

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

**ANÁLISE DOS FATORES DE VIRULÊNCIA EM *Enterococcus faecalis*
ISOLADOS DE HUMANOS, ALIMENTOS E FRANGOS**

ANA PAULA VAZ CASSENEGO

Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Tese apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia Agrícola e do
Ambiente como um dos
requisitos para obtenção do
Grau de Doutor na Área de
Microbiologia Molecular de
Procaríotos

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

Porto Alegre, RS, Brasil

Março de 2014

CIP - Catalogação na Publicação

Cassenego, Ana Paula Vaz
ANÁLISE DOS FATORES DE VIRULÊNCIA EM *Enterococcus faecalis* ISOLADOS DE HUMANOS, ALIMENTOS E FRANGOS/
Ana Paula Vaz Cassenego. -- 2014.
127 f.

Orientadora: Ana Paula Guedes Frazzon.

Tese (Doutorado) -- 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, 2014.

1. *Enterococcus faecalis*. 2. Biofilme microbiano.
3. Fatores de Virulência. 4. Fenótipo. 5. Genótipo. I.
Guedes Frazzon, Ana Paula , orient. II. Título.

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

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar consciência de humildade e respeito. E força pra vencer
com meu próprio esforço e dedicação.

Aos meus pais, meu irmão e a todos familiares e amigos, por todo carinho,
compreensão e paciência durante esse período importante de minha vida.

À minha orientadora, Prof. Dr. Ana Paula Guedes Frazzon, pelo apoio,
paciência e amizade nessa longa jornada.

Ao Prof. Dr. Pedro Alves d’Azevedo pela parceria científica de sempre.

Ao Prof. Dr. Leonardo Sechi, pela disponibilidade e por me receber nas
dependências da Università Degli Studi di Sassari, permitindo a realização do
Doutorado-Sanduiche na cidade de Sassari, Itália.

A todos os membros da Secretaria do PPGMAA, especialmente à
Coordenadora do curso, Prof. Dr. Sueli Van Der Sand, agradeço pela amizade.

Às colegas do Laboratório 209, agradeço pelo auxílio e convívio diários.

A CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro que permitiu a realização dos
experimentos.

Alea jacta est

RESUMO

ANÁLISE DOS FATORES DE VIRULÊNCIA EM *Enterococcus faecalis* ISOLADOS DE HUMANOS, ALIMENTOS E FRANGOS¹

Este estudo objetivou investigar a distribuição e a relação entre os genes envolvidos com a virulência e formação de biofilme em 196 *Enterococcus faecalis* isolados de alimentos, clínicos e *suabes* cloacais de frangos de corte que receberam oocistos de *Eimeria maxima* e *Eimeria acervulina* e ração suplementada ou não com anticoccidiano. No primeiro experimento foi investigada a frequência dos genes *agg*, *ace*, *tet(M)*, *tet(L)* e do operon *bopABCD*; e foi analisada a produção da enzima gelatinase em duas temperaturas de crescimento (36°C e 42°C). Assim como a capacidade de formar biofilme em meio de cultura suplementado com 10% de sangue, 10% de urina ou 0,75% de glicose por 70 *Enterococcus faecalis* isolados de frangos. Os *Enterococcus faecalis* isolados de frangos de corte que receberam oocistos de *Eimeria maxima* e *Eimeria acervulina* e ração suplementada ou não com anticoccidiano apresentaram capacidade de se adaptar a diferentes nichos biológicos, como por exemplo, sangue e urina. Foi observado um alto percentual dos genes dos fatores de virulência. No segundo experimento, foi avaliada a diversidade filogenética, com base no método de PCR, de 182 cepas isoladas de humanos, frangos de corte e alimentos. Estas cepas formaram quatro grupos filogenéticos (A, B, C e D) e quatro subgrupos (A1, A2, B1 e B2) com índice de similaridade entre 65 a 100%, demonstrando a adaptação de *Enterococcus faecalis* a diferentes ambientes. No terceiro experimento, foi determinada a capacidade de formação de biofilme de isolados clínicos e alimentares em diferentes meios de cultivo. Observou-se que o meio suplementado com 0,75% de glicose demonstrou ser o mais adequado para estabelecimento de forte aderência e, conseqüente formação do biofilme microbiano nos isolados de todas as origens. Em contrapartida, o meio suplementado com 10% de sangue foi o que registrou as maiores taxas de fraca formação de biofilme. Os estudos conduzidos demonstram características fenotípicas e genotípicas de *Enterococcus faecalis* que sugerem uma ampla adaptação ambiental entre os isolados pesquisados.

¹Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Microbiologia Molecular de Procaríotos, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (127 p.) Março, 2014.

ABSTRACT

ANALYSIS OF VIRULENCE FACTORS IN *Enterococcus faecalis* ISOLATED FROM HUMANS, FOODS AND CHICKENS¹

This study aimed to investigate the distribution and the relationship between genes involved in virulence and biofilm formation in 196 *Enterococcus faecalis* isolates from food, clinical and cloacal swabs of broilers that received oocysts of *Eimeria maxima* and *Eimeria acervulina* and diet supplemented or not with anticoccidial. The first experiment investigated the frequency of *agg*, *ace*, *tet(M)*, *tet(L)* genes and *bopABCD* operon; production of gelatinase enzyme was analyzed at two growth temperatures (36°C and 42°C). Thus the ability to form biofilm in culture medium supplemented with 10% of blood, 10% of urine and glucose 0.75% for 70 *Enterococcus faecalis* isolates of chicken. The *Enterococcus faecalis* isolates from broilers that received oocysts of *Eimeria maxima* and *Eimeria acervulina* and supplemented or not with anticoccidial showed the ability to adapt to different biological niches, such as blood and urine. A high percentage of genes of virulence factors were observed. In the second experiment, we evaluated the phylogenetic diversity based on PCR method of 182 strains isolated from humans, broilers and food. These strains formed four phylogenetic groups (A, B, C and D) and four subgroups (A1, A2, B1 and B2) with similarity index between 65 and 100%, demonstrating the adaptation of *Enterococcus faecalis* to different environments. In the third experiment, the ability of biofilm formation of clinical and food isolates in different culture media was determined. It was observed that the medium supplemented with 0.75% glucose was shown to be more suitable for the establishment of strong adhesion and subsequent formation of the biofilm isolates from all sources. In other hand, medium supplemented with 10% blood was reported that the highest rates of weak biofilm formation. Studies conducted show phenotypic and genotypic characteristics of *Enterococcus faecalis* that suggest a broad environmental adaptation among the isolates studied.

¹Doctoral Thesis in Agricultural Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (127 p.) March, 2014.

SUMÁRIO

RELAÇÃO DE TABELAS	VIII
RELAÇÃO DE FIGURAS	IX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivo Geral.....	3
1.2 Objetivos Específicos	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Gênero <i>Enterococcus</i>	5
2.2 Fatores de virulência	9
2.3 Biofilmes microbianos	14
2.4 Biofilme em enterococos.....	18
2.5 Diversidade em enterococos.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Experimento 1	23
3.1.1 Seleção de isolados e confirmação de espécie	23
3.1.2 Detecção de atividade gelatinolítica.....	25
3.1.3 Pesquisa dos genes dos fatores de virulência	25
3.1.4 Formação de biofilme <i>in vitro</i>	26
3.1.5 Análise estatística.....	27
3.2 Experimento 2	28
3.2.1 Origem das amostras de <i>Enterococcus faecalis</i>	28
3.2.2 Extração do DNA total e amplificação dos genes de virulência por PCR	30
3.2.3 Construção da árvore filogenética	30
3.2.4 Análise estatística.....	31

