene *gelE* bem como atividade da enzima gelatinase só foi detectada para a espécie *E. faecalis*, a ausência de amplificação para o gene *cyIA* na espécie *E. casseliflavus*, porém com alto percentual de cepas desta espécie que foram positivas no teste fenotípico para hemolisina (114 – 87,7%).

Como citado anteriormente, os genes associados ao fator de virulência citolisina pode estar presentes tanto de forma constitutiva, quanto em elementos móveis como plasmídeos bacterianos (Mundy *et al.*, 2000; Koch *et al.*, 2004; Medeiros *et al.*, 2014); logo é provável que a atividade hemolítica descrita para a maioria dos enterococos da bacterioteca analisados no presente estudo seja codificado por diferentes genes presentes em elementos móveis os quais não foram identificados pela técnica aqui utilizada.

Diferente do que foi aqui apresentado, em pesquisa envolvendo *Enterococcus* isolados de moscas coletados em fazendas de criação de suínos nos Estados Unidos (Ahmad *et al.*, 2011), os autores encontraram maior prevalência do fenótipo hemolítico para *E. faecalis* do que para *E. faecium*, *E. casseliflavus*, e *E. hirae*, e também relataram altas taxas de correspondência entre a ocorrência do gene *cyIA* e a presença de hemólise de sangue humano.

Macovei *et al.* (2006) descreveram enterococos resistentes relacionados a moscas capturadas em estabelecimentos de alimentação dos EUA; os autores descreveram *E. faecalis* e *E. casseliflavus* positivos para *gelE*, e a maioria das cepas que apresentaram este gene também foram positivas para a prova fenotípica. Assim como mostrado no presente estudo, em que cepas apresentaram hemólise e ausência do gene *cyIA*, os autores descreveram que 80% dos *E. casseliflavus* testados apresentaram atividade para gelatinase, porém apenas 10% amplificaram para o gene. Associação similar foi citada para o gene *gelE* em *E. faecium*, em que 78,6% das cepas apresentaram atividade de degradação na prova fenotípica, porém somente 7,1% amplificaram para o gene *gelE*.

Bactérias do gênero *Enterococcus* são micro-organismos oportunistas, e a ocorrência de genes de virulência comumente relatados na área clínica é responsável por dificultar o tratamento de infecções. Contudo, estes genes são

responsáveis por promover adesão a superfícies, facilitar o contato entre os micro-organismos durante a troca de material genético, participarem da formação do biofilme, dentre outros fatores, que, apesar de estarem envolvidos na patogenicidade, também aprimoram a interação entre micro-organismo e hospedeiro em condições naturais, como nos casos de mutualismo.

Poucos enterococos isolados de imaturos de *H. erato phyllis* apresentaram os genes de virulência comumente encontrados na área clínica, e é provável que estes genes não estejam atuando de forma prejudicial nos organismos analisados no presente estudo.

Conforme o que foi relatado anteriormente, é possível que as cepas negativas para a amplificação do gene *gelE*, as quais não foram testadas na prova fenotípica da gelatinase, possuam atividade de degradação deste substrato. Sendo assim, apesar das cepas que amplificaram para *gelE* no presente estudo também terem apresentado atividade na prova fenotípica, estes resultados apontam a importância de ser realizada a prova fenotípica da gelatinase para todos os enterococos desta bacterioteca, principalmente para as cepas produtoras de munditocina, caso forem utilizadas em futuras aplicações biotecnológicas.

6.3 Produção de Compostos com Atividade Antimicrobiana

A partir de ensaio de dupla camada foi possível detectar 15 *Enterococcus* produtores de substâncias antagonistas com atividade antilisterial. No presente estudo não foi realizado ensaio de comprovação utilizando sobrenadante livre de células com pH neutralizado, logo somente com o ensaio de dupla camada não é possível inferir se esta atividade antagonista se deve à produção de bacteriocinas ou de compostos ácidos. Contudo, todas as cepas positivas para o ensaio fenotípico amplificaram para o gene *mundticinKS*, confirmando que os 11 *E. mundtii*, 2 *E. casseliflavus* e 2 *Enterococcus* sp. (Tabela 7) isolados de amostras fecais de imaturos de *H. erato phyllis* possuem o gene que codifica esta enterocina.

Enterocinas são bacteriocinas produzidas por *Enterococcus*; estas moléculas são classificadas como bacteriocinas de Classe IIa: peptídeos pequenos (<10 kDa), lineares, sintetizados no ribossomo bacteriano, que não sofrem modificações pós traducionais e possuem atividade antilisterial (Rios *et al.*, 2016; Ríos Colombo *et al.*, 2018). Estes peptídeos podem atuar se ligando de forma estável a receptores de outros micro-organismos, causando uma estabilização

irreversível de um canal, ou utilizando um receptor como molécula de ancoragem com inserção da enterocina na membrana plasmática do hospedeiro; ambas as formas resultam na formação de poros levando à morte celular devido a estas perturbações na membrana (Sakayori *et al.*, 2003; Rios *et al.*, 2016; Ríos Colombo *et al.*, 2018).

Uma das bacteriocinas descritas para enterococos é a *mundticin*KS. Kawamoto *et al.* (2002) descreveram o peptídeo de 43 aminoácidos produzido por *E. mundtii* NFRI 7393 isolado de amostra vegetal da Tailândia, o qual foi denominado de *mundticin*KS. O composto apresentou atividade frente a cepas de *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. mundtii*, para três espécies de *Lactobacillus* e para *L. monocytogenes*.

Plasmídeos conjugativos podem carrear genes que codificam a produção de bacteriocinas, facilitando a disseminação destes genes no ambiente (Ness *et al.*, 2015). Como já relatado, bactérias do gênero *Enterococcus* realizam transferências gênicas ativamente, e sua ampla distribuição no ambiente pode facilitar a aquisição e dispersão destes condicionantes genéticos. Enterococos produtores de bacteriocinas podem ter vantagem durante a competição com demais microorganismos, eliminando potenciais competidores e se beneficiando de maior disponibilidade de nutrientes e de nichos ecológicos para seu crescimento e disseminação (Ríos *et al.*, 2016).

Enterococos produtores de enterocinas já foram isolados de amostras clínicas, de alimentos, e de animais. Enterococos produtores de enterocinas também já foram isolados de amostras provenientes de insetos; Audisio *et al.* (2011) identificaram uma cepa de *E. faecium* produtora de composto com atividade antilisterial no TGI de *Apis mellifera*, que apresentou atividade contra bactérias indicadoras (*Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Listeria*).

