

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

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*

ALINE WEBER MEDEIROS
Biomédica – Universidade Feevale

Porto Alegre, 2011

Catálogo na Publicação
UFRGS/ICBS/Biblioteca Setorial

M488a Medeiros, Aline Weber

Avaliação dos fatores de virulência e a capacidade de biofilme *in vitro* em isolados alimentares e clínicos de *Enterococcus* sp. e utilização de PCR-RFLP para identificação de *Enterococcus casseliflavus* e *Enterococcus gallinarum*/ Aline Weber Medeiros. – 2011.

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, 2011.

Orientação: Prof. Ana Paula Guedes Frazzon

Co-orientação: Prof. Sueli Terezinha van der Sand

1. *Enterococcus* 2. Fatores de virulência 3. Biofilmes 4. Reação em cadeia da polimerase I. Frazzon, Ana Paula Guedes, orient. II. Sand, Sueli Terezinha van der, co-orient. III. Título.

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

**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***

ALINE WEBER MEDEIROS
Biomédica – Universidade Feevale

Dissertação apresentada
no Programa de Pós-
Graduação em
Microbiologia Agrícola e do
Ambiente como um dos
requisitos para obtenção do
Grau de Mestre na Área de
Microbiologia Molecular de
Procariotos

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Ana Paula Guedes Frazzon

Co-Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Sueli Van der Sand

Porto Alegre, RS, Brasil

Janeiro de 2011

AGRADECIMENTOS

À Deus, por todas as inúmeras bênçãos profissionais e pessoais e pela força e coragem que sempre me concedeu.

À minha família, pela paciência, carinho e apoio, durante todos os momentos dessa empreitada.

Ao meu namorado, Eduardo, pela compreensão e amor durante esse importante momento.

À minha orientadora Ana Paula Frazzon, pela dedicação, paciência, pelas palavras de carinho nos momentos difíceis, pelas inúmeras lições sobre biologia molecular e, principalmente, por ter acreditado em minha capacidade.

À minha co-orientadora, Sueli Van der Sand, por ter me dado a chance de iniciar como IC em seu laboratório, por me acolher como orientada quando foi necessário, pelas respostas às perguntas urgentes, e por toda a paciência e carinho comigo e com toda a sua grande prole de orientadas.

Ao professor Pedro d'Azevedo, pela concessão de parte das amostras que permitiram a realização deste trabalho.

Às meninas do lab 164, pelas brincadeiras e pelo bom-humor, que tornaram a jornada de bancada de laboratório muito mais divertida e menos cansativa.

À minha querida IC, Rebeca Inhoque, pelo auxílio em todos os momentos, pela amizade e pela dedicação.

À todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a concretização desta etapa de minha vida.

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*

Autor: Aline Weber de Medeiros¹

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Guedes Frazzon

Co-Orientadora: Profa. Dra. Sueli Van Der Sand

RESUMO

O papel dualístico exercido por *Enterococcus* na natureza estimula a pesquisa dos fatores que determinam sua virulência. O objetivo desse estudo foi investigar a distribuição de genes envolvidos com fatores de virulência entre isolados de *Enterococcus* e sua correlação com a capacidade de formação de biofilme e confirmar a identificação de *E. casseliflavus* e *E. gallinarum* por PCR-RFLP. Foram analisados 66 isolados clínicos e 70 alimentares quanto a presença dos genes *gelE*, *esp*, *agg*, *ace* e *cylA* por PCR e atividade de gelatinase e citolisina. Isolados clínicos apresentaram maior incidência de fatores de virulência quando comparados com alimentares, exceto para os genes *gelE* e *ace*. Em ambas amostragens houve a ocorrência de isolados positivos para os genes *gelE* e *cylA*, porém sem atividade enzimática, indicando a presença de genes silenciosos. A maioria dos isolados apresentou capacidade de formação de biofilme, entretanto não houve uma correlação entre os genes analisados e o fenótipo de formação de biofilme, porém é possível que o gene *ace* e *gelE* atuem como potencializadores na formação de biofilmes em *Enterococcus*. Para testar a técnica de PCR-RFLP, 32 e 20 isolados de *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*, respectivamente, identificados bioquimicamente foram avaliados. O fragmento de 661 bp correspondente a uma região conservada do 16S rDNA foi clivado com *HinfI* e 47% *E. gallinarum* e 25% *E. casseliflavus* apresentaram fragmentos de 589bp e 72bp, padrão esperado para o PCR-RFLP. Assim sendo, a PCR-RFLP mostrou ser uma ferramenta molecular útil na confirmação das espécies *E. casseliflavus* e *E. gallinarum*.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Microbiologia de Alimentos, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (113 p.) Janeiro, 2011.

Investigation of virulence factors and the ability of biofilm formation *in vitro* of clinical and food isolates of *Enterococcus* sp. and use of PCR-RFLP to identify *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus*

Author: Aline Weber de Medeiros¹

Supervisor: Profa. Dra. Ana Paula Guedes Frazzon

Co-Supervisor: Profa. Dra. Sueli Van Der Sand

ABSTRACT

The dualistic role played by enterococci in the nature, encourages the study of virulence factors. The aim of this study was to investigate the distribution of genes involved in virulence among *Enterococcus* isolates and to correlate with biofilm formation ability and to confirm the identification of *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus* isolated from clinical and food samples by PCR-RFLP. Sixty six clinical and 70 food isolates were analyzed for the presence of *gelE*, *esp*, *agg*, *ace* and *cylA* genes by PCR and the gelatinase and cytolysin activities. Clinical isolates showed a higher incidence of virulence factors when compared to food isolates, except for *gelE* and *ace* genes. In both samples was observed the occurrence of isolates positive for *gelE* and *cylA* genes, but with no enzymatic activities, indicating the presence of silent genes. Most isolates showed ability to form biofilm, although there was no correlation between the presence of the genes and the phenotype of biofilm formation, but it is possible that *ace* and *gelE* genes perform as enhancers in biofilm formation in *Enterococcus*. To test the PCR-RFLP technique, 32 and 20 strains identified by conventional biochemical exams as *E. casseliflavus* and *E. gallinarum*, respectively, were submitted to PCR amplification and digested with *HinfI*. The DNA fragment of 661 bp corresponding to a conserved region of 16S rDNA was cleaved with *HinfI* and 47% and 25% of *E. gallinarum* and *E. casseliflavus* showed DNA fragments of 589 bp and 72 bp, expected for PCR-RFLP. Thus, PCR-RFLP proved to be a useful molecular tool for confirmation the *E. casseliflavus* and *E. gallinarum* species

¹Master of Science dissertation in Agricultural Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (113 p.) January, 2011

SUMÁRIO

RELAÇÃO DE TABELAS.....	VI
RELAÇÃO DE FIGURAS.....	VII
RELAÇÃO DE QUADROS.....	VIII
RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	IX
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Objetivo.....	3
1.1.1. Objetivo Geral.....	3
1.1.2. Objetivos Específicos.....	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1. <i>Enterococcus</i>	5
2.2. Importância dos <i>Enterococcus</i> nos Alimentos.....	6
2.3. Importância clínica dos <i>Enterococcus</i>	9
2.4. Identificação de <i>Enterococcus</i>	10
2.5. Resistência Antimicrobiana.....	11
2.6. Fatores de virulência.....	13
2.6.1. Gelatinase.....	16
2.6.2. Proteína de superfície de <i>Enterococcus</i>	18
2.6.3. Substância de agregação.....	20
2.6.4. Adesina de colágeno de <i>E. faecalis</i>	21
2.6.5. Citolisina.....	23
2.7. Formação de Biofilme.....	26
2.7.1. Etapas de formação de biofilme.....	27
2.7.2. Formação de biofilme por <i>Enterococcus</i>	29
2.7.3. Determinantes genéticos envolvidos na formação de biofilme por <i>Enterococcus</i>	31
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1. Amostras.....	34
3.2. Análise genotípica da presença de fatores de virulência.....	35
3.3. Detecção da produção da enzima gelatinase.....	37
3.4. Detecção da enzima citolisina.....	38
3.5. Verificação da variação do gene <i>esp</i> por PCR-RFLP.....	38
3.6. Avaliação da capacidade de formação de Biofilme.....	39
3.6.1. Etapa 1.....	39
3.6.2. Etapa 2.....	40

3.6.3.	Etapa 3.....	40
3.6.4.	Classificação das amostras.....	40
3.7.	Verificação da variação do gene 16S rDNA entre diferentes espécies de <i>Enterococcus</i>	42
4.	RESULTADOS.....	43
4.1.	Distribuição dos fatores de virulência entre os isolados clínicos e alimentares.....	43
4.2.	Presença dos gene <i>gelE</i> e operon <i>fsr</i> e atividade da enzima gelatinase.....	47
4.3.	Presença do gene <i>cylA</i> e atividade da enzima citolisina.....	48
4.4.	Polimorfismo do gene <i>esp</i>	49
4.5.	Capacidade de formação de biofilme.....	50
4.6.	Relação entre formação de biofilme <i>in vitro</i> , atividade gelatinolítica e genes de virulência.....	53
4.7.	Verificação da variação do gene 16S rDNA entre as espécies de <i>Enterococcus gallinarum</i> e <i>E. casseliflavus</i> provenientes de amostras clínicas e alimentares.....	55
5.	DISCUSSÃO.....	57
5.1.	Distribuição dos genes de virulência.....	57
5.2.	Relação fenótipo e genótipo gelatinase entre isolados clínicos e alimentares de <i>Enterococcus</i>	63
5.3.	Relação fenótipo e genótipo citolisina entre isolados clínicos e alimentares de <i>Enterococcus</i>	66
5.4.	Capacidade de formação de biofilme <i>in vitro</i> entre isolados clínicos e alimentares de <i>Enterococcus</i>	68
5.5.	Relação entre genes de virulência e capacidade de formação de <i>in vitro</i> dos isolados de <i>Enterococcus</i>	71
5.6.	Confirmação das espécies <i>E. gallinarum</i> e <i>E. casseliflavus</i> por PCR-RFLP do gene 16S rDNA.....	74
6.	CONCLUSÕES.....	77
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
8.	APÊNDICES.....	92

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores e temperaturas de anelamento utilizadas para detectar os genes de virulência.....	37
Tabela 2. Incidência dos genes de virulência em <i>Enterococcus</i>	46
Tabela 3. Relação entre a presença do gene <i>gelE</i> e atividade gelatinolítica entre isolados alimentares e clínicos de <i>Enterococcus</i>	47
Tabela 4. Relação entre presença do gene <i>cylA</i> e atividade hemolítica (citolisina) entre isolados alimentares e clínicos de <i>Enterococcus</i>	49
Tabela 5. Capacidade de formação de biofilme <i>in vitro</i> em isolados de <i>Enterococcus</i>	52

RELAÇÃO DE FIGURAS

FIGURA 1: Representação esquemática dos genes relacionados com a produção da enzima gelatinase.....	18
FIGURA 2: Representação esquemática do gene <i>esp</i>	19
FIGURA 3: (A) Representação esquemática do gene <i>Ace</i> (B) Representação das variações no domínio B.....	22
FIGURA 4: Modelo de expressão de citolisina em <i>E. faecalis</i>	25
FIGURA 5: Etapas de formação de biofilmes.....	29
FIGURA 6: (A) Fragmentos do gene <i>esp</i> obtidos por PCR demonstrando diferentes padrões de bandas entre os isolados. (B) Fragmentos de DNA obtidos após a digestão do produto de PCR do gene <i>esp</i> com a endonuclease de restrição <i>HindIII</i>	50
FIGURA 7: Fragmentos de DNA obtidos após a digestão do produto de 661 pb amplificado do gene 16S rDNA por PCR e submetido a digestão com a endonuclease de restrição <i>Hinfl</i>	56

RELAÇÃO DE QUADROS

Quadro 1: Origem e espécie dos isolados de <i>Enterococcus</i> utilizados no estudo.....	92
Quadro 2: Origem, espécie, presença dos <i>gelE</i> , <i>esp</i> , <i>agg</i> , <i>ace</i> , <i>cylA</i> , atividade gelatinolítica e citolítica e capacidade de formação de biofilme <i>in vitro</i> dos isolados de <i>Enterococcus</i> provenientes de alimentos.....	93
Quadro 3: Origem, espécie, presença dos <i>gelE</i> , <i>esp</i> , <i>agg</i> , <i>ace</i> , <i>cylA</i> , atividade gelatinolítica e citolítica e capacidade de formação de biofilme <i>in vitro</i> dos isolados de <i>Enterococcus</i> provenientes de amostras clínicas.....	97

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µg/mL: microgramas por mililitro
µg: microgramas
µL: microlitro
µM: micromolar
ACE: adesina de colágeno
Agg: substância de agregação
ATCC: American Type Culture Collection
BHI: Infusão de cérebro-coração
CyIA: enzima citolisina
DO: Densidade óptica
EPS: exopolissacarídeos
ESP: Proteína de superfície de *Enterococcus*
GeIE: enzima gelatinase
ICBS: Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Kb: quilo base
LAB: bactérias ácido-láticas
mg: miligramas
mL: mililitro
mM: milimolar
NaCl: cloreto de sódio
°C: graus Celsius
pb: pares de base
PBS: tampão fosfato salino
PC: ponto de corte
PCR: reação em cadeia da polimerase
pH: logaritmo decimal do inverso da atividade de íons hidrogênio em uma solução
RNA: ácido ribonucléico
rpm: rotações por minuto
rRNA: ácido ribonucléico ribossomal
RS: Rio Grande do Sul
TAE: Tris-Ácido Acético-EDTA
TSB: caldo triptose de soja
U: unidade
UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

1. INTRODUÇÃO

Enterococcus constituem um complexo grupo de bactérias, que desempenham papel ambíguo em alimentos, enquanto algumas linhagens são utilizadas como culturas *starter* em queijos e alimentos enlatados, conferindo sabor, odor e textura a esses produtos, outras cepas estão relacionadas com a deterioração de alimentos. Além disso, este gênero desempenha um papel importante no âmbito clínico: embora sejam comensais humanos. Desde a década de 80, este gênero vem se tornando uma grande preocupação por sua crescente relação com infecções hospitalares e surgimento de isolados multirresistentes. Esses microrganismos são caracterizados pela sua grande capacidade em adquirir determinantes de virulência e resistência devido aos seus diferentes mecanismos de transferência de DNA.

Entre os determinantes mais amplamente encontrados em *Enterococcus* estão: GelE, enzima capaz de degradar gelatina, caseína e colágeno; Agg, substância de agregação de *Enterococcus* que tem sido relacionada com aumento de virulência; Esp, proteína expressa na superfície das células enterocóccicas; Ace, adesina que tem sido relacionada com ligação ao colágeno e dentina e CylA, enzima com atividades hemolítica e bacteriocida que parece auxiliar na evasão dos microrganismos ao sistema imune.

O papel ambíguo dos *Enterococcus* associado a sua capacidade de transferência de determinantes de virulência e resistência levantam o

questionamento sobre o risco da utilização desses microrganismos em alimentos. A patogênese desses microrganismos ainda não foi totalmente elucidada, acredita-se que fatores de virulência, como *gelE*, *esp*, *cylA* podem aumentar a capacidade desses microrganismos causar infecção, facilitando a adesão e colonização ao hospedeiro. No âmbito clínico o aumento das infecções por *Enterococcus*, especialmente hospitalares, associados com o aparecimento e proliferação de isolados multirresistentes requer uma cuidadosa análise dos mecanismos envolvidos com o início e proliferação de uma infecção por *Enterococcus*. Existem poucos estudos que comparam a frequência dos fatores de virulência entre isolados alimentares e clínicos de *Enterococcus*, assim sendo o presente estudo buscou investigar esta distribuição e sua correlação com a capacidade de formação de biofilme *in vitro*.

Os métodos convencionais para a identificação de *Enterococcus* são baseados principalmente em características fisiológicas, os quais muitas vezes não são confiáveis ou suficientes para a identificação. *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* são espécies difíceis de diferenciar dos demais *Enterococcus*, particularmente *E. faecium*. Entretanto, essa identificação é de grande importância já que *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* apresentam resistência intrínseca à vancomicina, conferida pelo gene *vanC-1*. Em virtude disso, este estudo buscou testar um protocolo de PCR-RFLP para confirmar a identificação de *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo Geral

Investigar a distribuição dos genes envolvidos com os fatores de virulência em isolados alimentares e clínicos de *Enterococcus*, analisar a capacidade de formação de biofilme desses isolados e correlacionar com os determinantes de virulência. Desenvolver um protocolo utilizando a técnica de PCR-RFLP para confirmar a identificação das espécies *E. casseliflavus* e *E. gallinarum*.

1.1.2. Objetivos Específicos

- Detecção por PCR dos seguintes genes de virulência:
 - *cylA* expressão da enzima citolisina (hemolisina);
 - *agg* expressão da proteína de agregação;
 - *esp* expressão da proteína de superfície extracelular;
 - *gelE* expressão da enzima gelatinase;
 - *ace* expressão da proteína de adesão do colágeno.
- Detecção de variações quanto à presença destes genes de fatores de virulência entre as amostras;
- Correlação entre a presença dos genes *gelE* e *cylA* com suas expressões *in vitro*;

- Verificar a existência de variações genotípica no gene *esp* por PCR-RFLP;

- Analisar a capacidade de formação de biofilme *in vitro* entre os isolados alimentares e clínicos *Enterococcus*.

- Correlação entre os determinantes de virulência e o fenótipo de formação de biofilme dos isolados.

- Análise genotípica na região 16S rDNA através da técnica de PCR-RFLP para confirmar a identificação das espécies de *E. casseliflavus* e *E. gallinarum*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Enterococcus*

Enterococcus constituem um diverso, complexo e importante grupo de bactérias que estão amplamente distribuídos no ambiente, sendo comumente encontrados no trato gastrointestinal de humanos e animais, solo, água e alimentos. Embora algumas linhagens sejam utilizadas na manufatura de alimentos, outros isolados de *Enterococcus* podem causar infecções em humanos e animais (Giraffa, 2002).

Inicialmente, este gênero foi classificado como streptococos do grupo D segundo classificação de Lancefield. Entretanto em 1984, através de estudos de hibridização de DNA-DNA e DNA-rRNA realizados por Schleifer e Kilpper-Bälz foi demonstrado que este gênero possuía um perfil genotípico distante de *Streptococcus*, sendo então criado o gênero *Enterococcus*, e desde então, cerca de 40 espécies foram propostas para inclusão no gênero (Murray, 1990; Ogier & Serror, 2008, Euzéby, 2010).

Microscopicamente, *Enterococcus* são cocos Gram-positivos que se dispõem em pares ou cadeias curtas, não formadores de esporos. Pertencem ao grupo de organismos conhecidos como bactérias ácido lácticas (BAL) produtoras de bacteriocinas. Não possuem enzima citocromo, e embora sejam catalase negativos, podem produzir pseudo-catalase com uma fraca efervescência durante o teste (Murray, 1990; Fisher & Phillips, 2009).

Enterococcus toleram condições ambientais adversas, como uma ampla faixa de temperatura (entre 5°C e 50°C), altas concentrações de NaCl (6,5%), variações de pH (4,6 a 9,9), além de serem resistentes a presença de sais biliares (40%). Tais características aliadas à capacidade de adquirir uma grande variedade de genes de resistência aos antimicrobianos tem contribuído para a distribuição desses microrganismos nas infecções nosocomiais, tornando-os um desafio na área clínica (Murray, 1990; Fisher & Phillips, 2009).

As espécies *E. faecalis* e *E. faecium* são comumente encontradas no trato gastrointestinal de humanos e animais, enquanto *E. munditii* e *E. casseliflavus* são mais frequentes em plantas e vegetais e ambos apresentam colônias pigmentadas. Outras espécies também podem ser isoladas em alimentos como *E. durans*, *E. avium* e *E. raffinosus*. No âmbito clínico, *E. faecalis* é a espécie dominante, o que pode estar relacionado aos fatores de virulência associados a esta espécie (Klein, 2003; Fischer & Phillips, 2009).

2.2. Importância dos *Enterococcus* nos alimentos

Enterococcus estão distribuídos em grande número nos alimentos, principalmente nos produtos fermentados e de origem animal. *Enterococcus* podem ter uma função benéfica na produção de vários produtos fermentados e são utilizados principalmente em países europeus, conferindo características organolépticas únicas aos produtos como o queijo, salames e salsichas. Esses microrganismos também podem produzir bacteriocinas antilisteriais, sugerindo

um possível uso como culturas *starter* adjuvantes, no fornecimento de segurança aos alimentos. (Giraffa *et al.*, 2002; Franz *et al.*, 2003).

Entretanto, o gênero *Enterococcus* também está associado com a deterioração de alimentos, principalmente carnes. A presença de *Enterococcus* no trato gastrointestinal de animais pode torná-lo um potencial contaminante da carne durante o abate. Como essas bactérias são as mais termotolerantes, dentre as bactérias não formadoras de esporos, elas podem causar problemas de deterioração de carnes cozidas e processadas (Franz *et al.*, 1999). *Enterococcus* já foram isolados de carne bovina, suína e de frango (Klein *et al.*, 1998). Estudos têm indicado uma incidência de *Enterococcus* em produtos cárneos que pode alcançar até 100% (Hayes *et al.*, 2003; MacGowan *et al.*, 2006; Vindigni *et al.*, 2007). Em estudo realizado no Brasil em 2008, a prevalência de *Enterococcus* foi de 60% em produtos à base de carne, onde *E. faecium* foi a espécie mais comumente isolada, seguindo o padrão mundial (Gomes *et al.*, 2008).