3.3 Experimento 3	31
3.3.1 Ensaio <i>in vitro</i> de formação de biofilme microbiano	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 Experimento 1	34
4.1.1 Atividade da enzima gelatinase dos <i>Enterococcus faecalis</i> isolados de cloaca de frango sob diferentes temperaturas	34
4.1.2 Distribuição dos genes dos fatores de virulência entre os isolados de cloaca de frango em relação às dietas	36
4.1.3 Capacidade de formação de biofilme <i>in vitro</i>	40
4.2 Experimento 2	46
4.2.1 Frequência dos genes dos fatores de virulência e resistência antibiótica entre as amostras	46
4.2.2 Diversidade filogenética dos genes de virulência e resistência de <i>Enterococcus faecalis</i>	50
4.3 Experimento 3	58
4.3.1 Avaliação da atividade da enzima gelatinase e diferentes meios de cultura na formação de biofilme por <i>Enterococcus faecalis</i>	58
5. CONCLUSÃO	65
6. REFERÊNCIAS.....	67
7. ANEXO	79
7.1 Manuscritos	80
7.1.1 Manuscrito 1.....	80
7.1.1 Manuscrito 2.....	96
8. VITA.....	117

RELAÇÃO DE TABELAS

TABELA 1. Oligonucleotídeos iniciadores e temperaturas de anelamento utilizados na reação de PCR para amplificação dos genes de <i>Enterococcus faecalis</i>	26
TABELA 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR.	29
TABELA 3. Frequência dos genes codificadores dos fatores de virulência detectados em cepas de <i>Enterococcus faecalis</i> isolados de frangos de corte infectados com <i>Eimeria</i> spp..	37
TABELA 4. Relação do fenótipo de formação de biofilme com os diferentes meios de cultura e temperaturas de incubação de 36°C e 42°C em <i>Enterococcus faecalis</i>	41
TABELA 5. Prevalência de fatores de virulência e resistência antimicrobiana entre <i>Enterococcus faecalis</i> isolados de frangos de corte, amostras clínicas e alimentares	47
TABELA 6. Percentual de formação de biofilme por isolados clínicos e alimentares de <i>Enterococcus faecalis</i> em diferentes temperaturas e meios de crescimento.	62

RELAÇÃO DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Dendrograma baseado em resultados de PCR com oligonucleotídeos iniciadores para fatores de virulência e genes de resistência a antimicrobianos.....54
- FIGURA 2.** Análise da intensidade de formação de biofilme em *Enterococcus faecalis* de acordo com os suplementos e temperaturas testados nos isolados de diferentes origens..62

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Enterococcus* compreende espécies de importância ambiental e na indústria de alimentos. Porém, seu papel no estabelecimento de infecções relacionadas à assistência da saúde é um grande problema, principalmente no que se refere a colonizações oportunistas. Fazem parte da microbiota do trato gastrointestinal humano e são considerados micro-organismos de baixa virulência, mas podem ser responsáveis por infecções graves em pacientes hospitalizados e imunocomprometidos.

Muitos fatores de virulência presentes nesta espécie são comprovadamente responsáveis pela formação e estabelecimento de biofilme microbiano, uma das principais formas de sobrevivência bacteriana no meio ambiente e em hospedeiros humanos e animais. Os fatores de virulência são estruturas, produtos ou estratégias que as bactérias utilizam para escapar do sistema de defesa do hospedeiro e causar uma infecção. Alguns estão relacionados com a colonização do micro-organismo e outros com as lesões no organismo, como por exemplo, a expressão de toxinas. Exemplos de fatores de virulência encontrados em *Enterococcus faecalis* são: a substância de agregação (Agg), a proteína de superfície de adesão da matriz na molécula (Ace), o operon *bopABCD*, assim como os genes de resistência antimicrobiana, *tet(M)* e *tet(L)*, que codificam resistência pela ligação de proteínas ao

ribossomo e alteração de sua conformação. Em *Enterococcus faecalis* os fatores de virulência podem ser adquiridos e transferidos por elementos genéticos, como plasmídeos e transposons, entre cepas da mesma espécie e interespecies.

Biofilme microbiano é uma associação entre micro-organismos, podendo abranger diferentes espécies em uma mesma estrutura formada por exopolissacarídeos bacterianos e matéria orgânica presente no meio ambiente onde se encontram, comunicando-se em *quorum sensing*, um mecanismo de secreção de moléculas formadas intracelularmente que reconhece a presença de outras células bacterianas no mesmo ambiente de crescimento. Dessa forma, o micro-organismo pode estabelecer contato célula-célula e realizar expressão genética e fenotípica semelhante, determinando o momento correto de invasão e adesão celular no hospedeiro ou em materiais inorgânicos, prolongando sua permanência no ambiente e ativando genes de virulência que aumentam seu potencial patogênico e de infecção.

Diversos estudos são conduzidos atualmente na tentativa de estabelecer uma relação entre a formação fenotípica de biofilme em *Enterococcus faecalis* e a presença de genes de fatores de virulência. Porém, outros determinantes ambientais também devem ser considerados, dada sua capacidade de sobrevivência e sua adaptação a diferentes fontes, seja em objetos inanimados, pacientes infectados ou alimentos.

Nesse contexto, o estudo apresentado a seguir visou à pesquisa de alguns genes de virulência encontrados em *Enterococcus faecalis* e comprovadamente necessários ao estabelecimento da matriz microbiana

(biofilme). Para tanto, isolados de diferentes fontes e origens foram pesquisados fenotípica e genotipicamente. Além disso, estudos recentes têm demonstrado a capacidade com que cepas de enterococos formam biofilme sob diferentes condições de crescimento e suplementos em meios de cultura, remetendo mais uma vez à sua plasticidade e adaptação aos mais diversos ambientes.

A relação de cepas de *Enterococcus faecalis* isoladas de diversos ambientes e períodos de anos diferentes será o principal fator a ser considerado neste estudo, através de mecanismos genéticos e fisiológicos, determinados pelo seu comportamento fenotípico *in vitro* e seu conteúdo genético, observado através de estudos genotípicos.

1.1 Objetivo Geral

Investigar a distribuição e a relação entre os genes envolvidos com a virulência e a formação de biofilme em *Enterococcus faecalis* isolados de diversos locais, como alimentos, amostras clínicas e suabes cloacais de frangos de corte.

1.2 Objetivos Específicos

- Pesquisar a frequência dos genes *agg*, *ace* e do operon *bopABCD* e analisar a produção da enzima gelatinase em duas temperaturas de crescimento (36°C e 42°C); avaliar a capacidade de formar biofilme em meio de cultura suplementado com 10% de sangue, 10% de urina ou 0,75% de glicose em *Enterococcus faecalis* isolados de suabes cloacais de frangos de corte, isolados de amostras clínicas humanas e de alimentos;

- Pesquisar a frequência dos genes *agg*, *ace*, operon *bopABCD* e genes de resistência *tet(M)* e *tet(L)* por PCR em *Enterococcus faecalis* isolados de amostras clínicas de pacientes infectados, alimentares e suabes de frangos de corte e avaliar a relação entre as cepas através da análise da presença destes fatores de virulência entre as cepas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Gênero *Enterococcus*

O gênero *Enterococcus* compreende bactérias Gram-positivas que pertencem ao grupo das bactérias ácido-láticas e fazem parte da microbiota natural do trato gastrintestinal (TGI) de humanos e de vários outros animais, como aves e bovinos, sendo também encontradas em solo, água e alimentos (Jensen et al., 1999; Stobberingh & Van Den Bogaard, 1999; Aarestrup et al., 2000; Donabedian et al., 2003; Aarestrup et al., 2004).

Uma vez que são isolados de diversas fontes, sua sobrevivência está associada a sua excepcional adaptação e resistência a ambientes hostis (Reffuveille et al., 2011). Essas bactérias exercem um papel muito importante na produção de vários alimentos fermentados, e também são usadas como probióticos. De fato, algumas espécies ou cepas de *Enterococcus* constituem um componente da microbiota de queijos, embutidos, azeitonas verdes e outros constituintes de maturação conferindo a esses produtos características organolépticas únicas (Foulquié Moreno et al., 2006).