Recentemente foi realizada uma importante pesquisa utilizando a mariposa de interesse comercial *S. litoralis* (Shao *et al.*, 2017). Os autores isolaram *E. casseliflavus*, *E. faecalis* e *E. mundtii* (produtor de bacteriocina) de ovos e do TGI dos imaturos deste lepidóptero. As análises revelaram que as amostras de lagartas de primeiro estágio apresentaram grande proporção de *E. faecalis* e *E. casseliflavus*; de forma interessante, conforme o desenvolvimento dos imaturos os autores relatam aumento significativo das populações de *E. mundtii*, acompanhado da diminuição drástica de *E. faecalis*. A cepa *E. mundtii* SL isolada pelos autores apresentou atividade contra os enterococos bem como atividade antilisterial. O peptídeo foi

analisado quanto à sua sequência e teve homologia com o peptídeo produzido por *E. mundtii* NFRI 7393 (Kawamoto *et al.*, 2002), e análises de expressão gênica detectaram sua expressão à nível de RNAm, confirmando sua produção no TGI do inseto. Sendo assim, Shao *et al.* (2017) concluíram que o peptídeo produzido foi a enterocina *mundticinKS*, de origem plasmidial, com intensa expressão no TGI deste lepidóptero, capaz de reduzir populações de uma espécie proximamente relacionada.

No presente estudo foi detectada a presença do gene *mundticinKS* em diferentes espécies de enterococos provenientes de *H. erato phyllis*. É possível que as cepas de *E. casseliflavus* e *Enterococcus* sp. tenham adquirido este gene via transferência horizontal de elementos genéticos móveis, os quais foram detectados na PCR para o gene. Como já citado por outros autores (Chen *et al.*, 2016), é possível que bactérias do gênero *Enterococcus* atuem de forma benéfica para as lagartas de lepidópteros, e que estas cepas (incluindo a espécie *E. mundtii*) sejam responsáveis por modular as populações microbianas presentes no TGI destes insetos, eliminando bactérias competidoras e potenciais micro-organismos patogênicos que venham a colonizar estes animais.

Mais estudos são necessários a fim de caracterizar os compostos produzidos por estes micro-organismos, bem como avaliar sua expressão no TGI de *H. erato phyllis*, a fim de compreender a extensão da atuação destas bactérias como moduladoras das populações que compõe a microbiota do TGI desta borboleta.

6.4 Análise da Diversidade Genética por PFGE

O presente estudo analisou a relação clonal entre enterococos isolados de amostras fecais de imaturos de *H. erato phyllis* utilizando a técnica de PFGE. O PFGE é uma técnica considerada como padrão ouro para a análise genotípica de bactérias do gênero *Enterococcus*, e tem sido aplicado em análises epidemiológicas relacionadas a amostras clínicas, frequentemente em análises de surtos envolvendo cepas resistentes, porém também é utilizada para analisar enterococos provenientes de amostras de água e de animais (Donabedian *et al.*, 2010; Furukawa *et al.*, 2011; Marchi *et al.*, 2017).

No presente estudo, perfis clonais reunindo cepas provenientes de lagartas com diferentes origens maternas não foi observado. Além disso, foi possível observar perfis agrupando lagartas irmãs com alta porcentagem de similaridade;

sendo assim, é possível que uma das primeiras rotas de aquisição de enterococos em imaturos recém-eclodidos de *H. erato phyllis* seja via transmissão fêmea-prole, garantindo a colonização do TGI dos imaturos.

Em insetos não-sociais a transferência vertical de micro-organismos é comum e pode ocorrer tanto através do cuidado parental dos imaturos com a prole, via cápsulas depositadas na superfície de massas de ovos ou até mesmo por vias mais especializadas como as rotas de transmissão transovarianas (Fukatsu & Hosokawa, 2002; Wang *et al.*, 2017; Dan *et al.*, 2017). Apesar de raras exceções, o comportamento de cuidado parental com a prole após a postura dos ovos ou durante o desenvolvimento dos imaturos não é observado em lepidópteros (Nafus & Schreiner, 1988). Contudo, evidências sugerem a ocorrência de transferência vertical de *Enterococcus* spp. nestes insetos, e indicam que esta transmissão seria responsável por estabilizar interações entre os micro-organismos e o hospedeiro, bem como facilitar a co-evolução (Chen *et al.*, 2016). Estudos recentes envolvendo a microbiota do TGI de diferentes espécies de lepidópteros têm descrito *Enterococcus* como o gênero mais frequentemente observado nos diferentes estágios de vida destes animais (Brinkmann *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2016; Ruokolainen *et al.*, 2016; Snyman *et al.*, 2016). Hammer *et al.* (2014) analisaram as comunidades microbianas presentes no TGI de imaturos e adultos de *H. erato* do Panamá a partir de técnicas moleculares (identificando também bactérias não-cultiváveis); foram descritas comunidades bacterianas relativamente simples nas amostras analisadas, sendo que dentre os gêneros encontrados *Enterococcus* foi o mais abundante em todos os estágios de vida analisados (lagartas, pupas, adultos recém emergidos e adultos maduros).

A partir dos resultados obtidos pelos perfis de fragmentação gerados é possível reunir os perfis clonais observados em três grupos: perfis clonais compostos por cepas oriundas do mesmo imaturo (maioria dos perfis clonais gerados), perfis clonais compostos por cepas isoladas de imaturos-irmãos, os quais foram alimentados com o mesmo lote de plantas hospedeiras, demonstrando uma possível aquisição via herbivoria, e o perfil clonal composto por cepas isoladas de imaturos-irmãos, os quais foram alimentados com diferentes lotes da planta hospedeira, evidenciando a possibilidade de transferência vertical de enterococos.

É notável que uma das principais vias de entrada e colonização de micro-organismos é através da alimentação. A herbivoria é frequentemente associada às

comunidades microbianas presentes no TGI dos insetos, e conforme citado anteriormente contribui aprimorando dietas pobres em nutrientes, assim como auxiliando no desenvolvimento e maturação do sistema imune que protege o hospedeiro contra micro-organismos patogênicos (Dillon & Dillon, 2004; Engel & Moran, 2013).

O gênero *Enterococcus* é associado ao ambiente a diversos organismos, dentre eles as plantas (Mundt, 1963; Müller *et al.*, 2001; Byappanahalli *et al.*, 2012; Sánchez *et al.*, 2012). Sendo assim, é provável que a herbivoria durante os estádios larvais de *H. erato phyllis* represente uma fonte abundante de micro-organismos. Apesar de as passifloráceas ingeridas serem uma fonte importante de *Enterococcus*, a ausência de perfis clonais envolvendo cepas isoladas de imaturos não-irmãos pode ser explicada em parte devido aos diferentes períodos de alimentação das lagartas com a planta hospedeira *P. suberosa*, em que os diferentes lotes de folhas atuaram como fonte de diferentes cepas de *Enterococcus* sp. para estes indivíduos.