O isolamento de *Enterococcus* em produtos lácteos é altamente controverso, embora sua incidência nesses produtos seja considerada resultado de condições higiênicas inadequadas durante a produção e processamento do leite, muitas vezes não está relacionada diretamente com contaminação fecal. *Enterococcus* podem contaminar o leite diretamente através de fezes humanas e de animais, assim como a contaminação pode ocorrer através de fontes externas como água, aparelhos de processamento e tanques de estocagem. Como são microrganismos tolerantes às condições ambientais, podem crescer e aumentar em número de células durante a o

período de refrigeração do leite e sobreviver após a pasteurização (Franz *et al.*, 1999; Giraffa, 2003; Ogier *et al.*, 2008). Por outro lado, esses microrganismos podem ter uma influência positiva em alguns tipos de queijos, conferindo características únicas de sabor e odor (Giraffa, 2003). No Brasil, a prevalência de *Enterococcus* em queijos foi demonstrada por Gomes *et al.* (2008) como sendo de 83,3%, com predominância de *E. faecium*. Fracalanza *et al.* (2007) após a análise de carne e leite pasteurizado no estado de Rio de Janeiro, demonstraram a incidência de *Enterococcus* de 56,8% em carnes e 43,2% no leite e estabeleceram a dominância de *E. faecalis* sob as demais espécies, 50,9% em carnes, seguido por *E. casseliflavus* (26,3%), no leite pasteurizado 77,9% das espécies encontradas foram *E. faecalis* seguido por *E. durans* (12,6%) Riboldi *et al.* (2009) estabeleceram *E. faecalis* como mais prevalente entre os isolados de *Enterococcus* provenientes de alimentos obtidos no sul do Brasil, entretanto entre as amostras de vegetais *E. faecium* foi a espécie predominante.

Enterococcus também apresentam um potencial uso como probióticos, porém essa aplicação permanece controversa. Embora os benefícios probióticos de algumas linhagens estejam bem estabelecidos, o surgimento de linhagens de *Enterococcus* resistentes aos antibióticos e o aumento da associação de *Enterococcus* com doenças em humanos tem suscitado preocupações quanto ao seu uso como probiótico, pois estudos tem demonstrado que genes de resistência ou os que codificam os fatores de virulência presentes nas linhagem alimentares podem ser transferidos para

linhagens presentes no trato gastrointestinal (Franz *et al.*, 2003, Foulquié-Moreno *et al.*, 2006).

Seu papel dualístico suscita a preocupação sobre seu uso como probióticos ou culturas *starter* em alimentos industrializados (Franz *et al.*, 2003).

2.3. Importância clínica dos *Enterococcus*

Enterococcus são comensais humanos adaptados a ambientes como a cavidade oral, genital e trato gastrointestinal, que se caracterizam por serem ambientes ricos em nutrientes, com depleção de oxigênio e ecologicamente complexos (Jett *et al.*, 1994). Por pertecerem a microbiota humana, as infecções causadas por *Enterococcus* eram consideradas de origem endógena, porém estudos demonstraram que a maioria das infecções parece ser adquirida exógenamente (Kayser, 2003). Entre as décadas de 70 e 80, o gênero *Enterococcus* foi estabelecido como o maior patógeno nosocomial (Jett *et al.*, 1994).

Enterococcus estão frequentemente associados a uma grande variedade de infecções humanas, como infecções do trato urinário, circulação sanguínea, endocárdio, trato biliar, queimaduras e dispositivos como cateteres intravasculares. Porém menos frequentemente são relacionados com infecções do sistema nervoso central, infecções pulmonares, infecções do tecido periodontal, entre outras (Jett *et al.*, 1994; Paradella *et al.*, 2007). De um modo geral *Enterococcus* causam maiores infecções em pacientes internados e

principalmente naqueles que estão sob uso de terapia antibiótica durante algum tempo (Bender *et al.*, 2010).

Infecções urinárias são as mais frequentes fontes de *Enterococcus*, a maioria das infecções está associada com cateterização ou instrumentação (Kayser, 2003). Estudos demonstram que cerca de 70% das infecções causadas por *Enterococcus* tratam-se de infecções do trato urinário. Dentre as espécies mais prevalentes está *E. faecalis*, responsável por mais de 90% das infecções seguido por *E. faecium*, a diferença na prevalência entre estas duas espécies pode estar relacionada ao elevado potencial de virulência de *E. faecalis* em relação a *E. faecium* (d'Azevedo *et al.* 2004; Hörner *et al.*, 2005; d'Azevedo *et al.*, 2006; Bender *et al.*, 2010).

Em bacteremias nosocomiais, o gênero *Enterococcus* está envolvido em cerca de 6 a 7% dos casos e a porta de entrada para este microrganismo inclui o trato urinário, infecções intra-abdominais, queimaduras, infecções relacionadas a diabetes ou cateteres intravasculares (Kayser, 2003).

2.4. Identificação de *Enterococcus*.

A diferenciação de espécies dentro do gênero *Enterococcus* pode ser complexa em alguns casos, já que os métodos convencionais de identificação são baseados em características fenotípicas, utilizando provas de fermentação de açúcares como manitol, sorbitol, arabinose e rafinose (Klein, 2003). *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* são espécies de difícil identificação por

métodos tradicionais, principalmente sua diferenciação de *E. faecium*; essa diferenciação representa uma dificuldade em laboratórios clínicos, já que esses microrganismos podem apresentar características fenotípicas similares, além disso, sistemas bioquímicos comerciais muitas vezes não incluem *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* em seus bancos de dados (Patel et al. 1998; Facklam et al., 2002). Sendo assim estudos utilizando 16S e 23S rRNA podem ser úteis na diferenciação desses microrganismos (Patel et al., 1998; Klein, 2003). Técnicas de genética molecular são ferramentas de análise mais seguras e tem sido usadas com sucesso na identificação de espécies de *Enterococcus*. O gene 16S rRNA tem sido útil na identificação de gênero e espécie de *Enterococcus* (Fortina et al., 2007).

A rápida e segura diferenciação das espécies *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* das demais espécies do gênero *Enterococcus* é bastante importante para programas de controle a infecção, uma vez que estas duas espécies exibem resistência intrínseca a baixos níveis de vancomicina, conferida pelo gene *vanC-1* (Patel, 2003).

2.5. Resistência Antimicrobiana

O gênero *Enterococcus* tem sua relevância clínica baseada não somente na sua crescente prevalência nas últimas décadas, mas também no elevado índice de linhagens resistentes aos antibióticos. Essa característica reforça sua persistência em ambientes hospitalares, já que o uso de antibióticos em tais ambientes suprime microrganismos susceptíveis

fornecendo uma vantagem seletiva para as bactérias resistentes (Murray, 1990).

Enterococcus são intrinsicamente resistentes a penicilinas semisintéticas, cefalosporinas, baixos níveis de aminoglicosídeos e clindamicina, além disso, também possuem a capacidade de aquisição de genes de resistência, o que pode ocorrer por conjugação ou mutações no DNA apresentando resistência adquirida à antibióticos como cloranfenicol, eritromicina, altos níveis de clindamicina e aminoglicosídeos, tetraciclina, fluorquinolonas e vancomicina (Murray, 1990; Kayser, 2003).

A resistência de *Enterococcus* aos antibióticos tem sido uma crescente preocupação nos últimos anos. Resistência a penicilina-ampicilina, aminoglicosídeos e glicopeptídeos tem sido reportada em um número crescente de linhagens, o que limita as possibilidades terapêuticas (Leclercq, 2009). Estudos relatam que a falha terapêutica aumenta em 20% e a mortalidade em 25%, quando comparamos infecções causadas por *Enterococcus* sensíveis aos glicopeptídeos aos resistentes (Fisher *et al.*, 2009).

Estudos realizados no Brasil, também apontam uma crescente incidência de *Enterococcus* resistentes aos antibióticos (d'Azevedo *et al.*, 2004; Hörner *et al.*, 2005; Titze-de-Almeida *et al.*, 2004). Bender *et al.* (2010) demonstraram elevadas prevalências de *Enterococcus* resistentes à eritromicina (62,1%), tetraciclina (64,5%), e moderadas à rifampicina, cloranfenicol e ciprofloxacina em dois hospitais de Porto Alegre – RS, Brasil. Furtado *et al.* (2005) avaliaram a incidência de *Enterococcus* resistentes a

vancomicina em um hospital universitário de São Paulo – SP, Brasil, durante o período de 3 anos, em 2000 a incidência de resistência a vancomicina foi de 9,5%, aumentando para 14,7% em 2001 e 15,8% em 2002. Altos índices de resistência também tem sido evidenciados em alimentos, o que justifica a preocupação de que *Enterococcus* de origem alimentar possam ser reservatórios de genes de resistência (Fracallanza et al., 2007; Valenzuela et al., 2009; Riboldi et al., 2009, Frazzon et al., 2010). Riboldi et al. (2009) ao analisarem alimentos *in natura* e produtos lácteos obtidos em Porto Alegre-RS, Brasil, observaram que todos os *Enterococcus* apresentaram resistência a pelo menos um dos antibióticos testados, com alta frequência de resistência a antimicrobianos usados na agricultura como bacitracina e lincomicina, também foi encontrada incidência de resistência a nitrofurantoína, antimicrobiano usado no tratamento de infecções genitourinárias, em isolados de queijo e repolho. Recentemente, Frazzon et al. (2010), demonstraram uma alta prevalência de resistência à tetraciclina e eritromicina em *Enterococcus* isolados de carne de frango, também foi observada a resistência à ampicilina (antimicrobiano utilizado no tratamento de infecções enterocócicas) em *Enterococcus* isolados de vários tipos de alimentos. No mesmo estudo, 64% dos isolados de *E. faecalis*, 55% de *E. faecium*, 66% de *E. casseliflavus* e 42% de *E. gallinarum* foram considerados multiresistentes (resistência a pelo menos dois antimicrobianos).

2.6. Fatores de virulência

Fatores de virulência são determinantes que permitem a uma bactéria colonizar, invadir, evitar o sistema de defesa e causar dano tecidual ao hospedeiro (Mannu *et al.*, 2003; Foulquiè-Moreno *et al.*, 2006). Para *Enterococcus* atuarem como patógenos oportunistas é necessário que ocorra a adesão aos tecidos hospedeiros. Durante a invasão tecidual, esses microrganismos encontram um ambiente diferente do sítio de infecção, com alto potencial redox, escassez de nutrientes essenciais, leucócitos fagocitários e outros mecanismos de defesa do hospedeiro. *Enterococcus* provavelmente expressam genes que favorecem o crescimento sob essas condições variáveis. Nos últimos anos tem sido demonstrado que *Enterococcus* expressam fatores que permitem a adesão às células hospedeiras e matriz celular, facilitam a invasão tecidual, afetam a imunomodulação e causam danos mediados por toxinas (Jett *et al.*, 1994).

Vários fatores de virulência já foram descritos em *Enterococcus*, dentre eles estão: *gelE*, que codifica uma metaloendopeptidase extracelular capaz de hidrolisar gelatina, caseína e colágeno (Koch *et al.*, 2004); *esp*, responsável por uma proteína de superfície que acredita-se contribuir para a colonização e persistência no hospedeiro (Shankar *et al.*, 2001); *agg*, codificada uma proteína que promove a formação de agregados celulares e pode aumentar a adesão celular (Jett *et al.*, 1994); *ace*, codifica uma adesina de colágeno que acredita-se mediar a ligação de *Enterococcus* ao colágeno e dentina (Nallaparedy *et al.*, 2000) e *cylA*, responsável pela citolisina, enzima

com atividades hemolítica e de bacteriocina contra células eucarióticas e procarióticas (Semedo *et al.*, 2003).

Entre as espécies de *Enterococcus*, *E. faecalis* apresentam maior incidência de fatores de virulência se comparado com as demais, possuindo múltiplos determinantes de virulência, o que reforça a evidência da função na patogenicidade (Eaton & Gasson, 2001; Abriouel *et al.*, 2008, Cariolato *et al.*, 2008). Cariolato *et al.* (2008), observaram que apenas 10,4% dos isolados de alimentos e amostras clínicas de *E. faecium* apresentavam um ou mais determinantes de virulência, enquanto 78,7% dos isolados de *E. faecalis* de mesma origem apresentam múltiplos determinantes.

Dupont *et al.*, (2008) em estudo realizado em pacientes com peritoniaite demonstraram que 71,6% das linhagens de *Enterococcus* abrigavam pelo menos um dos fatores de virulência analisados; embora a presença desses fatores não ter sido correlacionadas com a mortalidade, houve uma associação entre os fatores de virulência e severidade da peritoniaite.

Genes de virulência podem facilmente ser transmitidos entre linhagens de *Enterococcus*, visto que esses microrganismos possuem muitos mecanismos de transferência genética. Esta afirmação cria grande preocupação sobre a segurança de *Enterococcus* em alimentos, já que culturas *starter* podem adquirir genes de virulência por conjugação natural. (Eaton & Gasson, 2001). Muitos fatores de virulência residem em plasmídeos conjugativos, que são facilmente disseminados entre linhagens em um

ambiente natural, como o trato gastrointestinal, podendo levar a transferência de determinantes de virulência de linhagens potencialmente patogênicas para a microbiota endógena (Jett *et al.*, 1994).

Embora a incidência de fatores de virulência seja maior em linhagens clínicas do que em linhagens alimentares ou *starters*, estudos têm demonstrando a ocorrência crescente destes fatores em isolados alimentares, o que dificulta o estabelecimento de linhagens potencialmente virulentas ou não virulentas. (Eaton & Gasson, 2001; Abriouel *et al.*, 2008). Cariolato *et al.*, (2008) demonstraram que linhagens de *Enterococcus* isoladas de alimentos podem abrigar genes relacionados a virulência em igual ou maior incidência do que amostras clínicas.

2.6.1. Gelatinase

Gelatinase (GelE) é uma metalo-endopeptidase extracelular codificada pelo gene *gelE*, cotranscrita com uma serina protease (SprE) e regulada por *quorum-sensing* pelo locus *fsrABC*. GelE pode hidrolisar gelatina, caseína, hemoglobina e outros peptídeos bioativos. Pode também clivar ferormônios sexuais, que são conhecidos como potentes quimioatrativos e podem, portanto modular a resposta do hospedeiro (Koch *et al.*, 2004).

Vários fatores podem influenciar a expressão da GelE: presença de genes silenciosos, baixos níveis ou *down regulation* da expressão gênica, além das condições de laboratório (Eaton & Gasson, 2001; Cariolato *et al.*, 2008). Lopes *et al.* (2006) demonstraram a perda de atividade gelatinolítica sob

condições de laboratório e correlacionaram essa perda com a perda de genes do operon *fsr*, porém também foram observados isolados em que todos os genes do operon *fsr* estavam presentes e não houve atividade enzimática, o mesmo foi demonstrado no estudo realizado por Macovei *et al.* (2008) onde alguns isolados de *Enterococcus* após períodos de estocagem sob baixas temperaturas (4-8°C) perdiam a capacidade de hidrolisar gelatina mesmo possuindo o gene *gelE* e todos os genes *fsr*, essa característica os levou a sugestão de que o gene *gelE* seja regulado pós-transcrição (Figura 1).

Acredita-se que a principal função da gelatinase na patogênese enterecócica seja o fornecimento de nutrientes para as bactérias a partir da degradação do tecido hospedeiro (Fisher *et al.*, 2009).

Estudos observaram que a presença da gelatinase não ocorre somente em amostras de origem clínica, mas também em amostras alimentares. Lopes *et al.*, (2006) determinaram a incidência de gelatinase em isolados de *Enterococcus* provenientes de queijos e leite, sugerindo que a capacidade desta enzima de degradar caseína é bastante importante em microrganismos isolados em produtos lácteos, que são ricos nessa proteína. Abriouel *et al.* (2008) demonstraram uma incidência de 76,5% do gene *gelE* entre isolados de *Enterococcus* provenientes de amostras de origem alimentar. Em estudo brasileiro realizado com alimentos de diversas origens Gomes *et al.* (2008) estabeleceram uma incidência da enzima gelatinolítica de 60% em *E. faecalis* enquanto não foi detectada atividade enzimática em *E. faecium*.

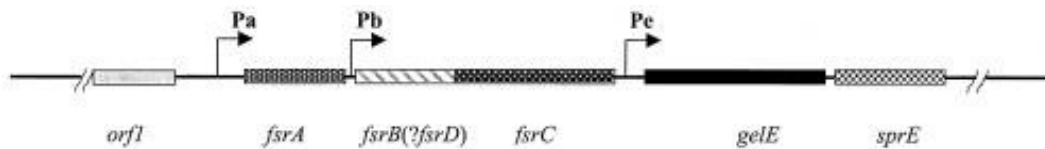


FIGURA 1: Representação esquemática dos genes relacionados com a produção da enzima gelatinase. (Qin *et al.*, 2001).

2.6.2. Proteína de superfície de *Enterococcus*

A proteína de superfície de *Enterococcus* (Esp) foi descrita por Shankar *et al.* em 1999, como uma proteína estruturalmente similar as proteínas de superfície celular Rib e C alfa do grupo B de estreptococos A proteína Esp apresenta 1,873 aminoácidos e sua massa molecular é de aproximadamente 202 kDa. O gene *esp*, que codifica a proteína Esp é caracterizado pelos blocos de repetição em sua região central. O primeiro bloco consiste de três repetições *in tandem* de 252 nucleotídeos (nt) e é denominado como bloco de repetição A, seguindo o bloco A existe uma região espaçadora de 207 nt entre os dois blocos de repetição denominada bloco de repetição B, adjacente a região B, está o bloco de repetição C que apresenta 1,722 nt consistindo de sete unidades de repetição *in tandem* de 246 nt (Figura 2). Os blocos A e C apresentam considerável variação em número dentre os isolados de *Enterococcus* devido aos eventos de recombinação homóloga nessas regiões (Shankar *et al.*, 1999)

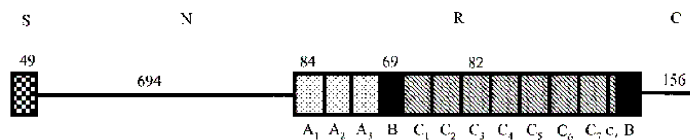


FIGURA 2: Representação esquemática do gene *esp* (Shankar *et al.* 1999). (S) região sinalizadora, (N) região N-terminal, (R) região de repetição, (C) região C-terminal. A numeração acima de cada região representa o número de aminoácidos de cada segmento. A, B e C referem-se aos blocos de repetição

A Esp tem sido demonstrada como fator de contribuição para a colonização e persistência de alguns isolados de *E. faecalis* durante infecções ascendentes do trato urinário (Koch *et al.*, 2004). O gene *esp* apresenta uma elevada incidência em amostras de origem clínica, sugerindo que este fator esteja ligado a potencialização da patogenicidade (Mannu *et al.*, 2003). Willems *et al.*, (2001) em estudo realizado com *E. faecium* resistentes à vancomicina isolados de ambientes hospitalares dos EUA, Reino Unido, Holanda e Austrália relataram a presença de um gene *esp* muito conservado entre os isolados analisados e ausente em todos os isolados de *E. faecium* não-epidêmicos e nos isolados de animais, o que os levou a acreditar que o gene *esp* esteja associado com disseminação intra-hospitalar e possivelmente aumento da virulência.

Abriouel *et al.*, (2008) observaram uma incidência de 87,2 % do gene *esp* entre isolados de *Enterococcus* de origem clínica e de 23,5% entre isolados provenientes de vegetais, água e solo, o que os levou a sugerir que a

proteína codificada tenha um importante papel na adesão tecidual, facilitando a prevalência de isolados potencialmente virulentos anexados ao tecido humano.

2.6.3. Substância de agregação

Substância de agregação (Agg) é uma proteína de superfície codificada por plasmídios e expressa em resposta a indução por ferormônios. A Agg converte a superfície da parede celular bacteriana, em uma superfície aderente para as células doadoras, causando agregação ou aglutinação e facilitando a transferência de plasmídios e adesão na matriz das células eucarióticas (Jett *et al.*, 1994; Koch *et al.*, 2004). Em células humanas a Agg parece mediar ligações específicas de *Enterococcus* ao epitélio intestinal, células epiteliais renais, neutrófilos humanos e macrófagos (Mundy *et al.*, 2000; Koch *et al.*, 2004).

Os plasmídios pAD1, pCF10, pD1, pAM373 foram descritos como codificadores de Agg em *Enterococcus*, e os genes relatados são *asa1*, *asc10*, *asa373*, e *ash701*, respectivamente (Camargo, 2005). A sequência de DNA do gene estrutural de Agg codificada pelo pAD1 revela a presença de duas sequências de aminoácidos Arg-Gly-Asp (RGD). Sübmutti *et al.*(2000) em estudo realizado com inibição por anticorpos monoclonais e peptídeos RGD demonstram que a aderência de *E. faecalis* em macrófagos era mediada por uma ligação entre o domínio RGD e uma integrina.

Schlievert *et al.* (1998) em modelo animal de endocardite causada por *E. faecalis* observaram que linhagens que apresentavam os fatores de virulência Agg e substância de ligação de *Enterococcus* (EBS) apresentavam-se mais virulentas se comparadas com linhagens livres desses fatores, reforçando a idéia de que Agg é importante no estabelecimento de infecções cardíacas.

Chow *et al.* (1993) notaram que animais inoculados com linhagens de *E. faecalis* produtores de substância de agregação apresentavam um aumento no número de microrganismos em válvulas cardíacas comparado com linhagens isogênicas Agg negativas (24h horas após a inoculação), enquanto o aumento da mortalidade foi observado em linhagens na quais genes para citolisina e Agg estavam presentes, sugerindo que a combinação desses dois fatores está associada com a mortalidade em endocardites.