Esse papel benéfico levou a introdução de cepas de enterococos em culturas *starters*. Contudo, algumas destas cepas são usadas como probióticos para aumentar o balanço microbiano do intestino e no tratamento de gastroenterite humana e animal (Franz et al., 2003; Bensalah et al., 2006). Em

contrapartida, a presença destes micro-organismos nos produtos finais pode estar relacionada a condições de baixa higiene durante o processamento do alimento, pela contaminação de fezes animal ou humana (Giraffa, 2002).

Os representantes do gênero *Enterococcus* compreendem mais de 40 espécies e são micro-organismos de importância médica, por estarem frequentemente relacionados com infecções hospitalares, sendo causa de endocardites, bacteremia, infecções do trato urinário, sistema nervoso central, intra-abdominal e infecções pélvicas. Algumas espécies são tipicamente patógenos oportunistas que causam doenças em pacientes que já sofrem de outras enfermidades, como *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, as mais prevalentes no gênero (Ali et al., 2014). Enterococos reconhecidos formalmente como organismos de mínimo impacto clínico tiveram uma emergência importante como patógenos adquiridos em pacientes imunocomprometidos a partir da década de 1990 (Low et al., 1994; Morrison et al., 1997). De acordo com dados epidemiológicos, enterococos estão entre os mais importantes patógenos responsáveis por infecções relacionadas com a assistência à saúde (IRAS), com 12% de prevalência e com taxa de mortalidade para infecções sanguíneas variando de 20 a 68% dependendo da população microbiana no paciente (Bourgogne et al., 2010). Outros dados também indicam que *Enterococcus faecalis* é a espécie mais comumente isolada de doenças humanas e, assim como *Enterococcus faecium*, está relacionada com um risco mais elevado de resistência antimicrobiana adquirida (Huycke et al., 1998).

Como importante característica destes micro-organismos, a resistência a muitos antimicrobianos ocorre facilmente, tanto por mutações quanto pela aquisição de plasmídeos ou transposons que carregam genes de resistência (Franz et al., 1999; Franz et al., 2003; Centikaya et al., 2000; Giraffa, 2002). Em alimentos já foram descritos diversos estudos que encontraram *Enterococcus* sp. resistentes a diversos antimicrobianos (Riboldi et al., 2008; Peters et al., 2003, Cortés et al., 2006). Enterococos também possuem resistência a cefalosporinas, lincosaminas e muitos beta-lactâmicos, contudo, a resistência adquirida de enterococos à vancomicina (VRE) constitui a mais séria e emergente preocupação que surgiu nas infecções clínicas humanas (Gilmore, 2002).

Na última década, ocorreu um grande aumento no número de cepas resistentes a uma ampla quantidade de agentes microbianos que frequentemente causam infecções fatais (Willems et al., 2001). Na Itália, um número significativo de enterococos foi identificado como causa de IRAS, demonstrando a presença de enterococos resistentes à vancomicina nos países da Europa (Gomes et al., 2008; Duprè et al., 2003; Mannu et al., 2003; Baldassarri et al., 2001).

Estudos sobre a cadeia epidemiológica têm mostrado que animais produtores de alimentos, quando tratados com antimicrobianos podem ser reservatórios de enterococos resistentes, e assim contribuírem para a disseminação de resistência antimicrobiana entre a população. Nos últimos anos, o uso desses aditivos antimicrobianos na dieta animal passou a ser visto como fator de risco para a saúde humana, principalmente em decorrência de

duas contestações: a presença de resíduos dos antimicrobianos na carne, nos ovos e no leite e a indução de resistência cruzada para bactérias patogênicas para humanos. Com isso, surgiram restrições e novas regulamentações quanto ao uso de antimicrobianos e quimioterápicos na alimentação animal.

Na União Européia, por exemplo, a partir de janeiro de 2006, foi banido o uso de qualquer antimicrobiano promotor de crescimento na produção animal, sendo permitido o uso de antimicrobianos e quimioterápicos somente com finalidade curativa. Embora, em estudo recente, Cassenego et al. (2011) tenham demonstrado ausência de correlação entre o uso dessas substâncias e o estabelecimento de resistência em isolados de suabes cloacais de frangos de corte em *Enterococcus* sp..

Uma vez que se entre em contato com bactérias resistentes a antimicrobianos pela ingestão principalmente, estas podem naturalmente ser transmitidas de alimentos para o TGI de humanos. Em estudo realizado por Gelsomino et al. (2001), visando comparar o impacto do consumo de queijo contaminado com *Enterococcus* sobre a microbiota do TGI, observou-se que o queijo e as fezes humanas continham duas cepas idênticas. Durante o consumo dos queijos, as cobaias avaliadas apresentaram uma mudança drástica na sua microbiota fecal. A partir disso, existe uma comprovação sobre o efeito do alimento como carreador de cepas de enterococos ao organismo humano. Os resultados provam que um clone presente no queijo, mesmo em pouca quantidade, foi capaz de se estabelecer no intestino do humano.

Apenas a resistência microbiana não é capaz de explicar a ampla virulência dos enterococos. A causa do alto número de infecções causadas por

esse micro-organismo também pode ser expressa por fatores de virulência, os quais não são facilmente identificados, incluindo várias adesinas, assim como resistência e modulação a mecanismos de defesa do hospedeiro, secreção de citolisina e produção de feromônios codificados por plasmídeo. Estes determinantes são abrigados principalmente por *Enterococcus faecalis* e em nível menor por *Enterococcus faecium* (Jett et al., 1994). Além disso, foi relatada também a presença de fatores de virulência em cepas de *Enterococcus* sp. isoladas de alimentos (Duprè et al. 2003; Abriouel, 2008; Gomes et al., 2008).

2.2 Fatores de virulência

Para os enterococos agirem como patógenos eles precisam primeiro se aderir ao tecido hospedeiro. Logo após, durante o processo de invasão tecidual, os micro-organismos encontram um ambiente muito diferente daquele encontrado no meio ambiente, com aumento do potencial redox, nutrientes essenciais limitados, leucócitos fagocíticos e outras defesas do hospedeiro. Enterococos infectantes expressam genes que favorecem seu crescimento sob essas condições ambientais alternativas (Lewis et al., 2001).

Em bactérias do trato gastrintestinal, como enterococos, existem proteínas como adesinas que promovem a sua ligação a receptores eucarióticos na superfície mucosa, assim como a manutenção da colonização. Essas adesinas desempenham diversos papéis como moléculas efetoras ativando a fagocitose, aumentando ou reduzindo a resposta inflamatória local ou atuando como toxinas (Cosentino et al., 2010).

Estudos têm mostrado que enterococos possuem determinantes de virulência, como a substância de agregação Agg (Barbosa et al., 2010). A substância de agregação é uma proteína ligante de superfície codificada por plasmídeos feromônio-responsivos de *Enterococcus faecalis*. A substância de agregação transforma a superfície da célula do doador bacteriano em um receptor de células aderentes causando agregação ou facilitando a transferência de plasmídeos (Dupré et al., 2003). A substância de agregação aumenta a aderência em células tubulares renais e células endocárdicas e também a internalização por células epiteliais intestinais, e também mostrou um aumento da massa valvular vegetativa em modelos animais de endocardites (Vankerckhoven et al., 2004).

Ace (proteína de superfície de adesão da matriz na molécula) é um reconhecido componente da virulência de *Enterococcus faecalis*. A identificação de anticorpos específicos para Ace no soro coletado de pacientes após infecção por *Enterococcus faecalis* fornece evidências de que a proteína é produzida sob condições fisiológicas, mas a contribuição para a patogênese da infecção e condições que podem ocorrer fisiologicamente e que regulam a sua expressão era desconhecida (Shepard & Gilmore, 2002). Porém, Nallapareddy et al. (2011) analisaram isolados de *Enterococcus faecalis* mutantes de ace que demonstraram perda parcial de aderência ao colágeno e fibrinogênio, confirmando seu papel na formação inicial de biofilme, ainda que sua função seja exercida associada a outros genes de fatores de virulência. Ace media a aderência ao colágeno tipo I e IV, laminina e dentina e exerce papel na endocardite, reforçado pela presença de anticorpos anti-ace

encontrados no soro sanguíneo de pacientes infectados. A expressão de Ace é induzida significativamente por altas temperaturas (culturas a 46°C) e *in vivo* pela presença de soro ou componentes da matriz extracelular. Estes resultados indicam a existência de diferentes mecanismos de regulação, de acordo com as condições ambientais encontradas por *Enterococcus faecalis* durante a infecção (Lebreton et al., 2009).