Além da aquisição de enterococos através da alimentação, é provável que tenha ocorrido a transferência vertical das fêmeas para a prole durante a postura de ovos. No caso de insetos sociais, a transferência de microbiota frequentemente ocorre e é facilitada devido a interações entre os indivíduos, como no caso de abelhas e cupins (Abdul *et al.*, 2015; Kwong & Moran, 2016). O contato entre adultos, ovos e lagartas através de cuidado parental pode ser uma fonte importante de transmissão de micro-organismos, contudo, a postura de ovos nas borboletas *H. erato phyllis* é realizada individualmente no meristema apical das plantas hospedeiras, e o comportamento de cuidado parental não é relatado.

Para que os imaturos de *H. erato phyllis* sejam capazes de eclodir, devem ingerir parte do córion dos ovos, criando uma abertura pela qual conseguem alcançar o ambiente externo. Diversas vezes é observado que os juvenis recém-eclodidos continuam a ingerir boa parte ou a totalidade do córion dos ovos; este comportamento pode ser justificado pela importante fonte de nutrientes ao alcance dos imaturos neste período inicial de desenvolvimento. Até o momento, não é relatada a ocorrência de nenhum mecanismo de transferência vertical de micro-organismos para *H. erato phyllis*, porém para outras espécies de borboletas, os ovos têm sido relatados como uma potencial fonte de micro-organismos entre a fêmea e sua prole (Brinkmann *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2016; Teh *et al.*, 2016; Shao *et al.*, 2017).

Enterococcus sp. foram detectados em ovos do lepidóptero *Manduca sexta* (Lepidoptera – Sphingidae), e os dados obtidos pelos autores indicam que as bactérias foram adquiridas via ingestão do córion dos ovos pelas lagartas e não pela alimentação herbívora dos imaturos, sugerindo a ocorrência de transferência vertical de micro-organismos para esta espécie (Brinkmann *et al.*, 2008), o que corrobora com os resultados obtidos no presente estudo.

Outro lepidóptero alvo de estudos referentes à sua microbiota é a mariposa *S. littoralis*, considerada como praga agrícola, e diversos estudos têm relatado a presença de *Enterococcus* spp. em adultos e imaturos deste inseto: Chen *et al.* (2016) observaram imaturos de *S. littoralis* ingerindo o córion dos ovos durante sua eclosão, e sugeriram que micro-organismos presentes na massa de ovos representam tanto uma contaminação de origem materna, assim como uma fonte de micro-organismos provenientes do ambiente em que estes ovos se encontram; além disso, os autores descreveram que a maioria das bactérias encontradas no córion dos ovos também foi detectada nas lagartas, indicando que a microbiota da mãe foi adquirida pelo juvenil via ingestão da microbiota presente nos ovos. Teh *et al.* (2016) demonstraram a rota de transmissão de *E. mundtii* administrado *in vivo* em *S. littoralis*; relataram a presença de *E. mundtii* marcado com fluoróforo em todos os estágios de vida do inseto, assim como em oócitos e no tecido muscular de lagartas de primeiro estágio da prole da segunda geração, demonstrando novamente a ocorrência de transferência vertical de enterococos nesta espécie de mariposa, bem como sua persistência em mais de uma geração.

Recentemente, Shao *et al.* (2017) também sugeriram via dados moleculares que os ovos são uma fonte de *Enterococcus* spp. para imaturos de *S. littoralis*. Além disso, os autores detectaram a expressão da enterocina *mundticinKS* pelos *E. mundtii* residentes no intestino dos imaturos, os quais atuaram na comunidade microbiana reduzindo o risco de infecção, salientando mais uma vez a importância da transferência e manutenção deste gênero de bactérias no TGI desta ordem de insetos.

O uso de enzimas de restrição que clivam regiões do DNA genômico gerando grandes fragmentos na técnica de PFGE pode em parte mascarar fenótipos de resistência adquiridos via mutações, que alteram o fenótipo sem alterar os padrões dos fragmentos de restrição gerados (Murray *et al.*, 1990). A ocorrência de deleções, inversões, aquisição ou perda de transposons e plasmídeos,

frequentemente relatados para enterococos, pode não ser detectada, e ocasionar tais discrepâncias nos agrupamentos. Sendo assim, a formação de perfis clonais entre enterococos com diferentes fenótipos de resistência, como no caso dos antibióticos rifampicina e para quinolonas, pode ser explicada pela sequência de nucleotídeos que é reconhecida e clivada pela enzima de restrição *Sma*I; a enzima possivelmente não foi capaz de detectar as mutações pontuais que podem ser associadas aos perfis de resistência no genoma destas cepas. No caso do antibiótico eritromicina, os genes pesquisados no presente estudo não foram detectados, e a ocorrência de outros mecanismos de resistência através de mutações ou de aquisição de plasmídeos e elementos móveis podem, da mesma forma, não terem sido detectados pela clivagem do DNA genômico realizada pela enzima.

7. CONCLUSÃO

As cepas isoladas de amostras fecais de imaturos de *H. erato phyllis* não apresentaram muitos fenótipos de resistência nos testes de suscetibilidade a antimicrobianos prévios, e no presente estudo nenhum dos genes testados envolvidos nos mecanismos de resistência a macrolídeos e quinolonas foi detectado. É provável que outros genes responsáveis pela resistência a estes antimicrobianos estejam sendo expressos nestas cepas, e que estes fenótipos auxiliem na persistência destes micro-organismos no microambiente em que eles se estabeleceram.

Quanto aos fatores de virulência, não foram detectados os genes *agg* e *cytA* e foi observada baixa ocorrência dos genes *esp*, *ace* e *gelE* dentre as amostras analisadas, sendo *esp* o mais frequentemente encontrado. Os *E. faecalis* positivos para *gelE* também foram positivos para o teste fenotípico da gelatinase, e a maioria dos enterococos (130) foi positivo para a degradação das hemácias. Dado o número de estudos que relacionam a presença de enterococos no TGI de lepidópteros, é possível que os fatores de virulência relatados nos enterococos isolados de imaturos de *H. erato phyllis* estejam envolvidos em interações benéficas entre parasita e hospedeiro, e provavelmente estes genótipos e fenótipos não estejam relacionados à patogenicidade para estas cepas.