2.6.4. Adesina de colágeno de *E. faecalis*

Adesina de colágeno de *E. faecalis* (Ace) é uma proteína de superfície celular específica de *E. faecalis* semelhante estruturalmente a adesina de colágeno (Cna) de *Staphylococcus aureus*. Ambas pertencem à subfamília de adesinas *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules* (MSCRAMM). Ace tem sido demonstrada por mediar a ligação da bactéria as proteínas da matriz extracelular, colágenos tipo I e IV e laminina e pode desempenhar um papel na patogênese de endocardites

(Nallapareddy *et al.*, 2000; Koch *et al.*, 2004). A sequência de aminoácidos de Ace revela uma região sinalizadora N-terminal, seguida pelo domínio A, que apresenta uma sequência de 335 aminoácidos altamente conservada. O domínio B é composto de unidades repetidas de 47 aminoácidos que variam em número, levando a variações no tamanho da proteína. A região C-terminal é composta de um domínio associado à parede celular rico em resíduos de prolina que contém uma sequência de aminoácidos consenso LPKTG, responsável pela ancoragem a parede celular e uma região transmembrana hidrofóbica de 18 aminoácidos (Figura 3). Assim como na proteína Cna de *S.aureus*, o domínio A parece ser o responsável pela ligação ao colágeno (Nallapareddy *et al.*, 2000). Lebreton *et al.* (2009) propuseram que a expressão do gene *ace* é negativamente controlada pelo regulador transcricional regulador de sobrevivência em *Enterococcus* (Ers) que foi identificado em *E. faecalis* pela homologia de sequência com PrfA, o maior regulador de genes de virulência em *Listeria monocytogenes*, e tem sido relacionadas com virulência em *E. faecalis* e sobrevivência ao estresse oxidativo e no interior de macrófagos de ratos.

Nallapareddy *et al.* (2000) através da análise da sequência de DNA do gene *ace* de *E. faecalis* isolados de pacientes de várias partes do mundo detectaram que o gene *ace* pode ser apresentado de quatro maneiras diferentes, devido a variações no número de unidades de repetição do domínio B.

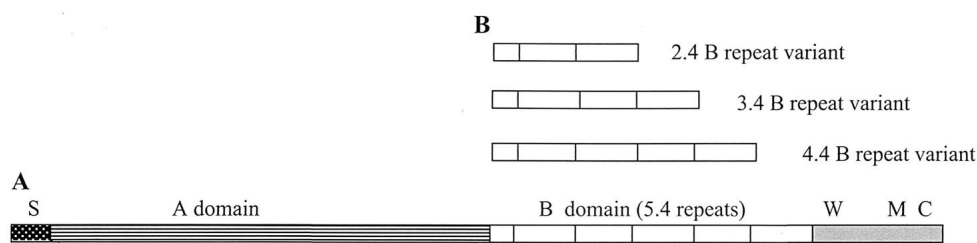


FIGURA 3: (A) Representação esquemática de Ace. (B) Representação das variações no domínio B (Nallapareddy *et al.*, 2000).

O estudo realizado por Hubble *et al.* (2003) sugeriu que Ace contribui para a adesão no canal radicular por ligação à dentina, já que esta é composta principalmente de colágeno. Mutantes para Ace de *E. faecalis* - apresentaram diminuição da capacidade de ligação à dentina quando comparados com células selvagens produtores de adesina de colágeno. Singh *et al.* (2010) confirmaram através de um modelo de endocardite animal que a deleção do gene *ace* resulta em uma significativa atenuação da capacidade de *E. faecalis* em colonizar válvulas aórticas e causar endocardite, desempenhando uma importante função nos estágios iniciais da colonização possivelmente por mediar a aderência de *E. faecalis* ao colágeno exposto no sítio de injúria vascular. Através da imunização de ratos usando o domínio de ligação ao colágeno de Ace também demonstraram que somente 35% dos ratos imunizados desenvolveram endocardite, comparado a 100% dos ratos não imunizados, inferindo que imunização ativa e passiva contra o domínio de ligação ao colágeno de Ace confere proteção contra endocardite.

A Ace também parece estar envolvida em infecções do trato urinário, em estudo realizado por Lebreton *et al* (2009) linhagens deficientes de Ace necessitavam $0.9 \log_{10}$ para causar infecção similar a causada pela linhagem selvagem.

2.6.5. Citolisina

O fator de virulência citolisina foi o primeiro estudado em *Enterococcus*. A citolisina é uma toxina bacteriana codificada por um *operon* que consiste de 8 genes que pode estar localizado em um plasmídio responsivo a ferormônios pAD1 ou no cromossomo bacteriano. Essa enzima apresenta atividade hemolítica e bactericida contra células eucarióticas e procarióticas, respectivamente, além de causar β -hemólise em certos eritrócitos (Mundy *et al.*, 2000; Shankar *et al.* 2002; Semedo *et al.*, 2003; Koch *et al.*, 2004). Os genes presentes no *operon* da citolsina são: *cy/R1*, *cy/R2*, *cy/L_L*, *cy/L_S*, *cy/M*, *cy/B*, *cy/A* e *cy/I*. Os genes *cy/L_L* e *cy/L_S* codificam a grande e as pequenas subunidades da citolisina, respectivamente, e juntos constituem o componente lítico, e *cy/A* codifica o componente ativador. Os genes estruturais (*cy/L_L* e *cy/L_S*) juntamente com *cy/M*, *cy/B*, *cy/A* e *cy/I* são co-transcritos como uma unidade e os genes regulatórios, *cy/R1* e *cy/R2* são transcritos em direção oposta como outra unidade. As subunidades estruturais, *CyL_L* e *CyL_S*, são modificadas pós-tradução por *CyIM*. Depois de modificadas as subunidades interagem com o produto do gene *cy/B*, que funciona como um transportador ABC e uma peptidase sinalizadora, atuando na translocação das subunidades

através da membrana celular e proteoliticamente remove de cada subunidade uma sequência líder. Depois de externalizadas uma nova sequência é removida da região N-terminal de cada subunidade por CylA (Figura 4).

O gene *cyl* confere autoproteção contra os efeitos bactericidas. A regulação da citolisina é dependente de CylR1 e CylR2 e acredita-se que seja regulada por *quorum-sensing* envolvendo CylL_S. Coburn *et al.* (2004) estabeleceram que a regulação da expressão da citolisina é responsiva a presença de células alvo. Na ausência de células alvo, CylL_S e CylL_L formam um complexo que bloqueia o mecanismo de autoindução de *quorum sensing*, porém quando as células alvo estão presentes CylL_L liga-se ao alvo permitindo que CylL_S acumule levando a indução da expressão de altos níveis de citolisina (Haas *et al.*, 2002; Coburn & Gilmore, 2003; Coburn *et al.*, 2004).

Acredita-se que a atividade hemolítica da citolisina influencie na patogênese através da inibição dos leucócitos e lise dos eritrócitos do hospedeiro com conseqüente liberação de ferro e nutrientes. A maior capacidade de obtenção de nutrientes é uma característica vantajosa às células citolíticas em relação a isolados não produtores da enzima (Coburn *et al.*, 2003). Abriouel *et al.* (2008) demonstraram uma maior incidência do gene *cylA* em amostras clínicas quando comparadas com amostras de vegetais e água.

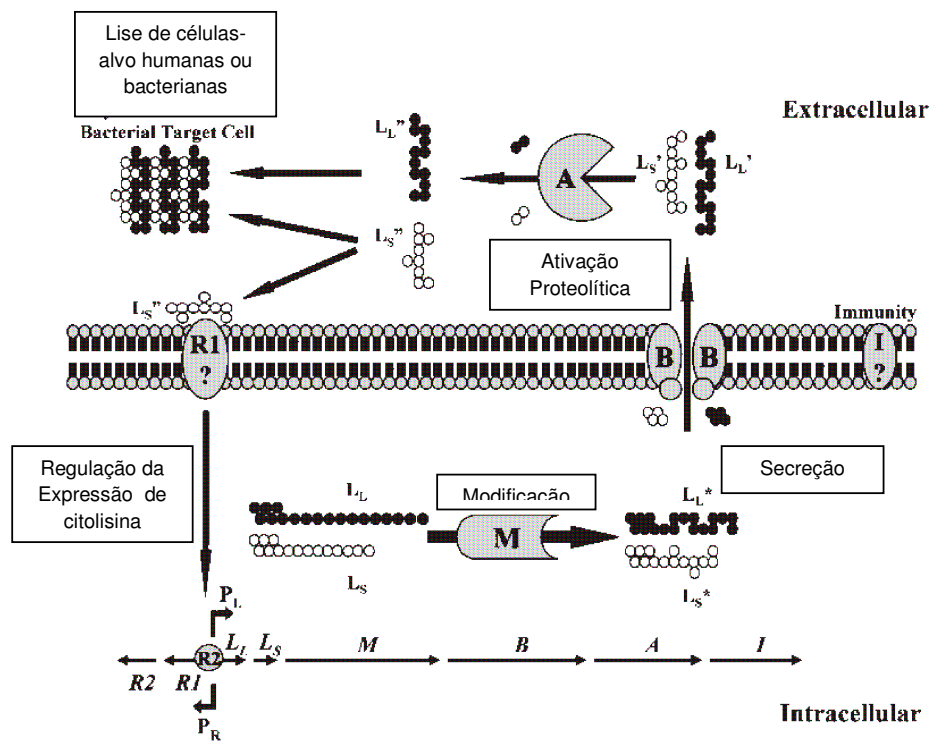


FIGURA 4: Modelo de expressão de citolisina em *E. faecalis*. (Coburn *et al.*, 2003).

Jett *et al.* (1992) em estudo realizado com modelo animal de endoftalmite demonstraram que a severidade das infecções causadas por *E. faecalis* citolítico era maior quando comparado com *E. faecalis* não-citolítico. Infecções causadas por *E. faecalis* citolíticos revelaram uma destruição quase total da estrutura da retina 24h pós-infecção enquanto *E. faecalis* não-citolíticos demonstraram pouca ou nenhuma destruição. Chow *et al.* (1993) sugeriram que a combinação da citolisina e substância de agregação estaria associada com o aumento da mortalidade em modelo animal de endocardite.

2.7. Formação de Biofilme

Biofilmes são grupos de células microbianas aderidas em uma superfície biótica ou abiótica. Um biofilme pode ser formado por uma única espécie bacteriana ou por várias espécies, fungos, algas e protozoários (O'Toole *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2006). Microrganismos presentes no biofilme tem como vantagem à alta concentração de nutrientes, facilidade de trocas genéticas, aumento da proteção contra células do sistema imune, além de maior capacidade de suportar deprivações de nutrientes, mudanças de pH e maiores concentrações de antibióticos graças a proteção exercida pelo exopolissacarídeo (EPS) (Singh *et al.*, 2006; Palmer *et al.*, 2007). Microrganismos associados ao biofilme também apresentam um nível de resistência 10 a 100 vezes maior à antibióticos do que células planctônicas (Mah & O'Toole), 2001; Mohamed *et al.*, 2007).

A formação de biofilme é uma característica importante sobre muitos aspectos. Na medicina o impacto da formação de biofilme é muito significativo, já que biofilmes podem ser formados em implantes médicos como cateteres, próteses ósseas, lentes de contato e válvulas cardíacas, requerendo muitas vezes a remoção do implante, aumentando, desse modo, o trauma ao paciente e o custo do tratamento (Mah *et al.*, 2001; Mohamed *et al.*, 2007). Biofilmes estão relacionados com infecções alimentares, a presença de microrganismos e o desenvolvimento de biofilmes em locais de processamento de alimentos tornam estes ambientes potenciais fontes de contaminação, adicionalmente,

biofilmes tem se mostrado menos susceptíveis a produtos de limpeza e sanitizantes (Dewanti *et al.*, 1995).

2.7.1. Etapas de formação de biofilme

De modo geral, a formação do biofilme inicia através de um processo de adesão e estabelecimento das células planctônicas à superfície, seguido pela maturação e finalmente o destaque de células. Diversos fatores podem interferir na formação de biofilme, como variações de pH, disponibilidade de nutrientes e oxigênio e concentração dos metabólitos bacterianos. *Quorum-sensing* é utilizado como mecanismo regulatório dentro do biofilme maduro, regulando a formação de canais e estruturas pilares que asseguram a eficiente entrada de nutrientes (Singh *et al.*, 2006).

Anteriormente à formação de biofilme, ocorre a formação do chamado filme condicionante, no qual células bacterianas juntamente com moléculas orgânicas e inorgânicas depositam-se na superfície, o que leva à uma alta concentração de nutrientes comparado com a fase fluída, favorecendo, desse modo, a formação do biofilme. (Kumar & Anand, 1998).

Após a formação do filme condicionante ocorre a anexação dos microrganismos à superfície, primeiramente com uma fraca interação entre as células bacterianas e o substrato, sendo essa fase referida como adesão reversível, já que os microrganismos ainda podem ser facilmente removidos.

Na fase irreversível de adesão, fibrilas poliméricas formam uma ponte entre as células bacterianas e o substrato levando a uma associação mais consistente (Kumar & Anand, 1998).

A etapa de adesão das células planctônicas é crucial para a formação do biofilme, porém o fator principal envolvido na etapa inicial de adesão permanece desconhecido, e atualmente acredita-se que vários fatores estejam envolvidos como as condições da superfície, transporte de massa, mudanças na superfície, hidrofobicidade, superfícies rugosas e micro topografia da superfície (Palmer *et al.*, 2007).

Após a adesão inicial, microcolônias desenvolvem-se formando um biofilme maduro que está associado com a formação de exopolissacárideo. Uma importante etapa no processo de maturação é a formação da arquitetura do biofilme, que se acredita ser controlada em resposta ao *quorum-sensing* (Figura 5) (Davey *et al.*, 2000).

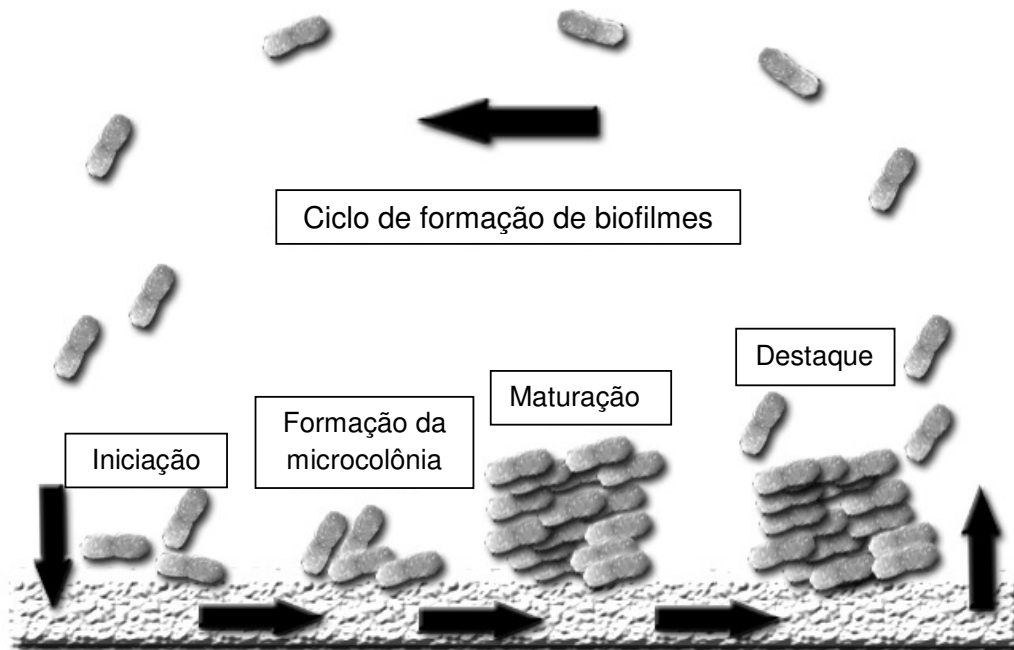


Figura 5: Etapas de formação de biofilmes disponível em: http://www.bilecen.org/?page_id=10

2.7.2. Formação de biofilme por *Enterococcus*

Estudos observaram que diferentes fatores podem influenciar a formação de biofilme em *Enterococcus*, além das condições que afetam de maneira geral a formação de biofilme entre uma diversidade de microrganismos, como pH, concentração de CO₂, temperatura, entre outros. Ainda não existe consenso sobre a influência da concentração de glicose na formação de biofilme por *Enterococcus*, porém alguns pesquisadores acreditam que a suplementação do meio com glicose aumenta a produção de biofilme por *Enterococcus*. Marinho (2010), demonstrou que a suplementação do meio de

cultura com 0,75% de glicose no meio aumentou a capacidade de formação de biofilme em *Enterococcus* obtidos a partir de alimentos, o que também foi observado por Baldassarri *et al.* (2001), onde a suplementação de TSB com 1% de glicose aumentou a formação de biofilme em *Enterococcus*.

Mudanças na força osmótica, soro humano e outras condições ambientais também podem afetar a formação de biofilme por *Enterococcus*: Kristich *et al.* (2004) observaram que a formação de biofilme por *E. faecalis* foi abolida pela exposição a meios com alta osmolaridade (3% de NaCl). Gallardo-Moreno *et al.* (2002) demonstraram que a suplementação do meio de cultura com 10% de soro humano aumentou a adesão de *E. faecalis*. Mohamed *et al.* (2004) demonstraram que *E. faecalis* isolados de endocardite produziam mais biofilme do que aqueles isolados de outras fontes.

Estudo realizado com *E. faecalis* de origem clínica isolados de hospitais de São Paulo e Ribeirão Preto - SP, Brasil demonstrou que todas as amostras foram capazes de formar biofilme o que levou a sugestão de que a aderência a células epiteliais hospedeiras com posterior formação de biofilme seja uma das principais propriedades de virulência (Furumura *et al.* 2006).

Sandoe *et al.* (2003) analisaram a capacidade de formação de biofilme de *Enterococcus* isolados a partir da corrente sanguínea relatando que todos os isolados de *E. faecalis* e 42% dos isolados de *E. faecium* foram capazes de formar biofilme. No mesmo estudo, também foi relatado que isolados de *E. faecalis* provenientes de infecções intravasculares relacionadas a cateter produziam mais biofilme do que *E. faecalis* isolados de outros tipos de

infecções, sugerindo que uma elevada habilidade para formar biofilme em polímeros biomédicos pode aumentar a capacidade dos *Enterococcus* de causar infecção.

2.7.3. Determinantes genéticos envolvidos na formação de biofilme por *Enterococcus*

Dados conflitantes têm sido publicados sobre a relação de vários determinantes genéticos e a capacidade de formação de biofilme. Um dos genes propostos como relacionado com a formação de biofilme é o gene *esp*. Toledo-Arana *et al.* (2001) relataram que capacidade de formar biofilmes em *E. faecalis* estava restrita aos isolados que abrigavam o gene *esp*. No mesmo estudo, mutantes do gene *esp* e linhagens selvagens foram comparadas quanto a capacidade de formação de biofilme, linhagens mutantes com média e fraca formação de biofilme perderam a capacidade de adesão, por outro lado, linhagens fortes formadoras de biofilme não tiveram sua capacidade de formar biofilme significativamente afetada pela ausência do gene *esp*, o que levou a proposta de que outras adesinas de superfície possam também mediar a anexação inicial das células a superfície na ausência de *esp*. Toledo-Arana *et al.* (2001) ainda demonstraram que superexpressão da proteína Esp aumentou a capacidade de adesão a superfícies em linhagens *esp* negativas. Em estudo semelhante, Heinkens *et al.* (2007) através da construção de um modelo de mutação inserção-deleção no gene *esp* em *E. faecium* que resultou na abolição da expressão de Esp na superfície celular, demonstraram que a capacidade de

adesão inicial ao poliestireno foi altamente reduzida no isolado *esp* mutante quando comparado com a linhagem selvagem, e a complementação *trans* com *esp* através de um plasmídeo foi capaz de restaurar a aderência inicial e a formação de biofilme na linhagem *esp* mutante.

Por outro lado, Rosa *et al.* (2006) após analisarem 128 isolados de *Enterococcus* obtiveram 44 isolados *esp* negativos e formadores de biofilme e um isolado *esp* positivo e não produtor de biofilme, suportando que a formação de biofilme esteja relacionada com outros fatores que não o gene *esp*. Raad *et al.* (2005) em estudo realizado com *E. faecium* resistentes à vancomicina (VRE) observaram que isolados que não apresentavam o gene *esp* demonstraram uma maior capacidade de formação de biofilme do que os demais, sugerindo que o gene *esp* não esteja associado a formação de biofilme em VRE.

Alguns estudos também propõem a relação do gene *gelE* com a formação de biofilme. Mohamed *et al.* (2004), após deleção do gene *gelE* em uma linhagem de *E. faecalis* relataram uma diminuição na capacidade de formar biofilme, adicionalmente propuseram que o locus *fsr*, que regula positivamente a expressão da gelatinase, também influencia na formação de biofilme. Por outro lado, no ano seguinte, Mohamed *et al.* (2005) não relataram nenhuma diferença na produção de biofilme *in vitro* entre isolados produtores e os não produtores de gelatinase, e adicionalmente demonstraram a presença de isolados de *E. faecalis* fortes formadores de biofilme, porém sem o gene *gelE*, sugerindo que a atividade gelatinolítica ou o gene *gelE* não sejam necessários para a formação de biofilme.

Vários outros genes foram investigados quanto a sua relação com a formação de biofilme, porém a regulação da formação de biofilme em *Enterococcus* ainda não foi totalmente elucidada (Mohamed *et al.*, 2007).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos deste trabalho foram realizados no laboratório 164 do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3.1. Amostras

Neste estudo foram analisadas 136 amostras de *Enterococcus*, sendo 70 de origem alimentar isoladas de verduras, legumes, queijos e carnes, provenientes da bacterioteca do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UFRGS, e 66 amostras de origem clínica fornecidas pela Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFSCPA). As amostras foram previamente identificadas com base em testes fenotípicos (testes bioquímicos) e genotípicos (PCR gênero específico para presença do gene *tuf*). Os isolados foram identificados quanto à espécie e agrupados conforme o Quadro 1.