O operon *bop* (*Biofilm On Plastic Surfaces*) *ABCD* foi também identificado como exercendo um papel significativo na formação de biofilme e metabolismo da maltose por Hufnagel et al. (2004). Nesse estudo, o grupo identificou BopD como regulador transcricional ligante de açúcar, sendo crucial para a formação de biofilme entre as cepas testadas. A inativação desse gene afetou a síntese de certos carboidratos no sinal de transdução na via de regulação para expressão de biofilme e, provavelmente, outros mecanismos de virulência. Além disso, BopD exerce homologia na sua sequência gênica, com diversas proteínas bacterianas envolvidas na regulação do metabolismo da maltose (Creti et al., 2006). Uma inserção de transposon no gene *bopB* diminuiu significativamente a expressão dos genes do locus, localizados *downstream*, reduzindo a capacidade da cepa mutante em formar biofilme. Isso indica que *bop* está envolvido na produção de biofilme e provavelmente regula a expressão do biofilme em *Enterococcus faecalis* (Hufnagel et al., 2004). Burgogne et al. (2006) confirmaram a regulação dos genes desse locus pelo sistema Fsr, um mecanismo de *quorum sensing* envolvido na expressão dos genes de virulência em *Enterococcus faecalis*. O locus contém um operon chamado *bopABCD/malPBMR* que codifica os genes *malT* e *bopAB/malPB*. Os

genes *bopCD/malMR* mostram uma mesma função de síntese (Vebo et al., 2009). O trabalho apresentado por Creti et al. (2006) sugere um papel importante do locus no metabolismo da maltose, de forma que uma inserção de transposon no segundo gene do locus (*bopB*) resulta na perda de formação de biofilme, enquanto a deleção não-polar desse gene junto com outras partes que flanqueiam os genes *bopA* e *bopC* resultam num aumento da formação de biofilme. Portanto, um efeito polar da inserção do transposon ou no regulador transcricional *bopD* foi o responsável pela redução da formação de biofilme do transposon mutante.

Entre outras, duas proteases foram descritas em cepas de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*: a gelatinase, uma metaloprotease (também denominada cocolisina, codificada pelo gene *gelE*); e uma serina-protease (codificada por *sprE*) que são reguladas pelo mesmo sistema (*fsr*). Ambas as proteínas causam danos ao hospedeiro atuando sobre o colágeno dos tecidos do hospedeiro de diferenciadas maneiras: através da degradação direta do tecido; através da ativação de metaloproteases da matriz extracelular do hospedeiro e desregulando componentes essenciais do sistema imune do hospedeiro como degradação de imunoglobulinas ou proteínas da via do complemento. Estas proteases foram relatadas como envolvidas na formação de biofilme em isolados de *Enterococcus* sp. (Mohamed & Huang, 2007).

Outros estudos, com cepas de *Enterococcus faecalis* envolvidos em infecções cardíacas e do trato urinário humano têm ajudado a identificar um grupo de genes associados à virulência que incluem *agg*, *ace* e genes do

operon *bopABCD* (Hew et al., 2007) e ainda outras pesquisas indicaram que a proteína gelatinase está envolvida na formação de biofilme (Yeong et al., 2011; Poeta et al., 2006).

Nesse contexto, consideram-se formas de se estabelecer a importância de um determinado gene, onde muitas técnicas moleculares são utilizadas com objetivo de interromper a expressão de um ou mais genes de interesse (Eaton & Gasson, 2001; Qin et al., 2000; Thurlow et al., 2010). Essas ferramentas são importantes para elucidar a função das proteínas codificadas pelos genes e talvez, identificar e validar novos alvos antimicrobianos.

Além dos fatores de virulência relacionados diretamente à formação de biofilme, são também conhecidos vários mecanismos de resistência microbiana, entre elas três classes de genes que codificam resistência antimicrobiana e determinam um aumento da virulência das cepas que os possuem. Seus mecanismos constituem alterações conformacionais prevenindo a ligação da molécula de tetraciclina ao ribossomo através de *tet(M)*, *tet(O)* e *tet(S)* (Zhanel et al., 2004), além do sistema de bombas de efluxo codificado por *tet(L)* (Clewell et al., 1995; Huys et al., 2004; Hummel et al., 2007). Mais recentemente, foram identificadas a presença dos genes *tet(M)* e *tet(L)* em amostras de *Enterococcus* sp. isoladas de carcaças de frangos (Frazzon et al., 2009) e suabes cloacais de frangos de corte (Cassenego et al., 2011).

O mecanismo de resistência a este antimicrobiano é resultante de três estratégias empregadas pelas bactérias: i) limitação do acesso da droga ao seu alvo pelo efluxo da droga através da membrana celular; ii) alteração

ribossomal que dificulta uma ligação efetiva da droga ao seu respectivo alvo e; iii) produção de enzimas de inativação da tetraciclina (Huys et al., 2004). A resistência à tetraciclina é um dos fenótipos de resistência adquirida mais observada em *Enterococcus faecalis*. Dentre os isolados clínicos de *Enterococcus faecalis*, cerca de 65% apresentam-se resistentes a este antimicrobiano (Roberts et al., 2003).

2.3 Biofilmes microbianos

Muitas bactérias patogênicas e comensais são capazes de transitar entre ambiente e hospedeiros humanos e todas podem ser capazes de se adaptar a mudanças repentinas quanto à disponibilidade de nutrientes através do aumento da frequência dos eventos de transferência gênica (conjugação, transformação e transdução) (Trevors, 2011). Um exemplo particularmente importante e clinicamente relevante de adaptação bacteriana através da expressão sistemática de genes é sua habilidade de crescer como parte de uma comunidade sésil exopolimérica definida como biofilme (Jefferson, 2004).

Biofilme é uma associação de microrganismos e de seus produtos extracelulares, que se encontram aderidos a superfícies bióticas ou abióticas. Acredita-se que a formação de biofilmes esteja associada à proteção contra o ambiente, graças à presença da matriz exopolissacarídica, que pode impedir fisicamente a penetração de agentes antimicrobianos no biofilme, principalmente aqueles hidrofílicos e carregados positivamente (Mohamed & Huang, 2007).

Foi também descrito que a matriz teria papel de proteção contra radiações UV, alterações de pH, choques osmóticos e dessecação (Lewis, 2001). De acordo com o *National Institutes of Health*, biofilmes apresentam grande importância médica, sendo responsáveis por mais de 80% das infecções causadas por micro-organismos. Bactérias em um biofilme são resistentes à fagocitose, tornando o biofilme uma estrutura difícil de ser eliminada do corpo. Os biofilmes bacterianos recebem atenção considerável da comunidade científica, em razão da sua ubiquidade em ambientes naturais, clínicos e industriais (Mohamed & Huang, 2007; Marra et al., 2007).

A formação do biofilme compreende as etapas de formação divididas didaticamente em:

1. **Adesão a uma superfície:** é geralmente mediada por interações inespecíficas, como forças hidrofóbicas, enquanto a adesão a um tecido vivo é normalmente mediada por mecanismos moleculares específicos, como lectinas, outros ligantes ou adesinas. A adesão primária de um organismo a uma superfície é um processo reversível que envolve a aproximação deste à superfície, de forma aleatória ou através de mecanismos de quimiotaxia e de mobilidade. Quando o micro-organismo atinge uma proximidade crítica da superfície, a ocorrência de adesão depende do balanço final entre as forças atrativas e repulsivas geradas entre as duas superfícies. A repulsão entre duas superfícies pode ser ultrapassada através de interações moleculares específicas mediadas por adesinas, que são proteínas localizadas em estruturas na superfície celular.