Foi detectada a produção de substância antagonista contra *L. monocytogenes* em enterococos isolados de fezes de imaturos de *H. erato phyllis*, e todos foram positivos para a amplificação do gene *mundticinKS*. É provável que bactérias do gênero *Enterococcus* desempenhem um papel importante no TGI de lepidópteros, e mais estudos são necessários a fim de melhor elucidar tal associação entre parasita e hospedeiro.

A partir da análise do perfil de fragmentação do DNA gonômico dos enterococos isolados de imaturos com diferentes origens maternas, é possível inferir que os *Enterococcus* foram adquiridos a partir do ambiente durante o desenvolvimento e alimentação herbívora dos imaturos. Além disso, foi possível observar cepas oriundas de imaturos irmãos compondo o mesmo perfil clonal, indicando que as fêmeas também contribuem para a transferência da microbiota para a prole através de mecanismos de transferência vertical de micro-organismos. Mais estudos são necessários a fim de investigar a microbiota do TGI de fêmeas

adultas, bem como de micro-organismos presentes na superfície dos ovos e no TGI de diferentes estádios larvais para inferir com maior propriedade a ocorrência de transferência vertical de micro-organismos na borboleta *H. erato phyllis*.

8. REFERÊNCIAS

- Abdul Rahman N, Parks DH, Willner DL, Engelbrekton AL, Goffredi SK, Warnecke F, Scheffrahn RH, Hugenholtz P. 2015. A molecular survey of Australian and North American termite genera indicates that vertical inheritance is the primary force shaping termite gut microbiomes. *Microbiome*. 3:5.
- Ahmad A, Ghosh A, Schal C, Zurek L. 2011. Insects in confined swine operations carry a large antibiotic resistant and potentially virulent enterococcal community. *BMC Microbiol*. 11(1): 23.
- Ahmad V, Khan MS, Jamal QMS, Alzohairy MA, Karaawi MAA, Siddiqui MU. 2017. Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. *Int J Antimicrob Agents*. 49: 1-11.
- Al-Atya AK, Belguesmia Y, Chataigne G, Ravallec R, Vachée A, Szunerits S, Boukherroub R, Drider D. 2016. Anti-MRSA Activities of Enterocins DD28 and DD93 and Evidences on Their Role in the Inhibition of Biofilm Formation. *Front Microbiol*. 7(817): 1-12.
- Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J, Handelsman J. 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol*. 8(4): 251-259.
- Al-Seraih A, Belguesmia Y, Baah J, Szunerits S, Boukherroub R, Drider D. 2017. Enterocin B3A-B3B produced by LAB collected from infant faeces: potential utilization in the food industry for *Listeria monocytogenes* biofilm management. *Antonie van Leeuwenhoek*. 110: 205-219.
- Alvarez-Sieiro P, Montalbán-López M, Um D, Kuipers OP. 2016. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Appl Microbiol Biotechnol*. 100: 2939-2951.
- Audisio MC, Torres MJ, Sabaté DC, Iburguren C, Apella MC. 2011. Properties of different lactic acid bacteria isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut. *Microbiol Res*. 166(1): 1-13.
- Aymone AC, Lothhammer N, Valente VL, de Araújo AM. 2014. Embryogenesis of *Heliconius erato* (Lepidoptera, Nymphalidae): a contribution to the anatomical development of an evo-devo model organism. *Dev Growth Differ*. 56(6): 448-459.
- Ben Yahia H, Chairat S, Hamdi N, Gharsa H, Ben Sallem , Ceballos S, Torres C, Ben Slama K. 2018. Antimicrobial resistance and genetic lineages of faecal enterococci of wild birds: Emergence of *vanA* and *vanB2* harbouring *Enterococcus faecalis*. *Int J Antimicrob Agents*. S0924-8579(18)30136-5.
- Brinkmann N, Martens R, Tebbe CC. 2008. Origin and diversity of metabolically active gut bacteria from laboratory-bred larvae of *Manduca sexta* (Sphingidae, Lepidoptera, Insecta). *Appl Environ Microbiol*. 74: 7189-7196.
- Briscoe AD, Macias-Muñoz A, Kozak KM, Walters JR, Yuan F, Jamie GA, Martin SH, Dasmahapatra KK, Ferguson LC, Mallet J, Jacquín-Joly E, Jiggins CD. 2013. Female behavior drives expression and evolution of gustatory receptors in butterflies. *PLoS Genet*. 9(7): e1003620.
- Broderick NA, Raffa KF, Goodman RM, Handelsman J. 2004. Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods. *Appl Environ Microbiol*. 70: 293-300.
- Byappanahalli MN, Nevers MB, Korajkic A, Staley ZR, Harwood VJ. 2012.

- Enterococci in the environment. *Microbiol Mol Biol Rev.* 76(4): 685-706.
- Cardoso MZ, Gilbert LE. 2013. Pollen feeding, resource allocation and the evolution of chemical defence in passion vine butterflies. *J Evol Biol.* 26(6): 1254-1260.
- de Castro ECP, Zagrobelny M, Cardoso MZ, Bak S. 2018. The arms race between heliconiine butterflies and *Passiflora* plants – new insights on an ancient subject. *Biol Rev.* 93(1): 555–573.
- Channaiah LH, Subramanyam B, McKinney LJ, Zurek L. 2010. Stored-product insects carry antibiotic-resistant and potentially virulent enterococci. *FEMS Microbiol Ecol.* 74(2): 464-71.
- Chen B, Teh B, Sun C, Hu S, Lu X, Boland W, Shao Y. 2016. Biodiversity and Activity of the Gut Microbiota across the Life History of the Insect Herbivore *Spodoptera littoralis*. *Sci Rep.* 6: 29505.
- Comerlato CB. 2015. **Isolamento e caracterização de peptídeos antimicrobianos produzidos por *Enterococcus* spp. provenientes de amostras alimentares e ambientais.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul.
- Costa LFX. 2018. **Caracterização de *Enterococcus* sp. provenientes de amostras de fezes de morcegos *Tadarida brasiliensis*.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul.
- Dan H, Ikeda N, Fujikami M, Nakabachi A. 2017. Behavior of bacteriome symbionts during transovarial transmission and development of the Asian citrus psyllid. *PLoS One.* 12(12): e0189779.
- Danino D, Melamed R, Sterer B, Porat N, Hazan G, Gushanski A, Shany E, Greenberg D, Borer A. 2018. Mother to Child Transmission of Extended Spectrum Beta-Lactamase Producing *Enterobacteriaceae*. *J Hosp Infect.* pii: S0195-6701(18)30036-7.
- Dell'aglio DD, Losada ME, Jiggins CD. 2016. Butterfly Learning and the Diversification of Plant Leaf Shape. *Front Ecol Evol.* 4(81): 1-7.
- De Nardin J, Da Silva L, Araújo AM. 2016. Kin recognition in a butterfly: inferences about its heritability. *Ethol Ecol Evol.* 29(3): 1-11.
- Dillon RJ, Dillon VM. 2004. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annu Rev Entomol.* 49: 71-92.
- Donabedian SM, Perri MB, Abdujamilova N, Gordoncillo MJ, Naqvi A, Reyes KC, Zervos MJ, Bartlett P. 2010. Characterization of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Isolated from Swine in Three Michigan Counties. *J Clin Microbiol.* 48(11): 4156-4160.
- Douglas AE. 2009. The microbial dimension in insect nutritional ecology. *Funct Ecol.* 23: 38-47.
- Douglas AE. 2015. Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms. *Annu Rev Entomol.* 60: 17-34.
- Dündar H. 2016. Bacteriocinogenic Potential of *Enterococcus faecium* Isolated from Wine. *Probiotics. & Antimicro. Prot.* 8: 150-160.
- Dunlap-Pianka H, Boggs CL, Gilbert LE. 1977. Ovarian Dynamics in Heliconiine Butterflies: Programmed Senescence versus Eternal Youth. *Science.* 197(4302): 487-490.
- Duprè I, Zanetti S, Schito AM, Fadda G, Sechi LA. 2003. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*