Os isolados provenientes de amostras alimentares foram obtidos a partir de carne suína e de frango, vegetais e derivados de leite. Destes isolados, 75,7% (53/70) pertenciam à espécie de *E. faecalis*, 22,9% (16/70) à *E. faecium* e 1,4% (1/70) à *E. gallinarum*. Os isolados de origem clínica foram obtidos a partir de urina, cateter, secreção peritoneal, secreção cervical, fezes e escarro, dentre eles 86,4% (57/66) pertenciam à espécie *E. faecalis*, 3%(2/66) à *E. faecium* e 10,6% (7/66) *Enterococcus sp.*

Os isolados encontravam-se preservados em uma solução de 10% (p/v) de leite desnatado Molico (Nestlé, Araçatuba-SP, Brasil) e 10% (v/v)

glicerol congelados a -20°C . Antes da realização dos ensaios os isolados foram submetidos à crescimento em Ágar Infusão de Cérebro e Coração (Brain-heart Infusion- BHI - Himedia) à 37°C overnight.

3.2. Análise genotípica da presença de fatores de virulência

A extração do DNA total foi realizado através do método de lise térmica seguindo a técnica descrita por Riboldi *et al.* (2009): uma colônia do isolado crescida a 37°C durante 24h em ágar BHI, foi suspensa em 100 μL de água MiliQ estéril em eppendorfs de 1,5mL e submetida à fervura a 100°C durante 10 minutos. Logo após, os isolados foram levados a centrifugação a 13000 x g durante 10 minutos em microcentrifuga (eppendorf Minispin). Após a centrifugação, 1 μL do sobrenadante foi submetido a PCR.

Com o objetivo de evitar falsos negativos decorrentes de impurezas no DNA, isolados negativos para a presença dos genes estudados foram submetidos a nova extração de DNA, seguindo o protocolo de Fredricks e Relman (1998) com modificações: 5 ml da cultura de cada microrganismo em caldo triptona de soja (TSB- Himedia) incubado *overnight* a 37°C foi centrifugado a 6000 rpm por 5 min e descartado o sobrenadante, o *pellet* foi lavado três vezes com 1 ml de tampão TE 1x (Tris 10 mM, EDTA 1mM- pH 7,8), e ressuspenso em 100 μL do mesmo tampão. Foi então adicionado 100 μL de TE 5x acrescido de NaCl 5M, 20 μL de SDS 10% e 5 μL de Proteinase K (20 mg/ml). Os microtubos foram incubados em banho de água durante 1h a

55°C. Após esse período, adicionou-se 15 µL de NaCl 5M, 200 µL de fenol, seguido por agitação por vortex e centrifugação a 14000 x g durante 15 min. Após a centrifugação, foi coletada a fase aquosa e transferida para outro microtubos, onde adicionou-se 1 mL de etanol 100% e incubou-se durante 1h à -20°C, logo após, foi realizada nova centrifugação a 13000 x g durante 15 min e desprezou-se o sobrenadante. O pellet foi ressuspendido em 100 µL de tampão TE e 5µL de RNase (20 mg/ml) e incubado por 30 minutos a 37°C. O quantidade de DNA foi analisada em gel de agarose 1%.

Em todos os isolados foram analisadas a presença dos genes *gelE*, *esp*, *agg*, *ace* e *cylA* através da Reação de Cadeia da Polimerase (PCR). Amostras contendo o gene *gelE* porém sem atividade gelatinolítica foram submetidas a análise dos genes *fsrA*, *fsrB* e *fsrC*. As amostras de *E. faecalis* JH2-2 e MMH594 foram utilizadas como controles positivos.

A reação da PCR para os genes *gelE*, *agg*, *ace*, *cylA*, *fsrA*, *fsrB* e *fsrC* foi realizada em volume total de 25 µL, contendo 2µL de DNA molde, 1,5 mM de MgCl₂, 10 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 200 µM de cada dNTP, 1U de Taq DNA Polimerase, tampão de reação 1x. Para o gene *esp* a reação foi realizada em volume total de 30 µL, contendo 2µL de DNA molde, 2,0 mM de MgCl₂, 10 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 200 µM de cada dNTP, 1U de Taq DNA Polimerase, tampão de reação 1x.

As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores estão descritas na Tabela 1. As condições de PCR para todos os genes foram desnaturação à 94°C por 5 minutos seguidos por 30 ciclos de desnaturação à 94°C por 1

minuto, anelamento conforme Tabela 1 por 1 minuto, extensão à 72°C por 1 minuto, seguidos por extensão final à 72°C por 10 minutos.

Os produtos de PCR foram analisados em gel de eletroforese com 1,5% de agarose, corados com solução de brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta.

TABELA 1. Oligonucleotídeos iniciadores e temperaturas de anelamento utilizadas para detectar os genes de virulência

Gene	Olig. iniciadores	Sequência (5'-3')	Produto (bp)	TA * (°C)	Referências
<i>gelE</i>	gelE1	AGTTCATGTCTATTTTCTTCAC	402	56	Mannu et al. (2003)
	gelE2	CTTCATTATTTACAGTTTG			
<i>esp</i>	Esp46	TTACCAAGATGGTTCTGTAGGCAC	913	58	Shankar et al. (1999)
	Esp47	CCAAGTATACTTAGCATCTTTTGG			
<i>ace</i>	ACE1	AAAGTAGAATTAGATCCACAC	320	56	Mannu et al. (2003)
	ACE2	TCTATCACATTCGGTTGCG			
<i>agg</i>	TE3	AAGAAAAAGAAGTAGACCAAC	1553	56	Eaton & Gasson (2001)
	TE4	AAACGGCAAGACAAGTAAATA			
<i>cylA</i>	TE17	TGGATGATAGTGATAGGAAGT	517	56	Eaton & Gasson (2001)
	TE18	TCTACAGTAAATCTTTCGTCA			
<i>fsrA</i>	F	ATGAGTGAACAAATGGCTATTA	740	58	Nakayama et al (2002)
	R	ATGAGTGAACAAATGGCTATTA			
<i>fsrB</i>	F	GGGAGCTCTGGACAAAGTATTATCTAACCG	566	58	Nakayama et al (2002)
	R	TTGGTACCCACACCATCACTGCTTTTGC			
<i>fsrC</i>	F	ATGATTTGTCGTTATTAGCTACT	1343	58	Nakayama et al (2002)
	R	CATCGTTAACAACCTTTTACTG			

TA * temperatura de anelamento (°C)

3.3. Detecção da produção da enzima gelatinase

Produção da atividade da enzima gelatinase foi determinada em caldo BHI contendo 4% de gelatina (Himedia). Colônias crescidas a 37°C overnight em placas de ágar BHI foram inoculadas em tubos contendo 4 mL de BHI caldo com gelatina, incubadas à 37°C durante 24h e posteriormente refrigeradas a 4°C por 30 minutos. Após esse período, as amostras que apresentavam o meio liquefeito foram consideradas positivas e as demais foram novamente incubadas durante 5 dias a 37°C, então foram novamente refrigeradas e amostras em que o meio permaneceu sólido foram consideradas negativas para a produção de gelatina (adaptado de Marra *et al.* 2007).

3.4. Detecção da enzima citolisina

Isolados previamente crescidos em ágar BHI overnight a 37°C foram inoculados através de picada em ágar Müller Hinton acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado (NewProv), as placas foram incubadas sob condições de aerobiose à 37°C durante 72h. Amostras que apresentavam hemólise parcial ou não apresentavam hemólise foram novamente inoculadas em placas contendo ágar Muller-Hinton e sangue de carneiro e incubadas sob condições de anaerobiose a 37°C durante 72h. Após o período de incubação a presença de uma zona clara ao redor da colônia (β -hemólise) foi interpretada como positivas para a produção de hemolisina. Zonas esverdeadas (α -hemólise) e ausência de zonas claras (γ -hemólise) foram consideradas

negativas para a produção de hemolisina, segundo protocolo descrito por Semedo *et al.* (2003), para a detecção de hemolisina por *Enterococcus*.

3.5. Verificação da variação do gene *esp* por PCR-RFLP

Os polimorfismos no tamanho do produto de amplificação do gene *esp*, foram determinados pela digestão dos produtos de PCR do gene *esp* com a endonuclease de restrição *HindIII* (Jena Bioscience GmbH, Germany) conforme recomendações do fabricante.

3.6. Avaliação da capacidade de formação de Biofilme

Todos os isolados foram analisados quanto à sua capacidade de formação de biofilme conforme protocolo adaptado de Stepanovic *et al.*, 2000. Os isolados foram previamente inoculados em placas contendo àgar BHI e incubados *overnight* à 37°C.

3.6.1. Etapa 1

Placas de titulação (microplacas 96 poços) foram preenchidas em ambiente estéril com 180µl de caldo TSB (Himedia) acrescido de 0,75% de glicose. Concomitantemente, após o crescimento *overnight*, colônias foram resuspendidas em solução salina e ajustados conforme escala 0,5 de McFarland, 20 µL dessa solução foi inoculada por poço sendo que 8 poços foram utilizados para cada isolado, desse modo, cada isolado foi analisado 8

vezes quanto a formação de biofilme. A primeira coluna de cada microplaca foi inoculada somente com TSB acrescido de glicose como controle negativo, seguido pelo controle positivo *Staphylococcus epidermidis* (ATCC: 25923).

As placas foram cobertas e incubadas aerobicamente a 37°C durante 24h.

3.6.2. Etapa 2

Após o crescimento, foi realizada a lavagem para a retirada das células planctônicas e posteriormente a fixação das amostras. O caldo TSB com crescimento bacteriano foi aspirado com micropipeta multicanal (8 canais), e então as amostras foram lavadas 3 vezes com 200 µl de salina estéril. A microplaca foi invertida sobre papel absorvente a fim de secar os poços e então as amostras foram fixadas com 150 µl de metanol p.a. durante 20 minutos, as microplacas foram mantidas invertidas *overnight*.

3.6.3. Etapa 3

Com o auxílio da micropipeta multicanal as amostras foram coradas com 150 µl de Cristal Violeta 0,5% durante 15 minutos, a placa foi invertida e o excesso de corante foi retirado sob água corrente. Após curto período para a secagem da microplaca, o botão corado fixado ao fundo dos poços foi ressuscitado em 150µl de etanol (95%), as microplacas foram mantidas em repouso durante 30 minutos e então foi realizada a quantificação dos biofilmes.

A densidade óptica (D.O.) dos biofilmes bacterianos foi quantificada com o auxílio de um leitor espectrofotométrico de microplacas utilizando

comprimento de onda de 450nm (Marca: Anthos 2010 Type 17 550 S. Nº 17 550 4894).

3.6.4. Classificação das amostras

A partir da D.O média obtida os isolados foram classificados seguindo os critérios estabelecidos por Stepanovic *et al.* (2000). A D.O média do controle negativo foi utilizada como ponto de corte. Os isolados foram classificados conforme abaixo:

- Não formadores de biofilme: Amostras cuja D.O média foi menor que o ponto de corte.
- Fracos formadores de biofilme: Amostras com D.O média acima do ponto de corte, porém menor ou igual ao dobro do PC.
- Moderados formadores de biofilme: Amostras com D.O média acima do dobro do PC, porém menor ou igual a 4x o PC.
- Fortes formadores de biofilme: Amostras com D.O média maior do que 4 vezes o valor do PC.

$DO \leq DOc$ Não-aderente

$DOc < DO \leq 2 \times DOc$ Fraco aderente

$2 \times DOc < DO \leq 4 \times DOc$ Moderado aderente

$4 \times DOc < DO$ Forte aderente

3.7. Verificação da variação do gene 16S rDNA entre diferentes espécies de *Enterococcus*

Trinta e dois isolados de *E. gallinarum* e 20 de *E. casseliflavus* isolados de amostras clínicas e alimentares foram analisados quanto à variações do gene 16S rDNA com o objetivo de confirmar sua classificação. Como controles, duas linhagens de referência *E. gallinarum* (PAD 262) e *E. casseliflavus* (PAD 71) cedidas pelo laboratório de microbiologia da Universidade Federal de Ciências Saúde de Porto Alegre foram utilizadas.

A extração do DNA total foi realizada através do método de lise térmica. Foram utilizados os primers 16Sent-F (5'-CTGACGCTGAGGCTCGAAAGCG-3') e 16Sent-R (5'-TGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGGGG-3'), correspondentes a sequência de nucleotídeos do 16S rDNA do gênero *Enterococcus*. A reação foi realizada em um volume final de 30 µl, com 2µL de DNA molde, 1,5 mM de MgCl₂, 10 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 200 µM de cada dNTP, 1U de Taq DNA Polimerase, tampão de reação 1x. O produto de PCR de 661 pb foi submetido a digestão com a enzima de restrição *Hinf*I (Jena Bioscience GmbH), seguindo as recomendações do fabricante. Os fragmentos de DNA obtidos foram analisados em gel de agarose 2%, corados com solução de brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta.

4. RESULTADOS

4.1. Distribuição dos fatores de virulência entre os isolados clínicos e alimentares

Todos os isolados de *Enterococcus* foram analisados quanto à presença dos genes *gelE*, *esp*, *agg*, *ace* e *cyIA* envolvidos com a virulência, por PCR. Os resultados estão apresentados na Tabela 2.

Dentre os isolados de origem alimentar, 92,9% (65/70) apresentaram pelo menos um dos genes testados. Isolados de origem clínica apresentaram maior uma incidência dos genes *esp*, *agg* e *cyIA* quando comparados com isolados alimentares. Além disso, isolados clínicos apresentaram maior número médio de genes por isolado, a média de genes encontrados por isolado foi de 2,4 em amostras clínicas e 1,7 em amostras alimentares.

O gene *gelE* que codifica uma metaloendopeptidase capaz de degradar compostos como gelatina, caseína e colágeno, foi detectado em 80% (56/70) dos isolados de origem alimentar e em 75,8% (50/66) do total de isolados clínicos. A incidência do gene *gelE* foi similar entre as diferentes classes dos isolados alimentares, 78,1% (25/32) dos isolados obtidos de carnes foram positivos para o gene *gelE*,

80% (16/20) dos vegetais e 83,33% (15/18) dos produtos derivados de leite. Entre os isolados clínicos, dos três isolados de *Enterococcus* obtidos em amostras de sangue dois apresentaram o gene *gelE*, 37 de 46 isolados de urina também foram positivos para o gene. Em relação às espécies analisadas nenhuma amostra clínica de *E. faecium* apresentou o gene enquanto que 77,2% (44/57) dos *E. faecalis* foram positivos para *gelE*. A diferença na presença do gene entre espécies nas amostras alimentares não foi observada, 78,2% (43/53) dos *E. faecalis*, 85,7% (12/16) dos *E. faecium* e 100% (1/1) dos *E. gallinarum*, apresentavam o gene *gelE*.

A presença do gene *esp*, responsável pela expressão da proteína de superfície de *Enterococcus* não foi observada em nenhum isolado proveniente de amostras alimentares. Entretanto, entre os isolados clínicos o gene *esp* foi o terceiro mais prevalente dentre os genes testados, 65,2% (43/66) dos isolados apresentavam *esp*, sendo mais comumente encontrado na espécie *E. faecalis* (68,4%).

O gene *agg* que codifica uma substância de agregação que facilita a adesão celular foi mais prevalente nos isolados clínicos em comparação com alimentares, 57,6% (38/66) e 15,7% (11/70) das amostras, respectivamente. Assim como para o gene *gelE*, a diferença com relação a presença deste gene entre os diferentes tipos de alimentos foi de menos de 1%, 15,6% (5/32) dos isolados de *Enterococcus* de produtos cárneos, 15% (3/20) de vegetais e 16,6% (3/18) de produtos lácteos apresentaram o gene *agg*.

O gene *ace* que codifica uma adesina de colágeno envolvida com a ligação de *Enterococcus* ao colágeno e dentina, foi o segundo mais prevalente

entre isolados, 72,9% (51/70) dos isolados alimentares e 71,2% (47/66) dos clínicos. Entre as espécies 67,27% (74/110) dos *E. faecalis* apresentaram o gene *ace*, seguido por 61,11% (11/18) dos *E. faecium*. Os isolados pertencentes à classe dos vegetais apresentaram 80% (16/20) de incidência do gene *ace*, seguido pelos laticínios, 77,8 (14/18) e 65,6% (21/32) produtos cárneos.

O gene *cyIA* estava presente em 7,1% (5/70) do total de isolados alimentares, sendo que todos foram obtidos a partir de amostras de produtos cárneos. Entre os isolados clínicos, 53% (35/66) foram positivos para o gene, dentre os 46 *Enterococcus* isolados de urina 23 foram positivos para o *cyIA*, entre os três isolados a partir de sangue dois apresentaram o *cyIA*, e nos isolados de origem desconhecida de 11 isolados somente três foram positivos para o gene.

TABELA 2: Incidência dos genes de virulência em *Enterococcus*.

	Isolados Alimentares (n=70)				Isolados Clínicos (n=66)			
	<i>E. faecalis</i> n= 55 (%)	<i>E. faecium</i> n= 14(%)	<i>E. gallinarum</i> n=1 (%)	Total (%)	<i>E. faecalis</i> n= 57 (%)	<i>E. faecium</i> n=2 (%)	<i>Enterococcus</i> sp. n=7 (%)	Total (%)
<i>gelE</i>	43 (78,2)	12 (85,7)	1 (100)	56 (80)	44 (77,2)	0 (0)	6 (85,7)	50 (75,8)
<i>esp</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	39 (68,4)	0 (0)	4 (57,1)	43 (65,2)
<i>agg</i>	10 (18,2)	1 (7,1)	0 (0)	11 (15,7)	33 (57,9)	1 (50)	4 (57,1)	38 (57,6)
<i>ace</i>	41 (74,54)	10 (71,4)	0 (0)	51 (72,9)	42 (73,7)	1 (50)	4 (57,1)	47 (71,2)
<i>cylA</i>	3 (5,2)	2 (14,3)	0 (0)	5 (7,1)	31 (51,7)	1 (50)	3 (75)	35 (53)

4.2. Presença dos genes *gelE* e operon *fsr* e atividade da enzima gelatinase

A correlação entre a presença do gene *gelE* e atividade da enzima gelatinase foi determinada entre todos os isolados (Tabela 3). O gene *gelE* foi o mais prevalente tanto no isolados clínicos (75,8%) como alimentares (80%).

Dos 56 isolados de *Enterococcus* provenientes de amostras alimentares positivos para o gene *gelE*, 9 (15,8%) não apresentaram atividade gelatinolítica, todos estes os isolados foram obtidos a partir de carne de frango. Entre os isolados clínicos, do total de 50 isolados que apresentavam o gene, 28 (56%) não foram capazes de hidrolisar a gelatina.

TABELA 3: Relação entre a presença do gene *gelE* e atividade gelatinolítica entre isolados alimentares e clínicos de *Enterococcus*.

	<i>gelE</i> - /gelatinase-	<i>gelE</i> + / gelatinase-	<i>gelE</i> + /gelatinase+
Isolados Alimentares	20% (14/70)	12,9% (9/70)	67,1% (47/70)
Isolados Clínicos	24,2% (16/70)	42,4% (28/70)	33,3% (22/66)

Com o objetivo de estabelecer se a falta de expressão enzimática estava ligada a deleções no operon *fsr*, que regula a expressão da enzima gelatinase, todos os isolados que apresentavam o gene, porém não eram capazes de hidrolisar a gelatina foram analisados quanto à presença dos genes do operon *fsr* (*fsrA*, *fsrB*, *fsrC*). Cinco dos nove isolados (55,6%) alimentares positivos para o gene *gelE* e sem atividade enzimática não apresentaram

nenhum dos genes *fsr* analisados, dois (22,2%) apresentaram deleção de dois genes *fsr*, (deleção de *fsrA* e *fsrB*: 1 isolado; deleção de *fsrB* e *fsrC*: 1 isolado) e dois (22,2%) apresentaram o *operon* completo.

Nos isolados clínicos, sete de 28 (25%) apresentaram deleção de todos os genes do operon, 15 (53,6%) não apresentaram dois genes (deleção de *fsrA* e *fsrB*: 12 isolados; deleção de *fsrB* e *fsrC*: 2 isolados; deleção de *fsrA* e *fsrC*: 1 isolado), três (10,7%) apresentaram deleção de apenas um gene (deleção de *fsrB*: 1 isolado; deleção de *fsrC*: 2 isolados) e três isolados (10,7%) apresentaram o *operon* completo.

4.3. Presença do gene *cyIA* e atividade da enzima citolisina

O gene *cyIA*, assim como o *gelE*, foi encontrado em isolados nos quais não pôde ser verificada a atividade enzimática (Tabela 4). Dentre os cinco isolados provenientes de amostras de alimentos que apresentavam o gene *cyIA*, dois não foram capazes de causar hemólise em ágar sangue, todos os isolados pertenciam à classe de produtos cárneos e foram isolados a partir de carne de frango.

Os isolados clínicos, além da maior incidência do gene *cyIA*, 53% (35/66), também apresentaram maior diferença entre genótipo e fenótipo, dos 35 isolados positivos para o gene, 77,1% (27/35) não apresentaram capacidade hemolítica.

TABELA 4: Relação entre presença do gene *cyIA* e atividade hemolítica (citolisina) entre isolados alimentares e clínicos de *Enterococcus*.