2. Maturação do biofilme: após a adesão primária, as células fracamente ligadas consolidam o processo de adesão produzindo polissacarídeos extracelulares que se complexam a materiais da superfície e aos receptores específicos localizados nos flagelos ou pili. Na ausência de interferência mecânica ou química, a adesão torna-se irreversível nesta fase. Durante esse estágio de adesão, os micro-organismos individualizados podem aderir-se uns aos outros, formando agregados na superfície. Após a adesão irreversível da bactéria à superfície, inicia-se o processo de maturação do biofilme. A densidade e complexidade do biofilme aumentam à medida que as células crescem e se dividem. Os componentes extracelulares gerados pelas bactérias interagem com moléculas orgânicas e inorgânicas do ambiente circundante para formar a matriz. Nessa fase, os biofilmes tornam-se altamente hidratados, formando-se estruturas abertas compostas por 73 a 98% de material não celular, incluindo polissacarídeos extracelulares e canais por onde circulam os nutrientes.

Os recentemente conhecidos eDNA ou DNAs extracelulares também são importantes componentes do biofilme. Sua presença foi observada inicialmente em biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* e estafilococos. A autólise é o mecanismo mais comum pelo qual os eDNAs são liberados. Em *Enterococcus faecalis* a autólise resulta de um processo similar à necrose de células eucarióticas, papel muitas vezes desenvolvido pelas proteases. eDNA também representa um importante mecanismo importante de transferência gênica horizontal nas bactérias (Montanaro et al., 2011). A presença de eDNA

na matriz exopolimérica exerce um papel estrutural de estabilização. Whitchurch et al. (2002) demonstraram que a formação de um biofilme estável e a ligação de células bacterianas à cultura são prevenidas pela adição de DNase I ao meio de cultura, porém, a matriz em biofilmes maduros pode ser fortalecida por outras substâncias além dos eDNA ou biofilmes maduros podem produzir exoenzimas proteolíticas suficientes para inativar localmente a DNase I. Dessa forma, os eDNA trabalham em conjunto a outras estruturas de estabilização na arquitetura do biofilme.

Além disso, o crescimento de qualquer biofilme é limitado pela disponibilidade de nutrientes no ambiente circundante e pela sua propagação a células localizadas no interior do biofilme. Fatores como o pH, difusão de oxigênio, fonte de carbono e osmolaridade controlam também a maturação do biofilme. Quando completamente maduro, o biofilme funciona como um consórcio funcional de células, com padrões de crescimento alterados, cooperação fisiológica e eficiência metabólica. Nessa fase, as células localizadas em regiões diferentes do biofilme exibem diferentes padrões de expressão genética.

3. Ruptura e dispersão do biofilme: quando o biofilme atinge determinada massa crítica e o equilíbrio dinâmico é alcançado, as camadas mais externas do biofilme começam a liberar células em estado livre, planctônicas, que podem dispersar-se rapidamente e multiplicar, colonizando novas superfícies e organizando novos biofilmes em novos locais. Com a ausência de nutrientes e/ou oxigênio ou dificuldades na sua difusão, diminuição do pH e acúmulo de metabólitos secundários tóxicos, inicia-se o processo de

morte celular junto à superfície e subsequente desintegração do biofilme. As células livres podem, dessa forma, iniciar um novo biofilme.

A formação de biofilme gera grandes problemas na indústria de alimentos, pois pode representar uma importante fonte de contaminação e de transmissão de doenças bacterianas. As células podem se transferir do biofilme e colonizar linhas de processamento de alimentos e o próprio alimento e outras superfícies de contato, podendo afetar a qualidade e a segurança do produto final, colocando em risco a saúde dos consumidores. Existe grande preocupação com a resistência apresentada pelas bactérias presentes no biofilme, aos agentes antimicrobianos e ao sistema de defesa de hospedeiros infectados (Vermelho et al., 2008; Romeo, 2008).

2.4 Biofilme em enterococos

Bactérias do gênero *Enterococcus* isoladas de amostras clínicas são capazes de formar biofilme. Biofilmes formados por este gênero são responsáveis por mais de 60% das infecções em humanos (Mohamed & Huang, 2007; Marra et al., 2007) e são relatados como importantes organismos na infecção periodontal. A aderência e a produção de biofilme por *Enterococcus faecalis* em diferentes biomateriais tem demonstrado a capacidade de ligação de enterococos a vários dispositivos médicos, como *stents* ureterais e biliares, cateteres intravasculares e utensílios gastronômicos, sendo associado à habilidade dos enterococos produzirem biofilmes (Mohamed & Huang, 2007). A formação de biofilme por *Enterococcus faecalis* em

materiais de lentes oculares, como polimetilmetacrilato, silicone e acrílico já foi também documentada (Kobayakawa et al., 2005).

A habilidade dessas bactérias se multiplicarem e se desenvolverem em biofilme depende de muitos fatores que podem incluir o reconhecimento celular de pontos específicos na superfície, níveis nutricionais, CO₂, pH, osmolaridade e temperatura. Bactérias em biofilme são capazes de promover trocas genéticas e se protegem do sistema imune, antimicrobianos e biocidas. Aliado a essas características, o gênero *Enterococcus* tem habilidade de sobreviver em ambientes adversos, como temperaturas extremas, pH (4,5-10,0) e salinidade elevada (6,5%). Essas características do micro-organismo podem contribuir para o aumento e a persistência de enterococos no ambiente (Fisher & Phillips, 2009).

Marinho et al. (2013) avaliaram a capacidade de *Enterococcus faecalis* isolados de alimentos e resistentes a antibióticos formarem biofilme *in vitro* em diferentes temperaturas e na presença ou ausência de glicose (0,75%) e constataram que o biofilme pode se produzir em uma ampla variedade de fatores ambientais, incluindo temperatura e açúcar, que são encontrados em alimentos, alimentos processados e ambientes clínicos. Thammavongs et al. (1996) observaram que a cepa JH2-2 de *Enterococcus faecalis* exibe um mecanismo de resposta adaptativa que pode ser responsável pela sobrevivência da espécie em baixas temperaturas, como as estruturas de membrana, lipídeos e ácidos graxos (Fisher & Phillips, 2009).

Enterococcus é um microrganismo que deve ser monitorado e tem levantado dúvidas sobre os riscos de disseminação de cepas potencialmente

virulentas e de seus genes de resistência aos antimicrobianos fora do ambiente hospitalar, principalmente através de alimentos (Franz et al., 2003). Diversos fatores de virulência estão associados com formação de biofilmes, como gelatinase e proteínas de superfície de *Enterococcus* responsáveis pela adesão inicial e persistência da estrutura. Estes foram muito investigados em isolados clínicos, entretanto em isolados alimentares e de animais, até o momento existem poucos dados disponíveis, como Jahan & Holley (2014) que pesquisaram a incidência de fatores de virulência em carnes cruas e processadas, revelando que todas as cepas de *Enterococcus faecalis* possuíam ao menos um fator de virulência pesquisado (*asa*, *cylA*, *ace*, *efaA*, *esp*, *Ge/E*). Elhadidy & Elsayyad (2013), por sua vez, levantaram dados sobre a presença do gene *esp* em isolados de *Enterococcus faecalis* causadores de mastite bovina, demonstrando uma fraca relação entre a presença do gene e a capacidade de formação de biofilme; porém existe uma grande formação de biofilme entre estes isolados.

A presença de tais fatores de virulência e de resistência antimicrobiana intrínseca ou adquirida e sua associação com doenças humanas podem explicar a potencial atividade patogênica dessa espécie, havendo, portanto, a necessidade de acompanhamento contínuo e vigilância destes micro-organismos em nosso meio. Para tanto, estes estudos enfatizam a importância de enterococos como um reservatório de genes de virulência e seu potencial para transferência genética entre cepas humanas e animais ou de alimentos.