- isolates collected in Sardinia (Italy). *J Med Microbiol.* 52(6): 491-498.
- Dzidic S, Bedeković V. 2003. Horizontal gene transfer-emerging multidrug resistance in hospital bacteria. *Acta Pharmacol Sin.* 24(6): 519-526.
- Eaton TJ, Gasson MJ. 2001. Molecular Screening of *Enterococcus* Virulence Determinants and Potential for Genetic Exchange between Food and Medical Isolates. *Appl Environ Microbiol.* 67(4): 1628-1635.
- Engel P, Moran NA. 2013. The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. *FEMS Microbiol Rev.* 37: 699-735.
- Fajardo A, Martínez JL. 2008. Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses. *Curr Opin Microbiol.* 11(2): 161-167.
- Finkbeiner SD, Briscoe AD, Reed RD. 2012. The benefit of being a social butterfly: communal roosting deters predation. *Proc Biol Sci.* 279 (1739): 2769-2776.
- Finkbeiner SD, Fishman DA, Osorio D, Briscoe AD. 2017. Ultraviolet and yellow reflectance but not fluorescence is important for visual discrimination of conspecifics by *Heliconius erato*. *J Exp Biol.* 220(7): 1267-1276.
- Fisher K, Phillips C. 2009. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology.* 55(6): 1749-1757.
- Fukatsu T, Hosokawa T. 2002. Capsule-Transmitted Gut Symbiotic Bacterium of the Japanese Common Plataspid Stinkbug, *Megacopta punctatissima*. *Appl Environ Microbiol.* 68(1): 389-396.
- Furukawa T, Takahashi H, Yoshida T, Suzuki Y. 2011. Genotypic Analysis of Enterococci Isolated from Fecal-Polluted Water from Different Sources by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) for Application to Microbial Source Tracking. *Microbes Environ.* 26(2): 181-183.
- Gao Y, Li B, Li D, Zhang L. 2016. Purification and characteristics of a novel bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* L11 isolated from Chinese traditional fermented cucumber. *Biotechnol Lett.* 38: 871-876.
- Garrido AM, Gálvez A, Pulido RP. 2014. Antimicrobial Resistance in *Enterococci*. *J Infect Dis Ther.* 2:4.
- Garsin DA, Frank KL, Silanpää J, Ausubel FM, Hartke A, Shankar N, Murray BE. 2014. **Pathogenesis and Models of Enterococcal Infection.** Em: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, et al Editors. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistance Infection.* Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston, MA.
- Geldart K, Kaznessis YN. 2017. Characterization of Class IIa Bacteriocin Resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother.* 61(4). pii: e02033-16.
- Ghosh A, Akhtar M, Holderman C, Zurek L. 2014. Significance and survival of *Enterococci* during the house fly development. *J Med Entomol.* 51(1):63-7.
- Gilbert LE. 1971. Butterfly-Plant Coevolution: Has *Passiflora adenopoda* Won the Selectional Race with Heliconiine Butterflies? *Science.* 172(3983): 585-586.
- Gilbert LE. 1972. Pollen Feeding and Reproductive Biology of *Heliconius* Butterflies. *Proc Nat Acad Sci.* 69(6): 1403-1407.
- Guzman Prieto AM, van Schaik W, Rogers MR, Coque TM, Baquero F, Corander J, Willems RJ. 2016. Global Emergence and Dissemination of Enterococci as Nosocomial Pathogens: Attack of the Clones? *Front Microbiol.* 7: 788.
- Hammer TJ, McMillan WO, Fierer N. 2014. Metamorphosis of a butterfly-associated bacterial community. *PLoS One.* 9(1): e86995.
- Hay-Roe MM, Nation J. 2007. Spectrum of cyanide toxicity and allocation