	<i>cyIA</i> -Citolisina-	<i>cyIA</i> + Citolisina-	<i>cyIA</i> + Citolisina+
Isolados Alimentares	92,9% (65/70)	2,8% (2/70)	4,3% (3/70)
Isolados Clínicos	47% (31/66)	40,9% (27/66)	12,1% (8/66)

4.4. Polimorfismo do gene *esp*

Shankar *et al.* (1999) demonstraram variações no tamanho dos fragmentos obtidos por PCR do gene *esp* em isolados de *Enterococcus*. Para verificar se a variação de tamanho dos fragmentos obtidos por PCR do gene *esp* (Figura 6A) estava ligada a presença de diferentes números de blocos de repetição A, o produto de DNA do gene *esp* obtido por PCR foi submetido à digestão com a endonuclease de restrição *HindIII*, que apresenta um sítio de restrição dentro de cada bloco de repetição A. .

Como demonstrado anteriormente, o gene *esp* estava presente somente em isolados clínicos. Quarenta e três isolados positivos para o gene *esp* foram submetidos à digestão com a endonuclease de restrição *HindIII*. Após a digestão do fragmento de DNA de 913 pares de base (bp) foram observados três fragmentos, 173, 252, 262 bp, e uma repetição do fragmento de 252 bp. O número de blocos de repetição A variou de um a três entre os isolados analisados. Dos 43 isolados, 16,3% (7/43) apresentaram um bloco,

39,5% (17/43) dois blocos e 44,2% (19/43) apresentaram três blocos de repetição A (Figura 6B) .

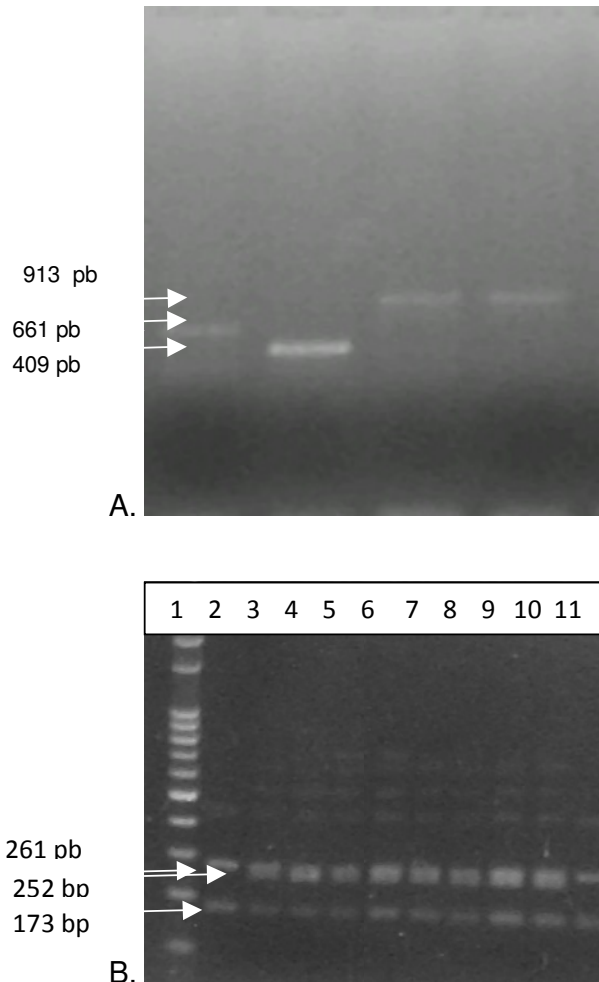


FIGURA 6: A. Fragmentos do gene obtidos por PCR, demonstrando diferentes padrões de bandas entre os isolados. B. Fragmentos obtidos após a digestão do produto de PCR com endonuclease *HindIII*, (1) marcador de peso molecular 100pb, (2) Isolado com um bloco de repetição A; (3-5) Isolado com dois blocos de repetição A; (6) Isolado com três blocos de repetição A; (7-8) isolados com dois blocos de repetição; (9-10) isolados com três blocos de repetição A; (11) Isolado com um bloco de repetição A.

4.5. Capacidade de formação de biofilme *in vitro*

A capacidade de formar biofilmes por isolados de *Enterococcus* já foi reportada em materiais utilizados para a confecção de dispositivos médicos e lentes de contato. A relevância de biofilmes formada por *Enterococcus* é devida, principalmente, ao fato de que *Enterococcus* em biofilmes são mais resistentes à ação dos antibióticos do que quando em células planctônicas. (Mohamed *et al.*, 2007).

Cento e trinta e seis solados de *Enterococcus* foram avaliados quanto a capacidade de formação de biofilme *in vitro* através da adesão em placas de poliestireno (Tabela 5). A classificação foi estabelecida de acordo com a densidade óptica, seguindo o padrão estabelecido por Stepanovic *et al.* (2000).

Isolados alimentares demonstraram em sua maioria, 95,7% (67/70), capazes de formar biofilme em placas de poliestireno, enquanto em somente 4,3% (3/70) dos isolados não foi observada adesão celular. Os isolados foram classificados em: 11,4% (8/70) fracos, 28,6% (20/70) moderados e 55,7% (39/70) fortes formadores de biofilme. Entre as espécies de *Enterococcus* analisadas o predomínio fenotípico forte fortes formadores de biofilme: 56,6% (30/53) dos *E. faecalis* classificados como fortes formadores de biofilme, 26,4% (14/53) como moderados, 11,3% (6/53) como fracos e 5,7% (3/53) como não formadores. Entre *E. faecium*, a proporção de fortes formadores de biofilme foi um pouco menor, porém ainda assim foi o perfil mais incidente já que metade dos isolados desta espécie foram classificados como fortes formadores de

biofilme (8/16), seguidos por moderados formadores de biofilme, 37,5% (6/16), e fracos formadores, 12,5% (2/16). O único isolado de *E. gallinarum* demonstrou forte capacidade de formação de biofilme.

TABELA 5: Capacidade de formação de biofilme em isolados de *Enterococcus*.

Capacidade de formação de biofilme	Isolados Alimentares (%)	Isolados Clínicos (%)
Não- formadores	3/70 (4,3)	2/66 (3)
Fracos	8/70(11,4)	3/66 (4,6)
Moderados	20/70 (28,6)	5/66 (7,6)
Fortes	39/70 (55,7)	56/66 (84,8)

Entre as amostras de origem clínica, foi observada uma maior incidência de isolados fortes formadores de biofilmes do que amostras de origem alimentar. Forte formação de biofilme foi observada em 84,8% (56/66) dos isolados, seguido por moderada capacidade de formação de biofilme, 7,6% (5/66) e fraca capacidade, 4,6% (3/66). Isolados que não apresentaram formação de biofilme contabilizaram 3% (2/66) do total de isolados de origem clínica analisados. Dentre os 57 isolados de *E. faecalis*, 49 foram classificados como fortes formadores de biofilme, cinco como moderados e três como fracos formadores. Já em isolados de *E. faecium*, um não foi capaz de formar biofilme

e um apresentou forte capacidade de formação. Entre *Enterococcus* sp., um dos sete isolados foi classificado como não formador de biofilme e seis como fortes formadores.

Forte e moderada capacidade de formação de biofilme foram os fenótipos mais amplamente distribuídos entre as três classes de alimentos analisadas. Dos três isolados não formadores de biofilme, dois pertenciam à classe dos laticínios e um à classe das carnes. Entre os fracos formadores de biofilme seis pertenciam à classe de carnes, um à classe de vegetais e um aos laticínios. Isolados moderados formadores de biofilme foram distribuídos entre as classes de maneira bastante homogênea, sete isolados foram obtidos à partir de carnes, sete pertenciam à classe dos vegetais e seis foram isolados a partir de produtos derivados do leite. Dos isolados fortes formadores de biofilme, 18 foram obtidos de carnes, 12 isolados provêm de vegetais e nove de laticínios.

Entre os isolados clínicos, dos dois *Enterococcus* que não apresentaram capacidade de formação de biofilme, um isolado foi obtido a partir de fezes e em um a origem do isolamento é desconhecida. Fracos e moderados formadores de biofilme foram todos isolados a partir de urina. Os isolados obtidos de todos os demais sítios utilizados no estudo apresentaram forte capacidade de formação de biofilme.

4.6. Relação entre formação de biofilme *in vitro*, atividade gelatinolítica e genes de virulência

A relação dos genes de virulência e formação de biofilme é bastante controversa, enquanto alguns autores defendem uma relação de genes como *ge/E* e *esp* com a capacidade de formação de biofilme, outros afirmam que formação de biofilme é uma característica comum do gênero *Enterococcus*.

Embora a análise estatística tenha revelado relação entre forte capacidade de formação de biofilme e presença do gene *ge/E* em isolados de origem clínica ($p=0,007$), a mesma relação não foi observada entre formação de biofilme e produção da enzima gelatinase ($p=0,120$). Além disso, observamos que 78,6% (11/14) dos isolados alimentares não apresentavam o gene *ge/E* foram classificados como fortes formadores de biofilme. Em isolados de origem clínica, 68,8% (11/16) negativos para o gene *ge/E* também apresentaram forte capacidade de formação de biofilme.

Os genes *esp*, *agg*, *cylA* e enzima citolítica também não apresentaram relação estatisticamente significativa com a formação de biofilme. Entretanto em isolados de *Enterococcus* de origem clínica, foi verificada uma relação entre o gene *ace* e forte capacidade de formação de biofilme ($p=0,015$). Adicionalmente, 13 isolados de *Enterococcus* obtidos a partir de sítios clínicos, negativos para o gene *ace* apresentaram fenótipo de fortes formadores de biofilme.

Os dois isolados clínicos que não apresentaram capacidade de formação de biofilme não apresentavam nenhum dos genes analisados,

entretanto, entre os isolados de origem alimentar que não apresentavam capacidade de formação de biofilme foram detectados por PCR os genes *gelE*, *agg* e *ace*.

4.7. Verificação da variação do gene 16S rDNA entre as espécies de *Enterococcus gallinarum* e *E. casseliflavus* provenientes de amostras clínicas e alimentares

Foram analisados através de PCR-RFLP, 32 isolados de *E. gallinarum* e 20 isolados de *E. casseliflavus* quanto a variações do gene 16S rDNA com o objetivo de confirmar sua classificação. O fragmento obtido por PCR de 661 bp foi submetido a digestão com a enzima de restrição *Hinfl*. Nas linhagens de referência de *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* foi observado dois fragmentos de DNA de tamanhos de 589 pb e 72 pb, o que os difere das demais espécies nas quais são produzidos fragmentos de DNA de 504 pb, 85 pb e 72 pb (Figura 7). As análises das sequências 16S rDNA de *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* depositadas no GenBank, demonstram que na posição 1248 estas espécies apresentavam uma timina, enquanto em todos os outros *Enterococcus* uma citosina ou timina (espécies sem relevância clínica) era observada nesta posição.

O PCR-RFLP das 52 linhagens testadas demonstrou que 47% (15/32) dos *E. gallinarum* e 25% (5/20) dos *E. casseliflavus* mostraram um padrão genotípico esperado no PCR-RFLP para estas espécies. Dois *E. gallinarum* e um *E. casseliflavus* positivos no PCR-RFLP foram analisados pelo

método SDS-PAGE e confirmaram os resultados obtidos. Por outro lado, 53% (17/32) dos *E. gallinarum* e 75% (15/20) dos *E. casseliflavus* mostraram três fragmentos de DNA (504, 85 e 72bp). Essas linhagens foram submetidas novamente a novos testes bioquímicos e reclassificados como *E. faecium*, *E. faecalis* e *Enterococcus* sp.

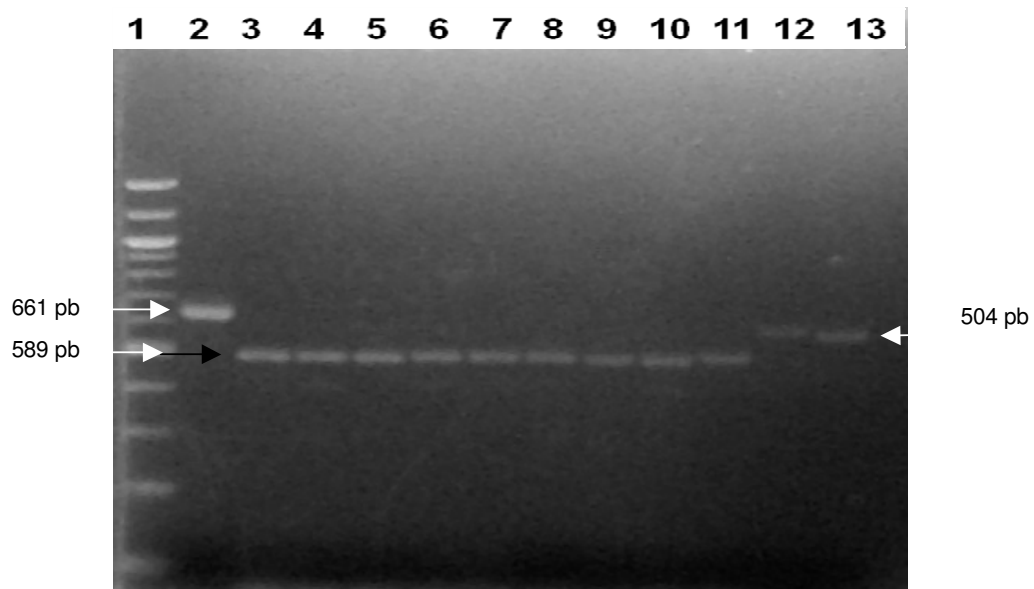


Figura 7. Fragmentos de DNA obtidos após digestão do produto de 661 pb amplificado do gene 16S rDNA e submetidos digestão com endonuclease de restrição *HinfI*. (1) Ladder 100 bp; (2) Produto de PCR de *E. gallinarum* não digerido; (3) *E. faecalis* PAD 1870; (4) *E. faecium* PAD 289; ; (5) *E. hirae* PAD279, (6) *E. munditti* PAD 24; (7) *E. durans* PAD 299; (8) *E. gallinarum* identificado erroneamente; (9) *E. casseliflavus* identificado erroneamente; (10) *E. gallinarum* identificado erroneamente; (11) *E. casseliflavus* identificado erroneamente; (12) *E. casseliflavus* PAD 71 e (13) *E. gallinarum* PAD 1262.

5. DISCUSSÃO

5.1. Distribuição dos genes de virulência

E. faecalis são conhecidos por abrigarem mais genes de virulência do que *E. faecium*, vários estudos tem demonstrado diferenças significativas quanto a presença de genes de virulência entre essas duas espécies. Cariolatto *et al.* (2008) observaram que enquanto a presença de múltiplos fatores de virulência foi estabelecida em vários isolados de *E. faecalis*, o mesmo padrão não foi observado em *E. faecium*. Eaton & Gasson (2001) também observaram a ocorrência de múltiplos fatores de virulência (de 6 a 11) em todos os *E. faecalis* analisados, incluindo os utilizados como culturas *starter*.

Em nosso estudo todos os genes de virulência foram mais frequentemente estabelecidos em isolados de *E. faecalis* em comparação com *E. faecium*, tanto em amostras de origem alimentar quanto de origem clínica, porém o número de *E. faecium* provenientes de amostras clínicas é muito restrito para uma comparação fidedigna. A maior incidência de genes de virulência em isolados de *E. faecalis* demonstra seu maior potencial patogênico quando comparado com outras espécies de *Enterococcus*, além disso, *E.*

faecalis estão mais amplamente relacionados com infecções do que as demais espécies de *Enterococcus*.

Embora a ocorrência de fatores de virulência esteja mais comumente relacionada com amostras clínicas, estudos vem demonstrando uma incidência crescente de determinantes de virulência entre isolados de origem alimentar, havendo a ocorrência de fatores de virulência em igual ou maior incidência quando comparados a amostras clínicas (Abriouel *et al.*, 2008; Cariolatto *et al.*, 2008)

Abriouel *et al.* (2008) observaram que o número médio de determinantes de virulência por isolado dependia da fonte de isolamento, sendo que *E. faecalis* de vegetais e água abrigavam menor número de determinantes (de 4,23 e 4, respectivamente) quando comparados com isolados de origem clínica (8,71); a mesma diferença foi estabelecida em isolados de *E. faecium*: obtidos a partir de vegetais e água, que apresentavam de 1,72 e 3,9 determinantes por isolado enquanto isolados de origem clínica apresentavam cerca de 5 determinantes genéticos de virulência por isolado. O mesmo padrão foi observado neste estudo, onde o número médio de genes por isolado em amostras de origem clínica foi 2,4 contra 1,7 nas amostras alimentares. Os genes *esp*, *agg* e *cylA* apresentaram maior incidência em isolados de origem clínica do que em isolados de origem alimentar. A maior ocorrência de determinantes de virulência em *Enterococcus* de origem clínica reforça a idéia de que genes de virulência potencializem a infecção, facilitando o acesso e estabelecimento dos *Enterococcus* nos sítios afetados.

Por outro lado os genes *gelE* e *ace* foram mais incidentes em isolados alimentares, demonstrando que amostras alimentares podem abrigar genes de virulência em grande proporção e esta afirmação aliada a característica de facilidade na transferência de determinantes de virulência em *Enterococcus* é uma preocupante realidade, já que genes de virulência podem ser transferidos à microbiota endógena através de conjugação (Fisher *et al.*, 2009).

O gênero *Enterococcus* é caracterizado por sua elevada capacidade de transferência genética através de diferentes mecanismos. Os determinantes carregados podem contribuir para o aumento da virulência desses microrganismos. Eaton & Gasson (2001) demonstraram transferência de determinantes de virulência de *E. faecalis* DS16 via plasmídeo pAD1 para uma cultura *starter* de *E. faecalis*, demonstrando o potencial dessas culturas em adquirir conhecidos fatores de virulência através de conjugação natural, o que justifica a preocupação sobre a presença de genes de virulência em isolados alimentares de *Enterococcus* já que estes podem abrigar genes de virulência e transferir para a população endógena.

Um dos genes com maior incidência em isolados de origem clínica foi o gene *esp* que codifica uma proteína de superfície relacionada como fator de contribuição para a colonização e persistência de alguns isolados de *E. faecalis* durante infecções ascendentes do trato urinário (Koch *et al.*, 2004). Em nosso estudo o gene *esp* apresentou uma frequência elevada entre isolados clínicos (65,2%), porém não foi encontrado entre amostras alimentares,

resultado similar foi encontrado por Gomes *et al.* (2008) que estabeleceram a presença do gene *esp* em 3,7% de *Enterococcus* sp. provenientes de alimentos brasileiros. No âmbito clínico, Bittencourt e Suzart (2004) em estudo realizado com *E. faecalis* isolados em Londrina-Brasil, demonstraram a presença do gene *esp* em cerca de 58% dos isolados. Eaton & Gasson (2001) em estudo realizado com isolados de *Enterococcus* provenientes de diversas fontes, não encontraram o gene *esp* em nenhuma linhagem de *Enterococcus starter* ou isolado de alimentos. Por outro lado, Valenzuela *et al.* (2008) estabeleceram o gene *esp* em 30,5% das linhagens de *Enterococcus* obtidas a partir de alimentos.

A elevada incidência do gene *esp* entre isolados clínicos de *Enterococcus* em comparação com a reduzida incidência desse gene nos isolados obtidos a partir de alimentos foi também demonstrado por Abriouel *et al.* (2008), que sugeriram que este gene esteja ligado a potencialização da patogenicidade, facilitando a prevalência de linhagens potencialmente virulentas anexadas aos tecidos humanos, além disso é provável que o gene *esp* não seja um determinante de virulência útil em outros ambientes que não sejam tecidos humanos.

Foram observadas variações nos fragmentos do gene *esp* obtidos por PCR que foi submetido à digestão com a endonuclease de restrição *HindIII*, conforme descrito por Shankar *et al.* (1999), afim de verificar se as variações eram decorrentes de diferentes números de blocos de repetição A. Foi constatado que o número de blocos de repetição A variou de um a três entre os

isolados analisados, o que corrobora com estudos anteriores (Shankar *et al.*, 1999; Cariolatto *et al.*, 2008).

Acredita-se que a variação no tamanho da proteína Esp na superfície celular possa indicar uma função ambiental específica desta enzima. (Mannu *et al.*, 2003). Shankar *et al.* (2001) sugeriram que uma forma estendida da Esp poderia estar envolvida durante os estágios iniciais da infecção, facilitando a interação com o hospedeiro e posteriormente essa forma poderia ser prejudicial para a sobrevivência e persistência do microrganismo, assim uma forma menos estendida seria requerida para evadir a resposta imune.

Outra proteína de superfície estabelecida em *Enterococcus* é a substância de agregação (Agg), codificada pelo gene *agg* e expressa em resposta a ferormônios. Estudos *in vivo* demonstram que esta proteína forma grandes agregados o que facilitaria a patogenicidade dos *Enterococcus*, podendo também mediar ligações específicas de *Enterococcus* ao epitélio intestinal, células epiteliais renais, neutrófilos humanos e macrófagos (Mundy *et al.*, 2000; Koch *et al.*, 2004; Fischer *et al.*, 2009).

Dupont *et al.* (2008), analisaram 99 isolados de *Enterococcus* provenientes de pacientes com peritonite e estabeleceram uma incidência de 40% do gene *agg*, sendo o segundo gene mais incidente em seu estudo; enquanto Bittencourt e Suzart (2004) identificaram o gene *agg* em 37% dos isolados de enterococcus provenientes de infecções hospitalares no Brasil.