2.5 Diversidade genotípica em enterococos

A capacidade de *Enterococcus* adquirir resistência a antibióticos através da transferência de plasmídeos, transposons ou por mutação gênica apresenta um desafio significativo para medidas terapêuticas. Segundo Diarra et al. (2010), embora os métodos microbiológicos baseados em cultivo dos micro-organismos sejam amplamente utilizados, consomem muito tempo e fornecem pouca informação clínica sobre o genótipo do agente patogênico, incluindo genes de resistência a antibióticos e fatores de virulência. Por outro lado, métodos moleculares utilizando micro arranjos de DNA têm apresentado um grande potencial em pesquisas, segurança alimentar, diagnóstico médico, agrícola e industrial e de saúde pública (Rasooly & Herold, 2008).

A técnica de PCR-multiplex com oligonucleotídeos iniciadores específicos, também demonstrou ser uma ferramenta molecular simples e que permite a identificação rápida e precisa de enterococos. Esta técnica tem sido utilizada com sucesso para identificação de VRE (enterococos resistentes à vancomicina), mas pode também ser utilizada na identificação de outros enterococos (Layton et al., 2010).

Outros métodos de tipagem molecular, tais como a Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) e *Multilocus sequence typing* (MLST) são utilizados para comparar os patógenos e suas origens. Estes métodos são úteis para entender a dinâmica populacional e a ecologia de organismos específicos (Maiden, 2006).

Métodos baseados na análise de DNA bacteriano foram aplicados com sucesso em trabalho descrito por Castillo-Rojas et al. (2013) na

identificação em nível de espécie utilizando PFGE podendo substituir técnicas moleculares complexas utilizadas no agrupamento de cepas e os testes microbiológicos convencionais, necessários para agrupar cepas que são difíceis de distinguir através do uso de abordagens fenotípicas. Jackson et al. (2012) utilizaram as técnicas PFGE e BOX-PCR para comparação e agrupamento de *Enterococcus faecalis* de acordo com a fonte (frangos de corte, cama do aviário e águas de superficiais e subterrâneas da granja), usando BOX-PCR. As amostras isoladas das águas foram dispersas com maior frequência entre os grupos do PFGE, contendo também isolados da cama do aviário. Linhagens geneticamente diversas de *Enterococcus faecium* foram agrupadas independentemente da fonte por ambos os métodos moleculares. Entretanto, os subgrupos de *Enterococcus faecium* isolados com base na fonte estavam presentes em grupos de BOX-PCR. Embora enterococos isolados a partir de fontes de areia e de água fossem agrupados juntos usando BOX-PCR e PFGE, isolados de água não puderam ser definitivamente identificados como provenientes de cama de frango. Semedo-Lemsaddek et al. (2013), por sua vez, identificaram isolados das espécies *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* e *Enterococcus durans* por PCR *fingerprinting* e revelaram sua elevada diversidade genômica através desta técnica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo completo foi dividido em três experimentos, de maneira a demonstrar o comportamento dos isolados sob diferentes aspectos, dado sua importância em cada ambiente.

3.1 Experimento 1

Teve por objetivo analisar a frequência dos genes *agg*, *ace* e do operon *bopABCD* envolvidos com a virulência e formação de biofilme em *Enterococcus faecalis* isolados de suabes cloacais de frangos de corte desafiados com *Eimeria* spp. e alimentados com dietas suplementadas ou não de anticoccidianos. Avaliou-se também a capacidade dessas cepas em formar biofilme a 36°C e 42°C, crescendo em caldo Luria-Bertani suplementado com 10% de sangue, ou 10% de urina ou 0,75% glicose.

3.1.1 Seleção de isolados e confirmação de espécie

Foram selecionados 70 *Enterococcus faecalis* isolados de um estudo anterior realizado pelo grupo (Cassenego et al., 2011), onde avaliou-se a diversidade de enterococos isolados de suabes cloacais de frangos machos Cobb 500 com 28 dias alimentados com uma dieta baseada em milho e farelo

de soja, óleos vegetais, minerais e vitaminas e suplementados (n=44) ou não (n=26) com 100 ppm de anticoccidiano (monensina). Aos 14 dias de idade, todas as aves receberam uma solução contendo 5×10^4 e 1×10^4 oocistos/animal de *Eimeria maxima* e *Eimeria acervulina*, respectivamente.

O DNA total de todos os isolados foi extraído pelo método de Fredricks & Relman (1997) com modificações. Uma alíquota de 5µL do inóculo crescido por 16 horas em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) à 37°C foi centrifugada por 5 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado três vezes com 1 mL de tampão TE 1x e suspenso em 100µl do mesmo tampão. Ao *pellet* foi adicionado 100µl de TE⁵N, 10 % do volume de SDS e 5 µL de Proteinase K (20 mg/ml). A seguir, incubou-se em banho-maria por 1 hora a 55°C. Adicionou-se 15µl NaCl 5M e 200 µl de fenol em fração 1:1, seguido de agitação em vortex. As amostras foram colocadas em rotor por 30 minutos e após, centrifugadas por 30 minutos a 14000 rpm. A fase aquosa foi coletada e transferida para outro microtubo, adicionando 1 mL de etanol absoluto. As amostras foram incubadas por 1 hora a -20°C e centrifugadas por 15 minutos a 13.000 rpm e, logo após, desprezou-se o sobrenadante e o *pellet* foi suspenso em 100 µl de TE e 5 µl de RNase. As amostras foram incubadas por 30 minutos a 37°C e 6 µl do produto foram aplicados em gel de agarose 1% para analisar a concentração (100ng/µl) e a qualidade do material.

A confirmação da espécie *Enterococcus faecalis* de todos os isolados selecionados foi realizada pela técnica de reação em cadeia (PCR) utilizando os oligonucleotídeos iniciadores espécie-específico *ddl_{E-faecalis}* (tabela 1). A reação da PCR foi realizada no termociclador (Amplitherm- Thermal

Cyclers-) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C por 1 minuto; temperatura de anelamento 52 °C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, com extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos da amplificação da PCR foram visualizados em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio e observado através de luz ultravioleta (UV).

3.1.2 Detecção de atividade gelatinolítica

Ensaio *in vitro* para a detecção de atividade da enzima gelatinase em ágar suplementado com gelatina (4%) foram realizados a 36°C (temperatura corporal de mamíferos) e 42°C (temperatura corporal de aves), seguindo o protocolo descrito por Eaton & Gasson (2001).

3.1.3 Pesquisa dos genes dos fatores de virulência

A detecção da presença dos genes *agg*, *ace* e do operon *bopABCD* envolvidos com a virulência e formação de biofilme, foi realizada por PCR. A reação foi realizada em termociclador (Amplitherm- Thermal Cyclers). As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores e as temperaturas de anelamento estão demonstradas na Tabela 1. Para a reação de PCR foram utilizados: 1µl de DNA bacteriano (100ng), 10 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 200 µM de cada dNTP, 1U de *Taq* DNA Polimerase, 1,5 mM de MgCl₂, tampão de reação e água MilliQ. Os fragmentos foram amplificados em termociclador sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C por 1 minuto; temperatura de anelamento (tabela 1) por 1

minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, com extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos da amplificação da PCR foram visualizados em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio e observado através de luz ultravioleta (UV).

TABELA 1. Oligonucleotídeos iniciadores e temperaturas de anelamento utilizados na reação de PCR para amplificação dos genes de *Enterococcus faecalis*.