- in *Heliconius erato* and *Passiflora* host plants. *J Chem Ecol.* 33(2): 319-329.
- Hazirolan G, Savas S, Karagoz A, Bayik SA, Mumcuoglu I, Aksu N, Durmaz R. 2017. Alternative versus gold standard method for the typing of vancomycin resistant *Enterococcus faecium*: semi-automated rep-PCR system. *Biomed Res.* 28 (4): 1517-1522.
- Hickl AL, Krenn HW. 2011. Pollen processing behavior of *Heliconius* butterflies: A derived grooming behavior. *J Insect Sci.* 11: 99.
- Hollenbeck BL, Rice LB. 2012. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence.* 3(5): 421-433.
- Holt JF, Kiedrowski MR, Frank KL, Du J, Guan C, Broderick NA, Dunny GM, Handelsman J. 2015. *Enterococcus faecalis* 6-Phosphogluconolactonase Is Required for Both Commensal and Pathogenic Interactions with *Manduca sexta*. *Infect Immun.* 83(1): 396-404.
- Huff R. 2016. **Diversidade e Perfil Antimicrobiano de *Enterococcus* spp. isolados de fezes de imaturos de *Heliconius erato phyllis* (Lepidoptera – Nymphalidae).** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul.
- Jensen LB, Frimodt-Møller N, Aarestrup FM. 1999. Presence of *erm* gene classes in Gram-positive bacteria of animal and human origin in Denmark. *FEMS Microbiol Lett.* 170(1): 151-158.
- Jones RM. 2016. The Influence of the Gut Microbiota on Host Physiology: In Pursuit of Mechanisms. *Yale J Biol Med.* 89(3): 285-297.
- de Jong A, Simjee S, Garch FE, Moyaert H, Rose M, Youala M, Dry M, EASSA Study Group. 2018. Antimicrobial susceptibility of enterococci recovered from healthy cattle, pigs and chickens in nine EU countries (EASSA Study) to critically important antibiotics. *Vet Microbiol.* 216: 168-175.
- Kaškonienė V, Stankevičius M, Bimbraitė-Survilienė K, Naujokaitytė G, Šernienė L, Mulkytė K, Malakauskas M, Maruška A. 2017. Current state of purification, isolation and analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* 101: 1323-1335.
- Kawamoto S, Shima J, Sato R, Eguchi T, Ohmomo S, Shibato J, Horikoshi N, Takeshita K, Sameshima T. 2002. Biochemical and genetic characterization of *mundticin* KS, an antilisterial peptide produced by *Enterococcus mundtii* NFRI 7393. *Appl Environ Microbiol.* 68(8): 3830-3840.
- Kim JM, Choi MY, Kim JW, Lee SA, Ahn JH, Song J, Kim SH, Weon HY. 2017. Effects of diet type, developmental stage, and gut compartment in the gut bacterial communities of two Cerambycidae species (Coleoptera). *J Microbiol.* 55(1): 21-30.
- Kivanç SA, Kivanç M, Yiğit T. 2016. Antibiotic susceptibility, antibacterial activity and characterisation of *Enterococcus faecium* strains isolated from breast milk. *Exp Ther Med.* 12: 1732-1740.
- Koch S, Hufnagel M, Theilacker C, Huebner J. 2004. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine.* 22(7): 822-830.
- Kwong WK, Moran NA. 2016. Gut microbial communities of social bees. *Nat Rev Microbiol.* 14(6): 374-84.
- Labeyrie E, Pascal L, Delabie J, Orivel J, Dejean A, Hosseaert-Mckey M. 2001. Protection of *Passiflora glandulosa* (Passifloraceae) against herbivory: impact of ants exploiting extrafloral nectaries. *Sociobiology.* 38: 317-321.

- Larson Z, Subramanyam B, Zurek L, Herrman T. 2008. Diversity and antibiotic resistance of enterococci associated with stored-product insects collected from feed mills. *J Stored Prod Res.* 44(2): 198-203.
- Lauková A, Stropfová V, Kandričáková A, Ščerbová J, Semedo-Lemsaddek T, Miltko R, Belzecki G. 2015. Virulence factors genes in enterococci isolated from beavers (*Castor fiber*). *Folia Microbiol.* 60(2): 151-154.
- Lebreton F, Willems RJL, Gilmore MS. 2014. **Enterococcus Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization.** Em: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, et al Editors. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistance Infection.* Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston, MA.
- Lin XL, Kang ZW, Pan QJ, Liu TX. 2015. Evaluation of five antibiotics on larval gut bacterial diversity of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Insect Sci.* 22(5): 619-628.
- Lozano C, Gonzalez-Barrio D, Camacho MC, Lima-Barbero JF, de la Puente J, Höfle U, Torres C. 2016. Characterization of fecal vancomycin-resistant enterococci with acquired and intrinsic resistance mechanisms in wild animals, Spain. *Microb Ecol.* 72(4): 813-820.
- LPSN - List of prokaryotic names with standing in nomenclature. **Genus Enterococcus.** 2018. <<http://www.bacterio.net/enterococcus.html>>. Acesso em: 04 jul. 2018.
- Lytsy B, Engstrand L, Gustafsson Å, Kaden R. 2017. Time to review the gold standard for genotyping vancomycin-resistant enterococci in epidemiology: Comparing whole-genome sequencing with PFGE and MLST in three suspected outbreaks in Sweden during 2013-2015. *Infect Genet Evol.* 54: 74-80.
- Macovei L, Zurek L. 2006. Ecology of Antibiotic Resistance Genes: Characterization of Enterococci from Houseflies Collected in Food Settings. *Appl Environ Microbiol.* 72(6): 4028-4035.
- Macovei L, Zurek L. 2007. Influx of Enterococci and Associated Antibiotic Resistance and Virulence Genes from Ready-To-Eat Food to the Human Digestive Tract. *73(21): 6740–6747.*
- Magalhães VD, Ferreira JC, Barelli C, Darini ALC. 2005. Pulsed field gel electrophoresis use in bacteriology – a technical review. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 64(2): 155-161.
- Mallon DJP, Corkill JE, Hazel SM, Wilson JS, French NP, Bennett M, Hart CA. 2002. Excretion of Vancomycin-Resistant Enterococci by Wild Mammals. *Emerg Infect Dis.* 8(6): 636-638.
- Mannu L, Paba A, Daga E, Comunian R, Zanetti S, Duprè I, Sechi LA. 2003. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *Int J Food Microbiol.* 88: 291-304.
- Marchi AP, Perdigão Neto LV, Martins RCR, Rizek CF, Camargo CH, Moreno LZ, Moreno AM, Batista MV, Basqueira MS, Rossi F, Amigo U, Guimaraes T, Levin AS, Costa SF. 2017. Vancomycin-resistant enterococci isolates colonizing and infecting haematology patients: clonality, and virulence and resistance profile. *J Hosp Infect.* pii: S0195-6701(17)30576-5.
- Marra A, Dib-Hajj F, Lamb L, Kaczmarek F, Shang W, Beckius G, Milici AJ, Medina I, Gootz TD. 2007. Enterococcal virulence determinants may be involved in resistance to clinical therapy. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 58: 59-65.