Em nosso estudo houve grande diferença entre a ocorrência do gene *agg* em isolados de *Enterococcus* de origem clínica e alimentar, enquanto 57,6% dos isolados de origem clínica foram positivos para o gene somente 15,7% dos isolados de origem alimentar apresentaram *agg*. A grande variação na incidência entre isolados alimentares e clínicos sugere um papel importante do gene *agg* no desenvolvimento de infecções.

Eaton & Gasson (2001) ao analisarem isolados de *Enterococcus* de origem alimentar e clínica e isolados utilizados como culturas *starter*, estabeleceram o gene *agg* somente em linhagens de *E. faecalis*. Porém em nosso estudo o gene *agg* foi encontrado em dois isolados de *E. faecium*, sendo um obtido de amostras alimentares e outro de amostras clínicas o que corrobora com estudo de Barbosa *et al.* (2010) que estabeleceram a presença do gene *agg* em *E. faecium* isolados de carne fermentada.

O gene *ace* codifica outra proteína de superfície específica de *E. faecalis* semelhante estruturalmente à proteína de adesão ao colágeno de *Staphylococcus aureus* (*Cna- collagen adhesin*), que é caracterizada por mediar a ligação do microrganismo à proteínas da matriz extracelular. Ace tem sido demonstrada pela adesão a colágenos tipo I e IV e laminina e tem sido relacionada como fator contribuinte no aumento da patogênese em endocardites e adesão a canais radiculares (Nakayama *et al.*, 2002; Hubble *et al.*, 2003; Koch *et al.*, 2004).

No presente estudo, a presença do gene *ace* ocorreu em similar frequência entre isolados clínicos e alimentares. Cariolato *et al.* (2008) também

demonstraram similar incidência do gene *ace* entre *Enterococcus* isolados de amostras clínicas e de produtos lácteos onde cerca de 75% dos isolados analisados foram positivos para o gene *ace*. O mesmo estudo também estabeleceu o gene *ace* somente em isolados de *E. faecalis*, já em nosso estudo encontramos o gene em 11 dos 18 *E. faecium* analisados. Entre isolados provenientes de alimentos brasileiros, Gomes *et al.* (2008) também encontraram uma alta prevalência do gene *ace*, cerca de 97%, enquanto nosso estudo indicou a prevalência de cerca de 73%.

Estudos relevam que a proteína Ace é expressa durante infecções em humanos e acredita-se que desempenhe uma importante função em endocardites, já que anticorpos anti-Ace foram encontrados em 90% dos pacientes com este tipo de infecção sendo causada por *Enterococcus* (Upadhyaya *et al.*, 2009). Adicionalmente, Lebreton *et al.* (2009) demonstraram através de modelo animal que Ace está envolvida em infecções do trato urinário causadas por *E. faecalis*. A função de *ace* em *Enterococcus* provenientes de outras fontes que não infecções não foi ainda elucidada e poucos avanços foram realizados a fim de esclarecer o papel de Ace em isolados de *Enterococcus* provenientes de alimentos, embora estudos apontem a grande disseminação deste gene nesse tipo de amostra. (Gomes *et al.*, 2008; Cariolatto *et al.*, 2008).

5.2. Relação fenótipo e genótipo para a gelatinase entre isolados clínicos e alimentares de *Enterococcus*

O gene *gelE* codifica uma metalo-endopeptidase capaz de hidrolisar gelatina, caseína, hemoglobina e outros peptídeos bioativos e acredita-se que esta enzima contribui para o aumento da patogênese de *Enterococcus* por fornecer nutrientes aos microrganismos pela degradação do tecido hospedeiro (Koch *et al.*, 2004; Fischer *et al.*, 2009). O gene *gelE* foi o gene mais amplamente distribuído entre amostras clínicas e alimentares, 75,8% e 80%, respectivamente, o que está de acordo com estudos que demonstram similar índice deste gene entre os dois tipos de amostragem ou maior índice entre isolados provenientes de alimentos (Eaton & Gasson, 2001; Abriouel *et al.*, 2008).

No Brasil, em isolados de *Enterococcus* de origem alimentar, Gomes *et al.*(2008) estabeleceram uma incidência de 96,2% do gene *gelE*, porém somente 60% dos isolado apresentaram atividade gelatinolítica.

Em produtos lácteos a elevada incidência de gelatinase em *Enterococcus* pode ser explicada pelo fato de que produtos como o queijo são ricos em proteínas, e a produção de gelatinase pode ser um mecanismo de seleção para o crescimento em queijos por permitir que os microrganismos utilizem as proteínas do queijo como fonte de aminoácidos (Franz *et al.*, 2001).

Em isolados de *E. faecalis* obtidos a partir de amostras de pacientes atendidos em um Hospital no estado do Paraná- Brasil, Bittencourt e Suzart

(2004) estabeleceram que cerca de 43% dos isolados analisados abrigavam o gene *gelE*.

A atividade da gelatinase não foi detectada em 15,8% (9/57) dos isolados alimentares positivos para o gene *gelE* e em 60% (30/50) dos isolados clínicos. Explicações para este fenômeno podem ser as seguintes: 1) a perda de atividade gelatinolítica em condições de laboratório (Cariolatto *et al.*, 2008; Lopes *et al.*, 2006); 2) presença de genes silenciosos que podem tornar-se ativos por condições temporais, como as condições estabelecidas no trato gastrointestinal, o balanço de microrganismos na flora e pelos efeitos do sinergismo bacteriano, bem como a presença e persistência de um número de células viáveis (Eaton & Gasson, 2001) ; 3) baixos níveis ou *down regulation* da expressão gênica (Eaton & Gasson, 2001); ou 4) influência de fatores de ambientais na expressão da enzima (Eaton & Gasson, 2001).

Alguns estudos relacionam a presença do operon *fsr* composto dos genes *fsrA*, *fsrB* e *fsrC*, análogo do loci *agr* de *Staphylococcus* sp., como um regulador positivo da expressão de gelatinase e serina protease, desse modo deleções cromossômicas nessa região podem ser responsáveis por resultados fenotípicos negativos (Qin *et al.*; 2000; Nakayama *et al.*, 2002). Lopes *et al.* (2006) demonstraram uma redução de 90% na atividade gelatinolítica em isolados de *Enterococcus* que foram congelados durante um ano a -80°C. No mesmo estudo, foi realizada uma análise dos genes do operon *fsr* a fim de estabelecer se a perda de atividade enzimática estava relacionada com perdas

de genes do operon, porém isolados que apresentavam o operon completo não foram capazes de hidrolisar gelatina.

A presença do gene *gelE* sem atividade gelatinolítica foi encontrada em *Enterococcus* de origem clínica, alimentar e em culturas starter e também em linhagens de *E. faecalis* e *E. faecium* por Eaton & Gasson (2001). Nesse mesmo estudo, a atividade gelatinolítica de duas linhagens foi perdida durante o subcultivo do estoque original. O mesmo estudo também estabeleceu que embora todas as linhagens possam abrigar genes e não apresentar a atividade enzimática, isolados de origem alimentar e os utilizados como culturas *starter* apresentam em menor índice esse perfil.

Com o objetivo de esclarecer a causa do elevado número de isolados contendo o gene *gelE* porém sem atividade da enzima, foi realizado um *screening* dos genes do operon *fsr* (*fsrA*, *fsrB* e *fsrC*), e foi observado que 76,2% dos isolados não apresentaram pelo um dos genes analisados. Cinco amostras com operon *fsr* completo também não apresentaram a capacidade de hidrolisar gelatina, demonstrando que a atividade enzimática pode estar ligada a outros fatores.

5.3. Relação fenótipo e genótipo para a citolisina entre isolados clínicos e alimentares de *Enterococcus*

Citolisina, também denominada de hemolisina, é uma enzima bacteriana, primeiramente descrita em *E. faecalis*, que age como uma toxina

hemolítica e bacteriocina e tem demonstrado atividade contra células eucarióticas e uma gama de células procarióticas, além da sua capacidade de lisar eritrócitos, macrófagos e neutrófilos (Haas *et al.*, 1999, Coburn *et al.*, 2003). A citolítica também tem sido atribuída ao aumento da severidade de infecções como endoftalmites e endocardites (Haas *et al.*, 1999).

Isolados de *Enterococcus* de origem alimentar apresentaram uma incidência baixa do gene *cylA*, 7,1%, o que discorda de estudo brasileiro realizado por Gomes *et al.* (2008), onde o gene *cylA* foi encontrado em cerca de 30% dos isolados de *Enterococcus* provenientes de alimentos. Adicionalmente, o mesmo estudo não estabeleceu a presença do gene em isolados de *E. faecium*, já em nosso estudo, em 2 isolados desta espécie foi verificado a presença de *cylA*. Por outro lado, Barbosa *et al.* (2010) após análise de produtos à base de carne estabeleceu uma incidência bastante baixa do gene *cylA*, 3,9%.

Abriouel *et al.* (2008) em estudo comparativo, observaram que *Enterococcus* isolados a partir de alimentos e água apresentavam menor atividade hemolítica do que *Enterococcus* isolados a partir de amostras clínicas. O mesmo estudo também revelou ausência do gene *cylA* entre os isolados de *E. faecalis* provenientes de vegetais e água.

Em *Enterococcus* isolados a partir de sítios clínicos, a incidência do gene *cylA* foi de 53%. Estudos também divergem quanto a incidência do gene *cylA* entre isolados de origem clínica: Em 2006, Furumura *et al.*, em estudo realizado com isolados de *E. faecalis* obtidos em hospitais de São Paulo-Brasil,

estabeleceram uma incidência de 75% de atividade hemolítica através da análise em ágar BHI acrescido de sangue de carneiro. Por outro lado, outro estudo brasileiro, realizado por Bittencourt e Suzart (2004) estabeleceu uma incidência do gene *cyIA* de somente 16% entre isolados de *E. faecalis* obtidos a partir de amostras de um hospital paranaense.

A presença de atividade hemolítica foi ensaiada em todos os isolados, e foi observada nos *Enterococcus* de origem alimentar que dois isolados de cinco positivos para o gene *cyIA*, não apresentavam atividade beta-hemolítica, em isolados de origem clínica, a diferença entre fenótipo e genótipo foi ainda maior, dos 35 isolados que apresentavam o gene em 27 não foi observado atividade enzimática.

Existem várias hipóteses para a falta de atividade hemolítica entre isolados que apresentam o gene *cyIA*, uma delas é de que o uso de sangue de carneiro levaria a resultados falsos negativos, pois seria menos suscetível ou totalmente refratário à lise das hemácias pela enzima citolítica (Semedo *et al.* 2003). Outra explicação para este fenômeno está no fato de que a produção de citolisina é regulada por um operon contendo 8 genes: *cy/R1*, *cy/R2*, *cy/LL*, *cy/LS*, *cy/M*, *cy/B*, *cy/A* e *cy/L* e a atividade da enzima está associada com o operon *cyI* completo (Semedo *et al.* 2003).

Semedo *et al.* (2003) observaram uma significativa associação de beta-hemólise com o operon *cyI* completo. O mesmo estudo também sugere que amplificações negativas para os genes do operon podem ser decorrentes de variabilidade genética já que isolados de várias espécies de *Enterococcus*

que apresentavam atividade hemolítica não apresentavam o operon completo provavelmente devido a divergências durante a evolução.

Day *et al.* (2003) demonstraram que os genes *cyL_L* e *cyL_S* que codificam as subunidades estruturais de citolisina, são regulados em resposta a mudanças nas condições de oxigenação. Coburn *et al.* (2004) propôs um modelo de regulação da citolisina baseado na presença das células alvo, onde na ausência dessas células *CyL_L*” e *CyL_S*” são expressos em níveis basais e interagem para formar um complexo inativo, que evita a atividade citolítica e inibe a expressão de altos níveis do operon da citolisina. Outro modelo de regulação proposto baseia-se em um sistema quorum-sensing envolvendo desrepressão da transcrição quando a densidade celular é maior do que 10⁷ células/ml (Haas *et al.*, 2002).

5.4. Capacidade de formação de biofilme *in vitro* entre isolados clínicos e alimentares de *Enterococcus*

Em nosso estudo a maior parte dos isolados demonstrou um fenótipo de forte formação de biofilme *in vitro*, tanto os isolados obtidos de amostras alimentares quanto de amostras clínicas.

Em amostras de origem alimentar a incidência de formação de biofilme foi de 95,7%, sendo que 55,7% desses isolados apresentaram forte capacidade de formação de biofilmes o que discorda de estudo realizado por Gomes *et al.* (2008) onde não foram encontrados *Enterococcus* com forte ou

moderada capacidade de biofilme em alimentos obtidos em São Paulo-Brasil, porém 72,4% dos *E. faecalis* e 13,0% de *E. faecium* apresentaram fraca capacidade de formação de biofilme.

Barbosa *et al.* (2010) analisaram a capacidade de formação de formação de biofilme de *Enterococcus* isolados a partir de produtos cárneos fermentados e demonstraram que a quantidade de produção de biofilme por *Enterococcus* pode ser influenciada pelas mudanças na disponibilidade de nutrientes, já que moderados formadores de biofilme aumentaram de 28% para 35,7% e fortes formadores de 3,9% para 63,2% quando o meio de cultura utilizado para o ensaio de formação de biofilme foi substituído por meio fresco após 24h.

Al-Ahmad *et al.* (2010) estabeleceram que isolados de *Enterococcus*, especialmente *E. faecalis*, podem permanecer na cavidade oral na forma de biofilmes após a ingestão de queijos contendo esses microrganismos, podendo posteriormente causar infecções endodônticas.

A formação de biofilmes em microrganismos associados a alimentos está principalmente relacionada ao fato de que esses microrganismos podem anexar-se em ambientes de processamento tornando-os fontes de contaminação, além de sua maior resistência a sanitizantes (Dewanti e Wong, 1995). A capacidade de formação de biofilme foi bastante comum entre os isolados de *Enterococcus* provenientes de alimentos o que indica o potencial de contaminação durante a manipulação desses alimentos, associado a isso

está a presença de genes de virulência em muitos dos isolados analisados que na forma de biofilmes podem ser mais facilmente disseminados.

Entre isolados de *Enterococcus* obtidos de sítios clínicos a capacidade de formação de biofilme foi de 97%, e fortes formadores de biofilme foram os mais encontrados, cerca de 85%. Em 2006, Furumura *et al.* após a análise de 32 isolados de *E. faecalis* obtidos em hospitais de São Paulo observaram que todos foram capazes de formar biofilme em placas de poliestireno.

Upadhyaya *et al.* (2010) ao comparar a formação de biofilme entre *E. faecalis* comensais e clínicos observou que isolados clínicos apresentavam maior capacidade de formação de biofilme o que os levou a afirmação que a produção de biofilme é um fator patogênico importante em infecções hospitalares causadas por linhagens hospitalares de *Enterococcus*.

Seno *et al.* (2005) após a análise de 352 *E. faecalis* obtidos a partir de amostras de pacientes com infecção urinária observaram uma incidência de 18,2% e 44,3% de fortes e moderados formadores de biofilme, respectivamente, porém não foi estabelecida uma relação significativa entre formação de biofilme e quadro clínico.

O impacto da formação de biofilme é bastante importante na área clínica, já que biofilmes podem ser formados em implantes médicos como cateteres e próteses cirúrgicas. Além disso, biofilmes são mais resistentes a terapia antibiótica e muitas vezes infecções causadas por biofilmes são

tratadas pela remoção de implantes o que aumenta o trauma e custo do tratamento (O'Toole *et al.*, 2001). Ainda não há consenso sobre a função exata de biofilmes na patogênese, e alguns autores afirmam que a formação de biofilme é uma característica comum de algumas espécies de *Enterococcus* (Mohamed *et al.*, 2004), porém a falha terapêutica associada a biofilmes, juntamente com o potencial patogênico dos *Enterococcus*, especialmente *E. faecalis*, é uma importante questão no âmbito clínico (Mohamed *et al.*, 2007).

5.5. Relação entre genes de virulência e capacidade de formação de biofilme *in vitro* nos isolados de *Enterococcus*

A relação entre capacidade de formação de biofilme e genes de virulência é bastante controversa. Toledo-Arana *et al.* (2001) sugerem que o gene *esp* esteja envolvido com a capacidade de formação de biofilme em *E. faecalis*, já Rosa *et al.* (2006) não estabeleceram correlação entre esses dois fatores.

Em nosso estudo a ausência de correlação da enzima gelatinase e a formação de biofilme foram evidentes tanto em isolados de origem alimentar quanto de origem clínica, reforçando que tal fator de virulência não seja necessário para a formação de biofilme. Todos os demais genes, com exceção do gene *ace*, não demonstraram correlação estatisticamente significativa com a formação de biofilme. O gene *ace* apresentou correlação com a capacidade de formação de biofilme em amostras clínicas ($p=0,015$), porém em amostras

alimentares não foi observado o mesmo padrão, tal evidência sugere que este gene possa desempenhar um papel importante na formação de biofilme em amostras ambientais, levantando a necessidade de demais estudos relacionados ao gene *ace*.

O gene *gelE* tem sido investigado quanto à relação com formação de biofilme. Hancock e Perego (2004) encontraram uma relação positiva entre *gelE*, sistema regulatório *fsr* e formação de biofilme, o que também foi constatado por Mohamed *et al.* (2004), que verificaram pouca capacidade de adesão bacteriana em mutantes de *E. faecalis* com deleção dos genes *fsr*.

Mohamed *et al.* (2005) estabeleceram que não existe nenhuma diferença na produção *in vitro* de biofilme por *E. faecalis* entre isolados gelatinase positiva e negativa, também não foi observada relação entre o gene *esp* e formação de biofilme, porém isolados que possuíam esses determinantes eram capazes de produzir mais biofilme sugerindo que a gelatinase e *esp* possam contribuir para a formação de biofilme, entretanto não são essenciais.

Heinkens *et al.* (2007) através de um estudo mutacional de inserção-deleção do gene *esp* em *E. faecium* demonstraram que, na ausência da enzima Esp na superfície celular há uma redução na aderência inicial ao poliestireno, com conseqüente redução na formação de biofilme. Porém a linhagem mutante para *esp* exibiu um baixo, mas mensurável, grau de adesão inicial o que os levou a sugestão de que outros fatores estejam relacionados com a formação de biofilme.

Marra *et al.* (2007) afirmam que a capacidade de formação de biofilme independe da produção de gelatinase e do gene *esp*, já que foram observados isolados fortes formadores de biofilme sem a expressão de gelatinase e *esp* negativos.

Estudos tem demonstrado a possível relação de outros genes relacionados à virulência com a capacidade de formação de biofilme, entretanto outros pesquisadores afirmam que a formação de biofilme é uma característica comum entre *E. faecalis* (Mohamed *et al.*, 2004; Rosa *et al.*, 2006).

Nallapareddy *et al.* (2006) demonstraram a importância do operon *ebp* e de *srtC* na formação de biofilme por *E. faecalis* OG1RF. Hendrickx *et al.* (2009) descreveram uma nova enzima, SgrA, que parece estar envolvida com a formação de biofilme em poliestireno. Creti *et al.* (2006) identificaram um operon composto de quatro genes envolvidos na formação de biofilme em *E. faecalis*, que foi nomeado *bop* e parece ser regulado pelo sistema Fsr através de quorum-sensing.

Bactérias sob a forma de biofilme são caracterizadas pela grande capacidade de transferência genética, essa afirmação associada a grande incidência de genes de virulência e a disseminada capacidade de formação de biofilme tanto em isolados de origem clínica como isolados de origem alimentar, reforça a preocupação destinada a este gênero, já que os determinantes de virulência encontrados podem ser transferidos com maior facilidade. Essa realidade reitera o questionamento sobre a segurança desses

microrganismos em alimentos e no âmbito clínico sustenta a preocupação sobre o potencial patogênico de isolados de *Enterococcus*.

5.6. Confirmação das espécies *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* por PCR-RFLP do gene 16S rDNA

A correta identificação das espécies de *Enterococcus* é muito importante para a discriminação entre organismos que possuem resistência adquirida à vancomicina, como *E. faecium* e *E. faecalis* de espécies nas quais a resistência a vancomicina é intrinsecamente expressa em baixos níveis, como *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* (Hanson *et al.*, 1999).

Os resultados do PCR-RFLP das linhagens de referência de *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* apresentaram dois fragmentos de DNA de 589 bp e 72 bp após a digestão com a enzima de restrição *Hinfl*. Todas as sequências do 16S rDNA depositadas no GenBank do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) para as espécies *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* apresentavam uma base nitrogenada timina conservada da posição 1248, enquanto outras espécies de *Enterococcus* apresentam uma base nitrogenada citosina ou timina na posição equivalente. Uma única substituição de base nessa posição em *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* eliminou um sítio de restrição para *Hinfl*. O PCR-RFLP de 52 isolados de *Enterococcus* apontou que 53% dos *E. gallinarum* e 75% dos *E. casseliflavus* apresentaram três fragmentos de DNA de 504, 85 e 72 bp demonstrando que esses isolados

foram erroneamente classificados. Essas linhagens foram resubmetidas a novos testes bioquímicos e reclassificados como *E. faecium*, *E. faecalis* e *Enterococcus* sp.

A diferenciação entre espécies é considerada um problema em laboratórios clínicos, já que os métodos usualmente utilizados baseados em características fenotípicas não apresentam a segurança necessária. Além disso, sistemas comerciais de identificação não são seguros para a identificação de *E. gallinarum*, que pode ser de difícil diferenciação das demais espécies, especialmente *E. faecium* (Patel *et al.*, 1998; Hanson *et al.*, 1999).

Patel *et al.* (1998) após análise da sequência de 16S rDNA de várias espécies de *Enterococcus* demonstraram a identificação errônea de dois isolados de *Enterococcus* com características fenotípicas de *E. faecium* e que abrigavam o gene associado a resistência à vancomicina, *vanC-1*, porém os dois isolados tratavam-se de *E. gallinarum* que abriga intrinsecamente esse gene.