Genes	Oligonucleotídeos iniciadores (5'-3')	Amplicon (pb)*	Temperatura de anelamento	Referência
<i>ddl_{E-faecalis}</i>	CACCTGAAGAAACAGGC ATGGCTACTTCAATTTACAG	475	52°C	Depardieu et al. (2004)
<i>agg</i>	AAGAAAAAGTAGACCAAC AACGGCAAGACAAGTAAATA	1553	56°C	Eaton & Gasson (2001)
<i>ace</i>	AAAGTAGAATTAGATCACAC TCTATCACATTTCGGTTGCG	320	56°C	Duprè et al.(2003)
<i>bopA</i>	CAGCGACATGGACAGCCTAC TTGCAGGACCGTCGAGTAAA	108	48°C	Cassenego et al. (2013)
<i>bopB</i>	ATGACAGAATCCAAAACACTGC TTACGAAGGGGTTGATTACAC	687	48°C	Cassenego et al. (2013)
<i>bopC</i>	TTATAGAAGGTTAAATTGAT ATGAAGGATAATCGTATCAC	1010	48°C	Cassenego et al. (2013)
<i>bopD</i>	GGCTTCCTCGTTGATGGCTTC ACGGCACGGAATTTGGGTAAC	126	60°C	Hufnagel et al. (2004)

* pb= pares de bases

3.1.4 Formação de biofilme *in vitro*

Os ensaios de biofilme foram realizados em todos os isolados de acordo com protocolo modificado de Stepanovic et al. (2000). As amostras foram incubadas por 16 horas a 37°C em ágar BHI. As culturas foram diluídas em 5 mL de solução salina (0,9%) até atingir a concentração de $1,5 \times 10^8$ células bacterianas/ml de solução. Após, foram depositadas em microplacas de poliestireno com 96 poços utilizando caldo Luria Bertani (LB) acrescido de 10% de sangue de carneiro (LBS) ou LB acrescido de 10% de urina humana (LBU) ou LB acrescido de 0,75% de glicose (LBG). Os isolados foram crescidos a

37°C por 16 horas com todos os suplementos citados e os ensaios realizados com meio acrescido de glicose (0,75%) ou sangue (10%) também foram incubados a 42°C. Após, as células planctônicas foram coletadas por aspiração e os poços lavados três vezes com 200 µl de solução salina. Para fixação das células aderidas, foram adicionados 150 µl de álcool metílico em cada poço por 15 minutos. Após, as placas foram secadas em temperatura ambiente por 16 horas. Para determinar a quantificação do biofilme formado, 150 µl de uma solução de cristal violeta 0,5% foram adicionados em cada poço e as placas incubadas por 15 minutos e lavadas em água corrente. Para leitura, 150 µl de álcool 95% foram adicionados a cada poço. A densidade ótica (DO) dos biofilmes bacterianos foi determinada em leitor espectrofotométrico de microplacas utilizando filtro de comprimento de onda de 595 nm. Cada teste foi realizado em triplicatas e a formação do biofilme determinada a partir da densidade ótica obtida seguindo os critérios de Stepanovic et al. (2000). A cepa *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 35984) foi utilizada como controle positivo (forte aderente) em todos os ensaios.

A DO média do controle negativo foi utilizada como ponto de corte. Os isolados foram classificados como: $DO \leq DOc$ Não-aderente; $DOc < DO \leq 2x DOc$ Fraco aderente; $2x DOc < DO \leq 4x DOc$ Moderado aderente; $4x DOc < DO$ Forte aderente.

3.1.5 Análise estatística

Os resultados obtidos em *score* seguiram a normalidade e foram submetidos à análise da variância (ANOVA) e ao teste de Kruskal-Wallis a 1%

(sendo $P \leq 0,05$), para comparar a presença dos fatores de virulência e a intensidade de formação de biofilme entre os isolados, os suplementos e as temperaturas utilizadas. Para tanto, utilizou-se o programa estatístico *Graphpad Prism* versão 5.0.

3.2 Experimento 2

Isolados de *Enterococcus faecalis* foram analisados geneticamente de acordo com resultados obtidos por análise de PCR relativas à presença dos genes de fatores de virulência e resistência antimicrobiana em seu DNA cromossomal. Teve por objetivo avaliar a distribuição e diversidade dos fatores de virulência em *Enterococcus faecalis* isolados de diferentes fontes (alimentos, clínicos e frangos) e, por meio de análise filogenética, os isolados foram agrupados em *clusters* a fim de estabelecer uma relação ambiental x temporal.

3.2.1 Origem das amostras de *Enterococcus faecalis*

Foram selecionados ao todo 182 *Enterococcus faecalis* isolados durante o ano de 2005 a 2009, sendo 70 provenientes de suabes cloacais de frangos de corte coletados de animais pertencentes a um experimento realizado no Departamento de Zootecnia (UFRGS) em 2009; 52 de amostras clínicas, como sangue, urina e outras secreções corpóreas coletadas de pacientes hospitalizados durante os anos de 2005 a 2009 e 60 de origem alimentar, coletados de vegetais, derivados de leite e carnes, durante os anos de 2006 a 2007 (Riboldi et al., 2008; Frazzon et al., 2009; Cassenego et al.,

2011 e 2013). Os isolados selecionados foram provenientes da bacterioteca do Departamento de Microbiologia (ICBS/UFRGS) e do Laboratório de Cocos Gram-positivos da UFCSPA. Todos os isolados foram confirmados em nível de gênero e espécie pela técnica de Reação em cadeia pela Polimerase (PCR). As sequências dos primers dos genes utilizados na identificação (*tuf*_{*Enterococcus*} e *ddl*_{*E.faecalis*}) e pesquisa dos genes de virulência estão demonstrados na tabela 2.

TABELA 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR.

Genes de virulência	Sequência nucleotídica (5'-3')	Tamanho do amplicon (pb)*	Temperatura de anelamento (°C)	Referência
<i>tuf</i>	TACTGACAAACCATTCATGATG AACTTCGTCACCAACGCGAAC	112	54	(Jackson et al, 2012)
<i>ddl</i> _{<i>E.faecalis</i>}	CACCTGAAGAAACAGGC ATGGCTACTTCAATTTACAG	475	52	(Depardieu et al., 2004)
<i>agg</i>	AAGAAAAAGTAGACCAAC AACGGCAAGACAAGTAAATA	1553	54	(Duprè et al., 2003)
<i>ace</i>	AAAGTAGAATTAGATCACAC TCTATCACATTCGGTTGCG	320	52	(Dupont et al., 2008)
<i>bopA</i>	CAGCGACATGGACAGCCTAC TTGCAGGACCGTCGAGTAAA	108	60	(Cassenego et al., 2013)
<i>bopB</i>	ATGACAGAATCCAAACTGC TTACGAAGGGTTGATTCAC	687	56	(Cassenego et al., 2013)
<i>bopC</i>	TTATAGAAGGTAAATTGAT ATGAAGGATAATCGTATCAC	1010	48	(Cassenego et al., 2013)
<i>bopD</i>	GGCTTCCTCGTTGATGGCTTC ACGGCACGGAATTTGGGTAAAC	126	66	(Hufnagel et al. (2004)
<i>tet(M)</i>	GTAAATAGTGTTCTTGAG CTAAGATATGGCTCTAACAA	406	54	(Frazzon et al., 2009)
<i>tet(L)</i>	ACTCGTAATGGTGTAGTTGC TGTAACCTCCGATGTTAACACG	625	58	(Frazzon et al., 2009)

*pares de base

3.2.2 Extração do DNA total de *Enterococcus faecalis* e amplificação dos genes de virulência por PCR

Os isolados cresceram em meio BHI líquido a 35°C por 24 horas. O DNA total foi extraído usando o protocolo descrito no experimento 1 (Casseneo et al., 2013). A avaliação da presença dos genes envolvidos com formação de biofilme codificados com o operon *bopABCD*, os genes envolvidos com agregação celular (*agg*) e adesão ao colágeno (*ace*) e os genes de resistência a tetraciclina *tet(M)* e *tet(L)* foi realizada pela técnica de PCR. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores e as respectivas temperaturas de anelamento estão demonstradas na tabela 2.

As reações de PCR foram realizadas em volume total de 25 µl contendo: 200 µM de cada dNTP, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,5 mM de MgCl₂, tampão 1x de *Taq* polymerase, 1,25 U de *Taq* polymerase (Gibco BRL, France) e 100 ng de DNA. A PCR foi feita em termociclador Omnigene DNA (Hybaid, UK). Os programas utilizados foram: 1 ciclo a 94°C por 4 minutos; 40 ciclos a 94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento (tabela 2) por 1 minutos; 1 ciclo de 72°C por 2 minutos e 1 ciclo de 72°C por 15 minutos.