- Martin JD, Mundt JO. 1972. Enterococci in Insects. *Appl Microbiol.* 24(4): 575-580.
- Martínez JL. 2008. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science.* 321(5887): 365-367.
- Martinez JL, Sánchez MB, Martínez-Solano L, Hernandez A, Garmendia L, Fajardo A, Alvarez-Ortega C. 2009. Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiol Rev.* 33(2): 430-449.
- McCulloch KJ, Osorio D, Briscoe AD. 2016. Sexual dimorphism in the compound eye of *Heliconius erato*: a nymphalid butterfly with at least five spectral classes of photoreceptor. *J Exp Biol.* 219(15): 2377-2387.
- Medeiros AW. 2011. **Avaliação dos fatores de virulência e a capacidade de formação de biofilme *in vitro* em isolados alimentares e clínicos de *Enterococcus* sp. e utilização de PCR-RFLP para a identificação de *Enterococcus casseliflavus* e *Enterococcus gallinarum*.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul.
- Medeiros AW, Pereira RI, Oliveira DV, Martins PD, d'Azevedo PA, Van der Sand S, Frazzon J, Frazzon AP. 2014. Molecular detection of virulence factors among food and clinical *Enterococcus faecalis* strains in South Brazil. *Braz J Microbiol.* 45(1): 327-332.
- Menna-Barreto Y, Araújo AM. 1985. Evidence for host plant preferences in *Heliconius erato phyllis* from southern Brazil (Nymphalidae). *J Res Lepid.* 24: 41-46.
- Merrill RM, Dasmahapatra KK, Davey JW, Dell'Aglio DD, Hanly JJ, Huber B, Jiggins CD, Joron M, Kozak KM, Llaurens V, Martin SH, Montgomery SH, Morris J, Nadeau NJ, Pinharanda AL, Rosser N, Thompson MJ, Vanjari S, Wallbank RW, Yu Q. 2015. The diversification of *Heliconius* butterflies: what have we learned in 150 years? *J Evol Biol.* 28(8): 1417-1438.
- Miller WR, Munita JM, Arias CA. 2014. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 12(10): 1221-1236.
- Montgomery SH, Merrill RM, Ott SR. 2016. Brain Composition in *Heliconius* Butterflies, Posteclosion Growth and Experience-Dependent Neuropil Plasticity. *J Comp Neurol.* 524(9): 1747-1769.
- Müller, F. 1879. Ituna and Thyridia; a remarkable case of mimicry in butterflies. *Trans Ent Soc Lond.* 1879: xx-xxix.
- Müller T, Ulrich A, Ott EM, Müller M. 2001. Identification of plant-associated enterococci. *J Appl Microbiol.* 91(2): 268-78.
- Mundt JO. 1963. Occurrence of enterococci on plants in a wild environment. *Appl Microbiol.* 11: 141-144.
- Mundy LM, Sahm DF, Gilmore M. 2000. Relationships between Enterococcal Virulence and Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev.* 13(4): 513-522.
- Murray BE. 1990. The Life and Times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev.* 3(1): 46-65.
- Murray BE, Singh KV, Heath JD, Sharma BR, Weinstock GM. 1990. Comparison of Genomic DNAs of Different Enterococcal Isolates Using Restriction Endonucleases with Infrequent Recognition Sites. *J Clin Microbiol.* 28(9): 2059-2063.
- Nadeau NJ. 2016. Genes controlling mimetic colour pattern variation in butterflies. *Curr Opin Insect Sci.* 17: 24-31.

- Nafus DM, Schreiner IH. 1988. Parental care in a tropical nymphalid butterfly *Hypolimnas anomala*. *Anim Behav.* 36(5): 1425-1431.
- Ness IF, Diep DB, Ike Y. 2014. **Enterococcal Bacteriocins and Antimicrobial Proteins that Contribute to Niche Control**. Em: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston, MA.
- Oravcova V, Janecko N, Ansoerge A, Masarikova M, Literak I. 2014. First record of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in Canadian wildlife. *Environ Microbiol Rep.* 6(3): 210-211.
- Perin LM, Todorov SD, Nero LA. 2016. Investigation of genes involved in nisin production in *Enterococcus* spp. strains isolated from raw goat milk. *Antonie van Leeuwenhoek.* 109: 1271-1280.
- Poeta P, Costa D, Sáenz Y, Klibi N, Ruiz-Larrea F, Rodrigues J, Torres C. 2005. Characterization of antibiotic resistance genes and virulence factors in faecal enterococci of wild animals in Portugal. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 52(9): 396-402.
- Prichula J. 2015. **Caracterização fenotípica e genotípica de *Enterococcus* spp. isolados de amostras fecais de pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) encontrados no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul.
- Prichula J, Pereira RI, Wachholz GR, Cardoso LA, Tolfo NC, Santestevan NA, Medeiros AW, Tavares M, Frazzon J, d'Azevedo PA, Frazzon AP. 2016. Resistance to antimicrobial agents among enterococci isolated from fecal samples of wild marine species in the southern coast of Brazil. *Mar Pollut Bull.* 105(1): 51-57.
- Rathnayake I, Hargreaves M, Huygens F. 2011. SNP diversity of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in a South East Queensland waterway, Australia, and associated antibiotic resistance genes profiles. *BMC Microbiol.* 11: 201.
- Rathnayake IU, Hargreaves M, Huygens F. 2012. Antibiotic resistance and virulence traits in clinical and environmental *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates. *Syst Appl Microbiol.* 35(5): 326-333.
- Remschmidt C, Behnke M, Kola A, Peña Diaz LA, Rohde AM, Gastmeier P, Schwab F. 2017. The effect of antibiotic use on prevalence of nosocomial vancomycin-resistant enterococci- an ecologic study. *Antimicrob Resist Infect Control.* 6: 95.
- Remschmidt C, Schröder C, Behnke M, Gastmeier P, Geffers C, Kramer TS. 2018. Continuous increase of vancomycin resistance in enterococci causing nosocomial infections in Germany – 10 years of surveillance. *Antimicrob Resist Infect Control.* 7: 54.
- Rios AC, Moutinho CG, Pinto FC, Del Fiol FS, Jozala A, Chaud MV, Vila MM, Teixeira JA, Balcão VM. 2016. Alternatives to overcoming bacterial resistances: State-of-the-art. *Microbiol Res.* 191: 51-80.
- Ríos Colombo NS, Chalón MC, Navarro SA, Bellomio A. 2018. Pediocin-like bacteriocins: new perspectives on mechanism of action and immunity. *Curr Genet.* 64(2): 345-351.
- Rodrigues D, Moreira GR. 2002. Geographical variation in larval host-plant use by *Heliconius erato* (Lepidoptera:Nymphalidae) and consequences for adult