Jayarao *et al.* (1992) submeteram 12 espécies bacterianas, incluindo espécies de enterococcus (*E. faecium*, *E. faecalis* e *E. avium*) e *Streptococcus*, a PCR utilizando primers complementares aos genes 16S rRNA, os fragmentos obtidos foram então submetidos a restrição com 11 endonucleases, todas as espécies analisadas puderam ser diferenciadas utilizando a técnica demonstrada no estudo.

McDonald *et al.* (2005) utilizaram o PCR-RFLP de 16S-23S rDNA para a identificação de sete espécies de *Streptococcus* sp. causadores de mastite bovina. Fortina *et al.* (2007) utilizaram o 16S rRNA para identificação de *E.italicus*, baseando-se em regiões de variação no interior do 16S rRNA que permitia a diferenciação de *E.italicus* das demais espécies do gênero o que permitiu o desenvolvimento de primers específicos que amplificam um fragmento de tamanho específico.

6. CONCLUSÕES

1. Os dados obtidos nesse estudo sugerem que amostras de origem alimentar podem abrigar genes de virulência, muitos deles silenciosos, o que reforça o questionamento sobre a segurança desses microrganismos em alimentos.

2. A técnica de PCR permitiu detectar os genes *cyIA* (expressão da enzima citolisina), *agg* (expressão da proteína de agregação), *esp* (expressão da proteína de superfície extracelular), *gelE* (expressão da enzima gelatinase) e *ace* (expressão da proteína de adesão do calágeno), envolvidos com a virulência de *Enterococcus* nas amostras clínicas e alimentares.

3. Os isolados clínicos apresentaram uma maior incidência dos fatores de virulência *agg*, *cyIA* e *esp* do que os alimentares, o que indica uma provável relação destes determinantes com a potencialidade da patogênese de *Enterococcus*.

4. Não houve correlação entre a presença dos genes *gelE* e *cyIA* com suas expressões *in vitro*;

5. O gene *esp* foi encontrado somente nos isolados clínicos e houve variação no tamanho do fragmento obtido por PCR;

6. Uma grande parte dos isolados analisados apresentaram capacidade de formação de biofilme *in vitro*, independente do tipo de amostra na qual foram obtidos.

7. Não houve uma correlação entre os genes analisados e o fenótipo de formação de biofilme dos isolados, porém é possível que os genes *ace* e *gelE* atuem como agentes potencializadores na formação de biofilmes em *Enterococcus*.

8. A técnica de PCR-RFLP mostrou ser uma ferramenta molecular útil na confirmação das espécies *E. casseliflavus* e *E. gallinarum*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRIOUEL, H.; OMAR, N.B; MOLINOS, A.C.; LÓPEZ, R.L.; GRANDE, M.J.; VIEDMA, P.M; ORTEGA, E.; CAÑAMERO, M.M; GALVEZ, A. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. **International Journal of Food Microbiology**. v. 123, p. 38-49, 2008.

AL-AHMAD, A.; MAIER, J.; FOLLO, M.; SPITZMÜLLER, B.; WITTMER, A.; HELLWIG, E.; HÜBNER, J.; JONAS, D. Food-born enterococci integrate into oral biofilm: an in vivo study. **Journal of Endodontics**. v.36, n.11, p.1812-1819, 2010.

BALDASSARRI, L.; CECCHINI, R.; BERTUCCINI, L.; AMMENDOLIA, M.G.; IOSI, F.; ARCIOLA, C.R.; MONTANARO, L.; ROSA, M.D.; GHERARDI, G.; DICUONZO, G.; OREFICI, G.; CRETÌ, R. *Enterococcus* spp. produces slime and survives in rat peritoneal macrophages. **Medical Microbiology and Immunology**. v.190, n.3, p.113-120, 2001.

BARBOSA, J.; GIBBS,P.A.; TEIXEIRA, P. Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in the North of Portugal. **Food Control**. v.21, p.651-656, 2010.

BENDER, E.A.; FREITAS, A.L.P.; BARTH, L.A. Avaliação do perfil de suscetibilidade antimicrobiana de *Enterococcus* spp. isolados em dois hospitais de Porto Alegre-RS, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira Análises Clínicas*. v.42, n.1, p.15-19,2010.

BITTENCOURT, E.; SUZART, S. Occurrence of virulence-associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina, Brazil. **Journal of Medical Microbiology**. v.53, p.1069-1073, 2004.

CAMARGO, I.L.B. **Estudo dos fatores de virulência em *Enterococcus* sp. isolados no Brasil.** Ribeirão Preto: USP, 2005.

CARIOLATO, D.; ANDRIGHETTO, C.; LOMBARDI, A. Occurrence of virulence factors and antibiotic resistances in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* collected from dairy and human samples in North Italy. **Food Control.** v.19, p. 886-892, 2008.

CHOW, J.W.; THAL, L.A.; PERRI, M.B.; VAZQUEZ, J.A.; DONABEDIAN, S.M.; CLEWELL, D.B.; ZERVOS, M.J. Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** v.37, n.11; p.2474-2477, 1993.

COBURN, P.S.; GILMORE, M.S. The *Enterococcus faecalis* cytolysin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. **Cellular Microbiology.** v.5, n.10, p.661-669, 2003.

COBURN, P.S.; PILLAR, C.M.; JETT, B.D.; HAAS, W.; GILMORE, M.S. *Enterococcus faecalis* senses target cells and in response express cytolysin. **Science.** v.306, n.5705, p.2270-2272, 2004.

CRETI, R.; IMPERI, M.; BERTUCCINI, L.; FABRETTI, F.; OREFICI, G.; BALDASSARRI, L. Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different source. **Journal of Medical Microbiology.** v.53, p.13-20, 2006.

D'AZEVEDO, P.A.; DIAS, C.A.G.; LEMOS, S.K.; BITTENCOURT, J.A.F.; TEIXEIRA, L.M. Antimicrobial susceptibility among *Enterococcus* isolates from the city of Porto Alegre, RS, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology.** v.35, p.199-204, 2004.

D'AZEVEDO, P.A.; DIAS, C.A.G.; TEIXEIRA, L.M. Genetic diversity and antimicrobial resistance of enterococcal isolates from southern region of Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.** v.48, n.1, p.11-16, 2006.

DAVEY, M.E.; O'TOOLE, G.A. Microbial Biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.** v.64, n.4, p.847-867, 2000.

DAY, A.M.; COVE, J.H.; JONES, M.K.P. Cytolysin gene expression in *Enterococcus faecalis* is regulated in response to aerobiosis conditions. **Mol Gen Genomics**. v. 269, p.31-39, 2003.

DEVRIESE, L.A.; POT, B.; DAMME, L.V.; KERSTERS, K.; HAESBROUCK, F. Identification of *Enterococcus* species isolated from foods of animal origin. **International Journal of Food Microbiology**. v.26, p.187-197, 1995.

DEWANTI, R.; WONG, A.C.L. Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. **International Journal of Food Microbiology**. n.26, p.147-164, 1995.

DUPONT, H.; VAEL, C.; MULLER-SERIEYS, C.; CHOSIDOW, D.; MANTZ, J.; MARMUSE, J.P.; ANDREMONT, A.; GOOSSENS, H.; DESMONTS, J.M. Prospective evaluation of virulence factors of enterococci isolated from patients with peritonitis: impact on outcome. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**. v.60, p.247-253, 2008.

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

EUZÉBY, J.P. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature- Genus *Enterococcus*. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/e/enterococcus.html>. Acesso em 11 de janeiro de 2011.

FACKLAM, RR, CARVALHO, MGS, TEIXEIRA, LM. History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of enterococci. In *The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*. Eds, Washington: ASM Press; 2002. p 1-54.

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

FORTINA, M.G.; RICCI, G.; BORGIO, F.; MANACHINI, P.L. Rapid identification of *Enterococcus italicus* by PCR with primers targeted to 16S rRNA gene. **Applied Microbiology**. v.44, p.443-446, 2007.

FOULQUIÈ-MORENO, M.R.F.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E.; VUYST, L.D. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**. v.106, p.1-24, 2006.

FRACALLANZA, S.A.P.; SCHEIDEGGER, E.M.D.; SANTOS, P.F.D.; LEITE, P.C.; TEIXEIRA, L.M. Antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from poultry, meat and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.102, n.7, p.853-859, 2007.

FRANZ, C.M.A.P.; HOLZPFEL, W.H.; STILES, M.E. Enterococci at the crossroads of food safety? **International Journal of Food Microbiology**. v.47, p.1-24, 1999.

FRANZ, C.M.A.P.; MUSCHOLL-SILBERHORN, A.B.; YOUSIF, N.M.K.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J.; HOLZAPFEL, W.H. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. **Applied and Environmental Microbiology**. v.67, n.9, p.4385-4389, 2001.

FRANZ, C.M.A.P.; STILES, M.E.; SCHLEIFER, K.H.; HOLZAPFEL, W. Enterococci in food: a conundrum for food safety. **International Journal of Food Microbiology**. v.88, n.2, p.105-122, 2003.

FRAZZON, A.P.G.; GAMA, B.A.; HERMES, V.; BIERHALS, C.G.; PEREIRA, R.I.; GUEDES, A.G.; D'AZEVEDO, P.A.; FRAZZON, J. Prevalence of antimicrobial resistance and molecular characterization of tetracycline resistance mediated by *tet(M)* and *tet(L)* genes in *Enterococcus* spp. isolated from food in Southern Brazil. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v.26, p.365-370, 2010.

FREDRICKS, D.N.; RELMAN, D.A. Improved Amplification of Microbial DNA from blood cultures by removal of the PCR inhibitor sodium polyanetholesulfanate. **Journal of Clinical Microbiology**. v.36, n.10, p.2810-2816, 1998.

FURTADO, G.H.C.; MARTINS, S.T.; COUTINHO, A.P.; SOARES, G.M.M.; WEY, S.B.; MEDEIROS, E.A.S. Incidence of vancomycin-resistant *Enterococcus* at a university hospital in Brazil. **Revista de Saúde Pública**. v.39, n.1, p.1-5, 2005.

FURUMURA, M.T.; FIGUEIREDO, P.M.S.; CARBONELL, G.V.; DARINI, A.L.C.; YANO, T. Virulence-associated characteristics of *Enterococcus faecalis* strains isolated from clinical sources. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.37, p.230-236, 2006.

GALLARDO-MORENO, A.M.; GONZÁLEZ-MARTIN, M.L.; PÉREZ-GIRALDO, C.; BRUQUE, J.M.; GÓMEZ-GARCIA, A.C. Serum as a factor influencing adhesion of *Enterococcus faecalis* to glass and silicone. **Applied Environmental Microbiology**. v.68, n.11, p.5784-5787, 2002.

GIRAFFA, G. Enterococci in foods. **FEMS Microbiology**. v.26, p.163-171, 2002.

GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**. v.88, p. 215-222, 2003.

GOMES, B.C.; ESTEVES, C.T.; PALAZZO, I.C.V.; DARINI, A.L.C.; FELIS, G.E.; SECHI, L.A.; FRANCO, B.D.G.M.; MARTINIS, E.C.P. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. **Food Microbiology**. v.25, p.668-675, 2008.

HAAS, W.; GILMORE, M.S. Molecular nature of a novel bacterial toxin: the cytolysin of *Enterococcus faecalis*. **Medical Microbiology Immunology**. v.187, p.183-190, 1999.

HAAS, W.; SHEPARD, B.D.; GILMORE, M.S. Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction. **Nature**. v.415, p.84-85, 2002.

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

HANSON, K.L.; CARTWRIGHT, C.P. Comparison of simple and rapid method for identifying enterococci intrinsically resistant to vancomycin. **Journal of Clinical Microbiology**. v.37, n.3, p.815-817, 1999.

HAYES, J.R.; ENGLISH, L.L.; CARTER, P.J.; PROESCHOLDT, T.; LEE, Y.L.; WAGNER, D.D.; WHITE, D.G. Prevalence and antimicrobial resistance of

Enterococcus species isolated from retail meats. **Applied and Environmental Microbiology**. v.69, n.12, p.7153-7160, 2003.

HEINKENS, E.; BONTEN, M.J.M.; WILLEMS, R.J.L. Enterococcal surface protein Esp is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162. **Journal of Bacteriology**. v.189, n.22, p.8233-8240, 2007.

HENDRICKX, A.P.A.; LUIT-ASBROCK, M.V.; SCHAPENDONK, C.M.E.; WAMEL, W.J.B.V.; BRAAT, J.C.; WIJNANDS, L.M.; BONTEN, M.J.M.; WILLEMS, R.J.L. SgrA, a Nidogen-Binding LPTXTG surface adhesin implicated in biofilm formation, and EcbA, a collagen binding MSCRAMM, are two novel adhesins of hospital-acquired *Enterococcus faecium*. **Infection and Immunity**. v.77, n.11, p.5097-5106, 2009.

HÖRNER, R.; LISCANO, M.G.H.; MARASCHIN, M.M.; SALLA, A.; MENEGHETTI, B.; FRASSON, N.L.; RIGHI, R.A. Suscetibilidade antimicrobiana entre amostras de *Enterococcus* isoladas no Hospital Universitário de Santa Maria. **Journal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v.41, n.6, p.391-395, 2005.

HUBBLE, T.S.; HATTON, J.F.; NALLAPAREDDY, S.R.; MURRAY, B.E.; GILLESPIE, M.J. Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. **Oral Microbiology and Immunology**. v.18, n.2, p.121-126, 2003.

JAYARAO, B.M.; DORE, J.J.; OLIVER, S.P. Restriction fragment length polymorphisms analysis of 16S ribosomal DNA of *Streptococcus* and *Enterococcus* species of bovine origin. **Journal of Clinical Microbiology**. v.30, p.2235-2240, 1992.

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

JETT, B.D.; JENSEN, H.G.; NORDQUIST, R.E.; GILMORE, M.S. Contribution of the pAD1-encoded cytolysin to the severity of experimental *Enterococcus faecalis* endophthalmitis. **Infection and Immunity**. v.60, n.6, p. 2445-2452, 1992.

KAYSER, F.H. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. **International Journal of Food Microbiology**. v.88, p.255-262, 2003.

KLEIN, G. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. **International Journal of Food Microbiology**. v.88, p.123-131, 2003.

KLEIN, G.; PACK, A.; BONAPARTE, C.; REUTER, G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**. v.41, n.2, p.103-125, 1998.

KOCH, S.; HUFNAGEL, M.; THEILACKER, C.; HUEBNER, J. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. **Vaccine**. v.22, p.822-830, 2004.

KUMAR, C.G.; ANAND, S.K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**. v.42, p. 9-27, 1998.

KRISTICH, C.J.; LI, Y.H.; CVITKOVITCH, D.G.; DUNNY, G.M. Esp-independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. **Journal of Bacteriology**. v.186, n.1, p.154-163, 2004.

LEBRETON, F.; RIBOULET-BISSON, E.; SERROR, P.; SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; TORELLI, R.; HARTKE, A.; AUFRAY, Y.; GIARD, J.C. *ace*, which encodes an adhesin in *Enterococcus faecalis*, is regulated by Ers and is involved in virulence. **Infection and Immunity**. v.77, n.7, p.2832-2839, 2009.

LECRERCQ, R. Epidemiological and resistance issues in multidrug-resistant staphylococci and enterococci. **Clinical Microbiology and Infections**. v.15, n.3, 2009.

LOPES, M.F.S.; SIMÕES, A.P.; TENREIRO, R.; MARQUES, J.J.F.; CRESPO, M.T.B. Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci. **International Journal of Food Microbiology**. v.112, p.208-214, 2006.

MACGOWAN, L.L.; JACKSON, C.R.; BARRET, J.B.; HIOTT, L.M.; FEDORKA-CRAY, P.J. Prevalence and antimicrobial resistance of enterococci isolated from retail fruits, vegetables, and meats. **Journal of Food Protection**. v.69, n.12, p.2976-2982, 2006.

MACOVEI, L.; GHOSH, A.; THOMAS, V.C.; HANCOCK, L.E.; MAHMOOD, S.; ZUREK, L. *Enterococcus faecalis* with the gelatinase phenotype regulated by the *fsr* operon and with biofilm-forming capacity are common in the agriculture environment. **Environmental Microbiology**. v. 11, n.6, p. 1540-1547, 2008.

MAH, T.F.C.; O'TOOLE, G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **TRENDS in Microbiology**. v.9, n.1, p.34-38, 2001.

MANNU, L.; PABA, A.; DAGA, E.; COMUNIAN, R.; ZANETTI, S.; DUPRÈ, I.; SECHI, L.A. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. **International Journal of Food Microbiology**. v.88, p.291-304, 2003.

MARINHO, A.R. **Avaliação genotípica e fenotípica de fatores relacionados na formação de biofilme por *Enterococcus* isolados de alimentos: diferentes condições de crescimento, produção de gelatinase, influência dos genes *fsrABC*, *gelE* e *sprE***. Porto Alegre: UFRGS, 2010.

MARRA, A.; DIB-HAJJ, F.; LAMB, L.; KACZMAREK, F.; SHANG, W.; BECKIUS, G.; MILICI, A.J.; MEDINA, I.; GOOTZ, T.D. Enterococcal virulence determinants may be involved in resistance to clinical therapy. **Diagnostic Microbiology**. v.58, p.59-65, 2007.

MARTIN, B.; GARRIGA, M.; HUGAS, M.; AYMERICH, T. Genetic diversity and safety aspects of enterococci from slightly fermented sausages. **Journal of Applied Microbiology**. v.98, p.1177-1190, 2005.

MCDONALD, W.L.; FRY, B.N.; DEIGHTON, M.A. Identification of *Streptococcus* spp. causing bovine mastitis by PCR-RFLP of 16S-23S ribosomal DNA. **Veterinary Microbiology**. v.111, p.241-246, 2005.

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

MOHAMED, J.A.; HUANG, W.H.; NALLAPAREDDY, S.R.; TENG, F.; MURRAY, B.E. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. **Infection and Immunity**. v.72, n.6, p.3658-3663, 2004.

MUNDY, L.M.; SAHM, D.F.; GILMORE, M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**. v.13, n.6, p.513-522, 2000.

MURRAY, B.E. The life and times of the *Enterococcus*. **Clinical Microbiology Reviews**. v.3, n.1, p.46-65, 1990.

NAKAYAMA, J.; KARIYAMA, R.; KUMON, H. Description of a 23.9-Kilobase Chromosomal Deletion Containing a Region Encoding **fsr** Genes Which Mainly Determines the Gelatinase-Negative Phenotype of Clinical Isolates of **Enterococcus faecalis** in Urine. **Applied and Environmental Microbiology**. v.68, n.6, p.3152-3155, 2002.

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

NALLAPAREDY, S.R.; QIN, X.; WEINSTOCK, G.M.; HÖÖK, M.; MURRAY, B.E. *Enterococcus faecalis* adhesion, Ace, attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. **Infection and Immunity**. n.68, v.9, p.5218-5224, 2000.

NALLAPAREDY, S.R.; SINGH, K.V.; DUH, R.W.; WEINSTOCK, G.M.; MURRAY, B.E. Diversity of ace, a gene encoding a microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules, from different strains of *Enterococcus faecalis* and evidence for production of Ace during human infections. **Infection and Immunity**. v.68, n.9, p.5210-5217, 2000.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H.B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Reviews Microbiology**. v.54, p.49-79, 2000.

OGIER, J.C.; SERROR, P. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. **International Journal of Food Microbiology**. v.126, p. 291-301, 2008.

PALMER, J.; FLINT, S.; BROOKS, J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v.34, n.9, p.577-588, 2007.

PARADELLA, T.C.; KOGA-ITO, C.Y.; JORGE, A.O.C. *Enterococcus faecalis*: considerações clínicas e microbiológicas. **Revista de Odontologia da UNESP**. v.36, n.4, p.163-168, 2007.

PATEL, R. Clinical impact of vancomycin-resistant enterococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.51, n.3, p.13-21, 2003.

PATEL, R.; UHL, J.R.; HORNER, P.; HOPKINS, M.K.; STECKELBERG, J.M., KLINE, B.; COCKERILL II, F.R. DNA sequence variation within *vanA*, *vanB*, *vanC-1*, and *vanC-2/3* genes of clinical *Enterococcus* isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.42, n.1, p.202-205, 1998.

QIN, X.; SINGH, K.V.; WEINSTOCK, G.M.; MURRAY, B.E. Characterization of *fsr*, a Regulator Controlling Expression of Gelatinase and Serine Protease in *Enterococcus faecalis* OG1RF. **Journal of Bacteriology**. v.183, n.11, p.3372-3382, 2001.

QIN, X.; SINGH, K.V.; WEINSTOCK, G.M.; MURRAY, B.E. Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* Genes on Production of Gelatinase and a Serine Protease and Virulence. **Infection and Immunity**. v.68, n.5, p.2579-2586, 2000.

RAAD, I.I.; HANNA, H.A.; BOKTOUR, M.; CHAIBAN, G.; HACHEN, R.Y.; DVORAK, T.; LEWIS, R.; MURRAY, B.E. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: Catheter Colonization, *esp* gene, and decreased susceptibility to antibiotics in biofilm. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.49, n.12, p.5046-5050, 2005.

RIBOLDI, G.P.; FRAZZON, J.; D'AZEVEDO, P.A.; FRAZZON, A.P.G. Antimicrobial resistance profile of *Enterococcus* spp. isolated from food in Southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.40, p.125-128, 2009.

ROSA, R.D.; CRETI, R.; VENDITTI, M.; D'AMELIO, R.; ARCIOLA, C.R.; MONTANARO, L.; BALDASSARRI, L. Relationship between biofilm formation, the enterococcal surface protein (Esp) and gelatinase in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Femms Microbiology letters*, v.256, p.145-150, 2006.