- life history. *Braz J Biol.* 62(2): 321-332.
- Ruokolainen L, Ikonen S, Makkonen H, Hanski I. 2016. Larval growth rate is associated with the composition of the gut microbiota in the *Glanville fritillary* butterfly. *Oecologia.* 181(3): 895-903.
- Saeedi B, Hällgren A, Jonasson J, Nilsson LE, Hanberger H, Isaksson B. 2002. Modified pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of enterococci. *APMIS.* 110(12): 869-874.
- Sakayori Y, Muramatsu M, Hanada S, Kamagata Y, Kawamoto S, Shima J. 2003. Characterization of *Enterococcus faecium* mutants resistant to *mundticin* KS, a class IIa bacteriocin. *Microbiology.* 149(10): 2901-2908.
- Salcedo C. 2010. Environmental elements involved in communal roosting in *Heliconius* butterflies (Lepidoptera:Nymphalidae). *Environ Entomol.* 39(3): 907-911.
- Sánchez Valenzuela A, Benomar N, Abriouel H, Pérez Pulido R, Martínez Cañamero M, Gálvez A. 2012. Characterization of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from wild flowers. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 101(4): 701-711.
- Schleifer KH, Kilpper-Balz R. 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 34(1): 31-34.
- Shankar V, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindahl G, Gilmore MS. 1999. Infection-Derived *Enterococcus faecalis* Strains Are Enriched in *esp*, a Gene Encoding a Novel Surface Protein. *Infect Immun.* 67(1): 193-200.
- Shao Y, Chen B, Sun C, Ishida K, Hertweck C, Boland W. 2017. Symbiont-Derived Antimicrobials Contribute to the Control of the Lepidopteran Gut Microbiota. *Cell Chem Biol.* 24(1): 66-75.
- Shehata AA, Tarabees R, Basiouni S, Gamil M, Kamal AS, Krüger M. 2017. Phenotypic and Genotypic Characterization of Bacteriocinogenic Enterococci Against *Clostridium botulinum*. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 9(2): 182-188.
- Shepard BD, Gilmore MS. 2002. Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. *Microbes Infect.* 4(2): 215-224.
- Shokoohizadeh L, Ekrami A, Labibzadeh M, Ali L, Alavi SM. 2018. Antimicrobial resistance patterns and virulence factors of enterococci isolates in hospitalized burn patients. *BMC Res Notes.* 11:1.
- Silva DS, Barp EA, Kucharski LCR, Moreira GRP. 2018. Sensing the Plant Surface Prior to Feeding and Oviposition: Differences in External Ultrastructure and Function Among Tarsi of *Heliconius erato*. *Neotrop Entomol.* 47(1): 85-95.
- Smith G, Macias-Muñoz A, Briscoe AD. 2016. Gene Duplication and Gene Expression Changes Play a Role in the Evolution of Candidate Pollen Feeding Genes in *Heliconius* Butterflies. *Genome Biol Evol.* 8(8): 2581-2596.
- Snyman M, Gupta AK, Bezuidenhout CC, Claassens S, van den Berg J. 2016. Gut microbiota of *Busseola fusca* (Lepidoptera: Noctuidae). *World J Microbiol Biotechnol.* (7): 115.
- Somily AM, Al-Mohizea MM, Absar MM, Fatani AJ, Ridha AM, Al-Ahdal MN, Senok AC, Al-Qahtani AA. 2016. Molecular epidemiology of vancomycin resistant enterococci in a tertiary care hospital in Saudi Arabia. *Microb Pathog.* 97: 79-83.

- Srámová H, Daniel M, Absolonová V, Dědicová D, Jedlicková Z, Lhotová H, Petrás P, Subertová V. 1992. Epidemiological role of arthropods detectable in health facilities. *J Hosp Infect.* 20(4): 281-292.
- Stępień-Pyśniak D, Hauschild T, Nowaczek A, Marek A, Dec M. 2018. Wild Birds As A Potential Source Of Known And Novel Multilocus Sequence Types Of Antibiotic-Resistant *Enterococcus faecalis*. *J Wildl Dis.* 54(2): 219-228.
- Sutcliffe J, Tait-Kamradt A, Wondrack L. 1996. *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* Resistant to Macrolides but Sensitive to Clindamycin: a Common Resistance Pattern Mediated by an Efflux System. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40(8): 1817-1824.
- Swanberg SL, Wang JC. 1987. Cloning and Sequencing of the *Escherichia coli gyrA* Gene Coding for the A Subunit of DNA Gyrase. *J Mol Biol.* 197: 729-736.
- Tagg JR & McGiven AR. 1971. Assay System for Bacteriocins. *Appl Microbiol.* 21(5): 943.
- Teh BS, Apel J, Shao Y, Boland W. 2016. Colonization of the Intestinal Tract of the Polyphagous Pest *Spodoptera littoralis* with the GFP-Tagged Indigenous Gut Bacterium *Enterococcus mundtii*. *Front Microbiol.* 14(7): 928.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 33(9): 2233-2239.
- Thakur A, Dhammi P, Saini HS, Kaur S. Bull. 2016. Effect of antibiotic on survival and development of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) and its gut microbial diversity. *Entomol Res.* 106(3): 387-394.
- Thiele SC, Rodrigues D, Moreira GRP. 2016. Oviposition in *Heliconius erato* (Lepidoptera, Nymphalidae): how Essential Is Drumming Behavior for Host-Plant Selection? *J Insect Behav.* 29: 283.
- Turabelidze D, Kotetishvili M, Kreger A, Morris JG, Sulakvelidze A. 2000. Improved Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Typing Vancomycin-Resistant Enterococci. *J Clin Microbiol.* 38(11): 4242-4245.
- Upadhyaya PMG, Ravikumar KL, Umapathy BL. 2009. Review of virulence factors of enterococcus: an emerging nosocomial pathogen. *Indian J Med Microbiol.* 27(4): 301-305.
- Wang Y, Rozen DE. 2017. Gut Microbiota Colonization and Transmission in the Burying Beetle *Nicrophorus vespilloides* throughout Development. *Appl Environ Microbiol.* 83(9): e03250-16.
- Werner G, Hildebrandt B, Witte W. 2001. The Newly Described *msrC* Gene Is Not Equally Distributed among All Isolates of *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45(12): 3672-3673.
- Williams KS, Gilbert LE. 1981. Insects as selective agents on plant vegetative morphology: egg mimicry reduces egg laying by butterflies. *Science.* 212(4493): 467-469.
- Zendo T, Eungruttanagorn N, Fujioka S, Tashiro Y, Nomura K, Sera Y, Kobayashi G, Nakayama J, Ishizaki A, Sonomoto K. 2005. Identification and production of a bacteriocin from *Enterococcus mundtii* QU 2 isolated from soybean. *J Appl Microbiol.* 99: 1181-1190.
- Zhang G, Lin X, Cai J, Zhang R, Xiu H, Tian B, Cui W. 2018. Characteristics of clinical and environmental vanM-carrying vancomycin-resistant enterococci isolates from an infected patient. *Int J Antimicrob Agents.* 51(6): 932-935.

Zurek L, Ghosh A. 2014. Insects Represent a Link between Food Animal Farms and the Urban Environment for Antibiotic Resistance Traits. *Appl Environ Microbiol.* 80(12): 3562-3567.