SANDOE, J.A.T.; WITHERDEN, I.A.; COVE, J.H.; HERITAGE, J.; WILCOX, M.H. Correlation between enterococcal biofilm formation *in vitro* and medical-

device-related infection potential *in vivo*. **Journal of Medical Microbiology**. v.52, p.547-550, 2003.

SCHLIEVERT, P.M.; GAHR, P.J.; ASSIMACOPOULOS, A.P.; DINGES, M.M.; STOEHR, J.A.; HARMALA, J.W.; HIRT, H.; DUNNY, G.M. Aggregation and binding substances enhance pathogenicity in rabbit models of *Enterococcus faecalis* endocarditis. **Infection and Immunity**. v.66, n.1, p.218-223, 1998.

SEMEDO, T.; SANTOS, M.A.; MARTINS, P.; LOPES, M.F.S.; MARQUES, J.J.F.; TENREIRO, R.; CRESPO, M.T.B. Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in Enterococci. **Journal of Clinical Microbiology**. v.41, n.6, p.2569-2576, 2003.

SENO, Y.; KARIYAMA, R.; MITSUHATA, R.; MONDEN, K.; KUMON, H. Clinical implications of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in the urinary tract. *Acta Medica Okayama*. v.59, n.3, p.79-87, 2005.

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

SHANKAR, N.; LOCKATELL, C.V.; BAGHDAYAN, A.S.; DRACHENBERG, C.; GILMORE, M.S.; JOHNSON, D.E. Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Infection and Immunity*. v.69, n.7, p.4366-4372, 2001.

SHANKAR, V.; BAGHDAYAN, A.S.; HUYCKE, M.; LINDAHL, G.; GILMORE, M.S. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. **Infection Immunity**. v.67, n.1, p.193-200, 1999.

SINGH, K.V.; NALLAPAREDDY, S.R.; SILLANPÄÄ, J.; MURRAY, B.E. Importance of the collagen adhesin Ace in pathogenesis and protection against *Enterococcus faecalis* experimental endocarditis. **PloS Pathogens**. v.6, n.1, p.1-13, 2010.

SINGH, R.; PAUL, D.; JAIN, R. Biofilms: implications in bioremediation. **TRENDS in Microbiology**. v.14, n.9, 2006.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*. v.40, p.175-179, 2000.

SÜBMUTTI, S.D.; MUSCHOLL-SILBERHORN, A.; WIRTH, R.; SUSAN, M.; MARRE, R.; ROZDZINSKI, E. Aggregation substance promotes adherence, phagocytosis, and intracellular survival of *Enterococcus faecalis* within human macrophages and suppresses respiratory burst. **Infection and Immunity**. v.68, n.9, p.4900-4906, 2000.

TITZE-DE-ALMEIDA, R.; ROLLO, M.; SILVEIRA, C.A.; RODRIGUES, I.P.; EUDES, J.; NASCIMENTO, R.S.; FERREIRA, R.F.; MORAES, L.M.P.; BOELEN, H.; BELKUM, A.V.; FELIPE, M.S.S. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of enterococci recovered from Brazilian intensive care units. **Brazilian Journal of Infections Diseases**. v.8, n.3, p. 197-205, 2004.

TOLEDO-ARANA, A.; VALLE, J.; SOLANO, C.; ARRIZUBIETA, M.J.; CUCARELLA, C.; LAMATA, M.; AMORENA, B.; LEIVA, J.; PENADÉS, J.R.; LASA, I. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. **Applied and Environmental Microbiology**. v.67, n.10, p.4538-4545, 2001.

UPADHYAYA, P.M.; RAVIKUMAR, K.L.; UMAPATHY, B.L. Review of virulence factors of enterococci: an emerging nosocomial pathogen. **Indian Journal of Medical Microbiology**. v.27, n.4, p.301-305, 2009.

UPADHYAYA, P.M.; UMAPATHY, B.L.; RAVIKUMAR, K.L. Comparative study for the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin and biofilm among clinical and commensal isolates of *Enterococcus faecalis*. **Journal of Laboratory Physicians**. v.2, n.2, p.100-104, 2010.

VALENZUELA, A.S.; OMAR, N.B.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R.L.; ORTEGA, E.; CAÑAMERO, M.M.; GÁLVEZ, A. Risk factors in enterococci isolated from foods in Morocco: Determination of antimicrobial resistance and incidence of virulence traits. **Food and Chemical Toxicology**. V.46, p. 2648-2652, 2008.

VALENZUELA, A.S.; OMAR, N.B.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R.L.; VELJOVIC, K.; CAÑAMERO, M.M.; TOPISIROVIC, M.K.L.; GÁLVEZ, A. Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in enterococci from artisan foods of animal origin. *Food Control*. v.20, n.4. p.381-385, 2009.

VINDGNI, S.M.; SRIJAN, A.; WONGSTITWILAIROONG, B.; MARCUS, R.; MEEK, J.; RILEY, P.L.; MASON, C. Prevalence of foodborne microorganisms in retail foods in Thailand. **Foodborne Pathogens and Disease**. v.4, n.2, p.208-215, 2007.

WILLEMS, R.J.L.; HOMAN, W.; TOP, J.; SANTEN-VERHEUVEL, M.V.; TRIBE, D.; MANZIOROS, X.; GALLIARD, C.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M.J.E.; MASCINI, E.M.; KREGTEN, E.V.; EMBDEN, J.D.A.V.; BONTEN, M.J.M. Variant *esp* gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. **Lancet**. v.357, p.853-855, 2001.

8. APÊNDICES

QUADRO 1: Origem e espécie dos isolados de *Enterococcus* utilizados no estudo.

Classe	Origem do isolamento	Espécies	Nº de amostras
Amostras de origem alimentar	Carne de frango	<i>E. faecium</i>	6
	Carne de frango	<i>E. faecalis</i>	20
	Carne de frango	<i>E. gallinarum</i>	1
	Carne de Porco	<i>E. faecium</i>	3
	Carne de Porco	<i>E. faecalis</i>	2
	Queijo Colonial	<i>E. faecium</i>	2
	Queijo Colonial	<i>E. faecalis</i>	3
	Mussarela	<i>E. faecium</i>	1
	Mussarela	<i>E. faecalis</i>	6
	Ricota	<i>E. faecalis</i>	6
	Batata	<i>E. faecalis</i>	7
	Beterraba	<i>E. faecium</i>	1
	Beterraba	<i>E. faecalis</i>	4
	Cenoura	<i>E. faecalis</i>	4
	Mandioca	<i>E. faecium</i>	1
	Mandioca	<i>E. faecalis</i>	2
	Tempero Verde	<i>E. faecalis</i>	1
	Urina	<i>E. faecium</i>	1

Continuação. QUADRO 1: Origem e espécie dos isolados de *Enterococcus* utilizados no estudo.

Amostras de origem clínica	Urina	<i>E. faecalis</i>	44
	Urina	<i>Enterococcus</i>	1
	Sangue	<i>E. faecalis</i>	3
	Cateter	<i>E. faecalis</i>	1
	Sec. peritoneal	<i>E. faecalis</i>	1
	Sec. cervical	<i>E. faecalis</i>	1
	Fezes	<i>E. faecium</i>	1
	Escarro	<i>E. faecalis</i>	1
	Sítio desconhecido	<i>E. faecalis</i>	6
	Sítio desconhecido	<i>Enterococcus</i>	6
		Total	136

QUADRO 2: Origem, espécie, presença dos *gelE*, *esp*, *agg*, *ace*, *cylA*, atividade gelatinolítica e citolítica e capacidade de formação de biofilme dos isolados de *Enterococcus* sp. provenientes de alimentos.

Isolado	Origem	Espécie	<i>gelE</i>	GelE	<i>esp</i>	<i>agg</i>	<i>ace</i>	<i>cylA</i>	CylA	Biofilm
E9	Sal porco	<i>E. faecalis</i>	+	+	-	-	+	-	-	F
C3	Ricota	<i>E. faecalis</i>	+	+	-	-	+	-	-	M
C7	Cenoura	<i>E. faecalis</i>	+	+	-	-	+	-	-	M
C11	Batata	<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	F
C12	Batata	<i>E. faecalis</i>	+	+	-	+	+	-	-	M
T2	Mozzarella	<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	F
T1	Mozzarella	<i>E. faecium</i>	+	+	-	-	+	-	-	F
6	Carcassa frango	<i>E. faecium</i>	-	-	-	-	+	-	-	F

Continuação QUADRO 2: Origem, espécie, presença dos *gelE*, *esp*, *agg*, *ace*, *cyIA*, atividade gelatinolítica e citolítica e capacidade de formação de biofilme dos isolados de *Enterococcus* provenientes de alimentos.

E10	Sal porco	<i>E. faecium</i>	+	+	-	-	-	-	-	F
C13	Batata	<i>E. faecalis</i>	+	+	-	+	+	-	-	F
E1	Batata	<i>E. faecalis</i>	-	-	-	+	+	-	-	M
E2	Batata	<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	+	-	-	F
E3	Batata	<i>E. faecalis</i>	+	+	-	-	+	-	-	F
E7	Sal frango	<i>E. faecalis</i>	+	+	-	-	+	-	-	F
E8	Sal frango	<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	F
A6	Queijo colonial	<i>E. faecalis</i>	+	+	-	-	+	-	-	F
A8	„	<i>E. faecalis</i>	+	+	-	-	-	-	-	F
A9	„	<i>E. faecium</i>	+	+	-	-	+	-	-	M
B7	Beterraba	<i>E. faecalis</i>	+	+	-	-	+	-	-	F
B8	Beterraba	<i>E. faecium</i>	+	+	-	-	+	-	-	M
E14	Mandioca	<i>E. faecium</i>	+	+	-	-	+	-	-	F
E12	Ricota	<i>E. faecalis</i>	+	+	-	+	+	-	-	F
E4	Batata	<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	+	-	-	F
E5	Empanado frango	<i>E. faecalis</i>	+	+	-	-	+	-	-	M
E6	Sal frango	<i>E. faecium</i>	-	-	-	-	+	-	-	F
E17	Carne porco	<i>E. faecalis</i>	+	+	-	-	+	-	-	F
E18	Frango carcassa	<i>E. faecalis</i>	+	+	-	+	+	-	-	F
E15	Carne de porco	<i>E. faecium</i>	+	+	-	-	+	-	-	F
G5	Queijo colonial	<i>E. faecium</i>	+	+	-	-	-	-	-	M
G7	Tempero verde	<i>E. faecalis</i>	+	+	-	-	+	-	-	F
G10	Mozzarella	<i>E. faecalis</i>	+	+	-	-	+	-	-	M

Continuação QUADRO 2: Origem, espécie, presença dos *gelE*, *esp*, *agg*, *ace*, *cyIA*, atividade gelatinolítica e citolítica e capacidade de formação de biofilme dos isolados de *Enterococcus* provenientes de alimentos.

G9	Mozzarella	<i>E. faecalis</i>	+	+	-	-	+	-	-	M
G8	Mozzarella	<i>E. faecalis</i>	+	+	-	-	+	-	-	F
G6	Queijo colonial	<i>E. faecalis</i>	+	+	-	-	+	-	-	F
G11	Mozzarella	<i>E. faecalis</i>	-	-	-	+	+	-	-	NF
G12	Mozzarella	<i>E. faecalis</i>	+	+	-	-	+	-	-	FR
G4	Frango carcassa	<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	+	-	-	F
E16	Carne de porco	<i>E. faecium</i>	+	+	-	-	+	-	-	FR
E13	Mandioca	<i>E. faecalis</i>	+	+	-	-	+	-	-	FR
23	Mandioca	<i>E. faecalis</i>	+	+	-	-	-	-	-	M
C10	Cenoura	<i>E. faecalis</i>	+	+	-	+	-	-	-	F
E11	Ricota	<i>E. faecalis</i>	+	+	-	-	+	-	-	NF
G2	Ricota	<i>E. faecalis</i>	-	-	-	+	+	-	-	F
B2	Beterraba	<i>E. faecalis</i>	+	+	-	-	+	-	-	M
9	Cenoura	<i>E. faecalis</i>	+	+	-	-	+	-	-	F
4	Ricota	<i>E. faecalis</i>	+	+	-	-	+	-	-	F
C8	Cenoura	<i>E. faecalis</i>	+	+	-	-	-	-	-	F
91	Beterraba	<i>E. faecalis</i>	+	+	-	-	+	-	-	F
B1	Beterraba	<i>E. faecalis</i>	+	+	-	-	+	-	-	M
C2	Ricota	<i>E. faecalis</i>	+	+	-	-	-	-	-	M
5	Frango carcassa	<i>E. faecalis</i>	+	+	-	-	+	-	-	F
1	Frango	<i>E. faecium</i>	+	-	-	-	-	-	-	M

Continuação QUADRO 2: Origem, espécie, presença dos *gelE*, *esp*, *agg*, *ace*, *cyIA*, atividade gelatinolítica e citolítica e capacidade de formação de biofilme dos isolados de *Enterococcus* provenientes de alimentos.

2	„	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	-	-	-	-	M
3	„	<i>E. faecium</i>	+	-	-	-	-	-	-	M
4	„	<i>E. faecalis</i>	+	+	-	-	-	-	-	F
5	„	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	-	-	-	-	F
6	„	<i>E. faecium</i>	+	-	-	-	+	+	+	F
7	„	<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	F
8	„	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	+	-	+	-	M
9	„	<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	M
10	„	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	+	-	-	-	M
11	„	<i>E. gallinarum</i>	+	+	-	-	+	-	-	F
12	„	<i>E. faecium</i>	+	+	-	-	+	-	-	FR
13	„	<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	+	+	+	F
14	„	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	-	+	+	+	F
15	„	<i>E. faecalis</i>	+	+	-	-	+	-	-	FR
16	„	<i>E. faecalis</i>	+	+	-	+	+	+	-	FR
17	„	<i>E. faecalis</i>	+	+	-	-	+	-	-	FR
18	„	<i>E. faecalis</i>	+	+	-	+	+	-	-	NF
19	„	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	-	+	-	-	FR

*NF: Não-formador de biofilme, FR: Fraco formador de biofilme, M: Moderado formador de biofilme, F: Forte formador de biofilme.

QUADRO 3: Origem, espécie, presença dos *gelE*, *esp*, *agg*, *ace*, *cylA*, atividade gelatinolítica e citolítica e capacidade de formação de biofilme dos isolados de *Enterococcus* provenientes de amostras clínicas.

Isolado	Origem	espécie	gelE	GelE	esp	agg	ace	cylA	CylA	Biofilme
133	Desconhecida	<i>Enterococcus</i> sp.	-	-	-	-	-	-	+	NF
151	Urina	<i>E. faecalis</i>	+	-	+	-	+	+	-	F
155	Desconhecida	<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	F
296	Sangue	<i>E. faecalis</i>	-	-	+	-	-	+	-	F
322	Urina	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	-	+	-	-	M
323	Fezes	<i>E. faecium</i>	-	-	-	-	-	-	+	NF
485	Desconhecida	<i>Enterococcus</i> sp.	+	-	+	-	+	+	-	F
488	Urina	<i>E. faecalis</i>	-	-	-	+	-	+	-	FR
497	Urina	<i>E. faecalis</i>	+	-	+	+	-	+	+	F
498	Urina	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	+	+	+	+	F
507	Urina	<i>E. faecalis</i>	+	-	+	+	+	+	+	F
510	Sangue	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	-	+	-	-	F
523	Urina	<i>E. faecalis</i>	+	-	+	+	+	+	-	M
529	Urina	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	+	+	-	F
546	Sangue	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	+	+	-	F
555	Cateter	<i>E. faecalis</i>	-	-	+	-	-	+	+	F
570	Urina	<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	+	+	-	F
572	Urina	<i>E. faecalis</i>	-	-	+	-	-	-	-	F
574	Urina	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	-	-	-	F
581	Urina	<i>E. faecalis</i>	+	+	-	+	+	-	-	F

Continuação. QUADRO 3: Origem, espécie, presença dos *gelE*, *esp*, *agg*, *ace*, *cyIA*, atividade gelatinolítica e citolítica e capacidade de formação de biofilme dos isolados de *Enterococcus* provenientes de amostras clínicas.

586	Urina	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	+	+	-	-	F
591	Urina	<i>E. faecalis</i>	+	-	+	-	-	+	-	F
593	Urina	<i>E. faecalis</i>	+	-	+	-	-	-	-	F
595	Urina	<i>E. faecalis</i>	+	+	-	+	-	+	-	F
598	Urina	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	+	-	-	F
599	Urina	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	-	-	-	F
603	Urina	<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	FR
606	Sec.peritonial	<i>E. faecalis</i>	-	-	+	-	+	+	+	F
609	Desconhecida	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	-	-	-	-	F
612	Sec. Cervical	<i>E. faecalis</i>	+	+	-	+	+	+	-	F
616	Urina	Faecium	-	-	-	+	+	+	-	F
617	Urina	<i>E. faecalis</i>	-	-	+	-	-	-	-	FR
619	Urina	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	-	+	-	-	F
621	Urina	<i>E. faecalis</i>	+	-	+	-	+	-	-	F
623	Urina	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	+	+	-	M
624	Urina	<i>Enterococcus</i> sp.	+	-	-	+	-	-	-	F
625	Urina	<i>E. faecalis</i>	+	-	+	+	+	-	-	M
630	Desconhecida	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	+	+	-	F
632	Urina	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	+	-	-	M
633	Urina	<i>E. faecalis</i>	+	-	+	+	+	-	-	F
637	Urina	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	+	-	-	F
640	Urina	<i>E. faecalis</i>	-	-	-	+	+	+	-	F

Continuação. QUADRO 3: Origem, espécie, presença dos *gelE*, *esp*, *agg*, *ace*, *cyIA*, atividade gelatinolítica e citolítica e capacidade de formação de biofilme dos isolados de *Enterococcus* provenientes de amostras clínicas.

1220	Escarro	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	+	+	-	F
1225	Urina	<i>E. faecalis</i>	-	-	+	+	+	+	-	F
1233	Urina	<i>E. faecalis</i>	+	-	+	+	+	+	-	F
1240	Urina	<i>E. faecalis</i>	+	+	-	+	+	-	-	F
1244	Desconhecida	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	-	+	-	-	F
1246	Desconhecida	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	-	+	-	-	F
1247	Urina	<i>E. faecalis</i>	+	-	+	-	+	+	-	F
1251	Urina	<i>E. faecalis</i>	+	-	+	-	+	-	-	F
1252	Urina	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	-	+	+	+	F
1255	Urina	<i>E. faecalis</i>	+	-	+	-	+	-	-	F
1260	Urina	<i>E. faecalis</i>	+	-	+	-	+	-	-	F
1269	Urina	<i>E. faecalis</i>	+	-	+	+	+	+	+	F
1280	Urina	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	+	+	-	F
1291	Urina	<i>E. faecalis</i>	+	-	+	+	+	+	-	F
1293	Urina	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	-	-	+	-	F
1294	Urina	<i>E. faecalis</i>	+	-	+	-	+	-	-	F
1300	Urina	<i>E. faecalis</i>	-	-	-	+	+	+	-	F
1310	Urina	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	+	+	+	-	F
1313	Desconhecida	<i>E. faecalis</i>	-	-	-	+	+	+	-	F
1316	Urina	<i>E. faecalis</i>	+	-	-	+	+	+	+	F
1272	Desconhecida	<i>Enterococcus</i> sp.	+	+	+	-	+	+	-	F
1276	Desconhecida	<i>Enterococcus</i> sp.	+	-	+	+	+	+	-	F
610	Desconhecida	<i>Enterococcus</i> sp.	+	+	+	+	-	-	-	F
631	Desconhecida	<i>Enterococcus</i> sp.	+	-	-	+	+	-	-	F

*NF: Não-formador de biofilme, FR: Fraco formador de biofilme, M: Moderado formador de biofilme, F: Forte formador de biofilme.

Meios de Cultura e soluções

- Meio de Cultura Brain Heart Infusion (BHI)

37g de ágar BHI

1000ml de água destilada

- Meio de Cultura BHI + NaCl 6,5%

37g de ágar BHI

65g de Cloreto de Sódio (NaCl)

1000ml de água destilada

- Meio de Cultura BHI + gelatina 4%

37g de ágar BHI

1,4g de gelatina

1000ml de água destilada

- Meio de Cultura ágar Müller-Hinton+ Sangue de carneiro 5%

38g de ágar Muller-Hinton

50ml de sangue de carneiro desfibrinado

1000ml de água destilada

- Solução de estoque de microrganismos

10% (p/v) de leite desnatado Molico

10% (p/v) glicerol congelados

- Solução Salina 0,9%

90g NaCl

1000ml de água destilada

- SDS (Dodecil Sulfato de Sódio)

50g de SDS

500 mL de água destilada

- Tampão TAE 50x

242g de Tris

57,1 ml de ácido acético glacial

100ml de EDTA 0,5m pH8,0

1000ml de água destilada

- Tampão TE 10X

10 mL de Tris base 1M

2 mL de EDTA 0,5M

88 mL de água destilada

- Fenol tamponado

50ml de água destilada

6ml de Tris pH 8 1M

12,5ml de Cresol

0,5 ml de β -mercaptoetanol

7,5g de NaOH 1N

- Oligonucleotídeos iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores foram diluídos em água miliQ (100ng/ μ l) e estocados a -20°C.

- dNTPs

Os dNTPs foram diluídos a uma concentração de 2,5mM, cada, em água MiliQ e estocados a -20°C.

- Tampão de amostra

0,25% (p/v) azul de bromofenol

40% (p/v) sacarose em água