3.2.3 Construção da árvore filogenética

Todos os 182 isolados foram organizados em uma grande árvore filogenética, agrupados de acordo com a presença dos genes de virulência pesquisados por PCR e seus *clusters* foram divididos de acordo com o método de análise estatística empregado.

3.2.4 Análise estatística

Os resultados foram submetidos a análises estatísticas utilizando o programa *Paleontological statistics software package for education and data analysis* (PAST) versão 2.17c e seguiram a normalidade. A construção do dendrograma foi realizada utilizando coeficiente de similaridade de *Jaccard*.

3.3 Experimento 3

O terceiro experimento teve por objetivo avaliar a capacidade de formação de biofilme microbiano *in vitro* de 126 *Enterococcus faecalis* isolados de amostras clínicas e alimentares, assim como determinar sua atividade gelatinolítica em duas temperaturas (36°C e 42°C) e em meio de cultura suplementado com 0,75% de glicose, 10% de sangue e 10% de urina. Seus resultados serão organizados em um terceiro manuscrito referente ao objeto de estudo da tese.

3.3.1 Ensaio *in vitro* de formação de biofilme microbiano

Foram selecionados 126 *Enterococcus faecalis* isolados sendo 60 clínicos e 66 alimentares. Os ensaios foram conduzidos sob as mesmas condições descritas no experimento 1 de acordo com protocolo modificado de Stepanovic et al. (2000): as amostras foram incubadas por 16 horas a 37°C em ágar BHI. As culturas foram diluídas em 5 ml de solução salina (0,9%) até atingir a concentração de $1,5 \times 10^8$ células bacterianas/mL de solução. Após, foram depositadas em microplacas de poliestireno com 96 poços utilizando caldo Luria Bertani (LB) acrescido de 10% de sangue de carneiro (LBS) ou LB

acrescido de 10% de urina humana (LBU) ou LB acrescido de 0,75% de glicose (LBG). Os isolados foram crescidos a 37°C por 16 horas com todos os suplementos citados e os ensaios realizados com meio acrescido de glicose (0,75%) ou sangue (10%) também foram incubados a 42°C. Após, as células planctônicas foram coletadas por aspiração e os poços lavados três vezes com 200 µl de solução salina. Para fixação das células aderidas, foram adicionados 150 µl de álcool metílico em cada poço por 15 minutos. Após, as placas foram secadas em temperatura ambiente por 16 horas. Para determinar a quantificação do biofilme formado, 150 µl de uma solução de cristal violeta 0,5% foram adicionados em cada poço e as placas incubadas por 15 minutos e lavadas em água corrente. Para leitura, 150 µl de álcool 95% foram adicionados a cada poço. A densidade ótica (DO) dos biofilmes bacterianos foi determinada em leitor espectrofotométrico de microplacas utilizando filtro de comprimento de onda de 595 nm. Cada teste foi realizado em oitoplicatas e a formação do biofilme determinada a partir da densidade ótica obtida seguindo os critérios de Stepanovic et al. (2000). A cepa *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 35984) foi utilizada como controle positivo (forte aderente) em todos os ensaios.

A DO média do controle negativo foi utilizada como ponto de corte. Os isolados foram classificados como: $DO \leq DOc$ Não-aderente; $DOc < DO \leq 2x DOc$ Fraco aderente; $2x DOc < DO \leq 4x DOc$ Moderado aderente; $4x DOc < DO$ Forte aderente.

3.3.2 Detecção de atividade gelatinolítica

Ensaio *in vitro* para a detecção de atividade da enzima gelatinase em ágar suplementado com gelatina (4%) foram realizados a 36°C (temperatura corporal de mamíferos) e 42°C (temperatura corporal de aves), seguindo o protocolo descrito por Eaton & Gasson (2001).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimento 1

4.1.1 Atividade da enzima gelatinase dos *Enterococcus faecalis* isolados de cloaca de frango sob diferentes temperaturas

Diante dos resultados obtidos em percentual, pôde-se atribuir maior número de isolados com atividade da enzima gelatinase em temperatura de 36°C em detrimento a 42°C. No que se refere à dieta empregada aos animais, todos isolados (100%) apresentaram atividade gelatinolítica quando submetidos a 36°C de crescimento independente da presença do ionóforo. Por outro lado, sob crescimento a 42°C, temperatura corpórea das aves, o percentual de atividade da enzima foi variável entre 81,8% e 88,5%, na ausência e presença de anticoccidiano, respectivamente, não apresentando grande diferença de valores no comportamento fenotípico referente ao tratamento empregado.

Neste estudo foi possível constatar um mecanismo de resposta adaptativa ao meio de crescimento quanto à atividade da enzima gelatinase de *Enterococcus faecalis* isolados de suabes cloacais de frangos de corte em função da temperatura de crescimento empregada. No entanto, apesar da temperatura corpórea das aves, nem todos os isolados de frangos mostraram

tal capacidade de adaptação, visto que a atividade da enzima diminuiu com o aumento da temperatura. Este resultado já foi detectado por Marinho et al. (2013) que obteve resultados similares no fenótipo de gelatinase em diferentes temperaturas de crescimento (28, 37 e 45°C) em *Enterococcus faecalis* isolados de alimentos e amostras clínicas. Yeong et al. (2011), também observaram diferenças na atividade da enzima gelatinase em *Enterococcus faecalis* isolados de frangos de diferentes sistemas de criação, onde 90,9% dos enterococos isolados de frangos de corte foram positivos para atividade da enzima gelatinase, quando comparados com 88% dos isolados provenientes de aves criadas em sistema extensivo. Por outro lado, os resultados observados para a atividade da enzima gelatinase são diferentes dos apresentados por Poeta et al. (2006) que pesquisaram a atividade de gelatinase em enterococos isolados de fezes de frangos de corte e observaram que apenas 47% destes apresentavam fenótipo positivo.

A atividade da enzima gelatinase é influenciada por diversos parâmetros ambientais, tais como meio de cultura, variação de pH, diferença de atividade *in vitro/in vivo*, formação de cátions divalentes e diferentes fontes de carbono, anteriormente relatadas no que se refere à influência na atividade gelatinolítica das células bacterianas. A produção de gelatinase é sensível ao calor, principalmente quando em temperaturas maiores que 50°C, sendo associada também com o tempo de crescimento. Sua atividade varia amplamente quando células bacterianas são suplementadas com diferentes carboidratos como fonte de carbono e aumentam na presença de arabinose, xilose, glicose, maltose e manose, enquanto diminuem com outros diversos

açúcares (Pires-Bouças et al. 2010). Macovei et al. (2009) relataram a plasticidade genômica e a importância da pressão seletiva na manutenção da virulência bacteriana, onde alguns isolados, após longo período de descanso metabólico em temperaturas baixas (4-8°C) e em subculturas, perderam sua capacidade de expressar a gelatinase.

4.1.2 Distribuição dos genes dos fatores de virulência entre os isolados de cloaca de frango em relação às dietas

A distribuição dos genes *ace*, *agg* e do operon *bopABCD* avaliada de acordo com a presença ou não de anticoccidiano na dieta dos frangos está demonstrada no Tabela 3. O gene *agg* apresentou maior frequência nos *Enterococcus faecalis* isolados dos frangos que receberam a dieta suplementada com anticoccidiano (92,3%), quando comparado ao grupo que não recebeu anticoccidiano (70,5%). O gene *ace* não apresentou variação significativa na sua frequência entre os dois grupos de frangos (90,9-96,1%). Os genes do operon *bopABCD* foram identificados em ambos os grupos dos animais e sua frequência não foi significativamente afetada pela presença ou ausência de anticoccidiano na dieta dos frangos ($P \leq 0,05$). Todos isolados apresentaram mais de um gene pesquisados.

TABELA 3. Frequência dos genes codificadores dos fatores de virulência detectados em cepas de *Enterococcus faecalis* isolados de frangos de corte infectados com *Eimeria* spp.*

Genes	Dieta sem anticoccidiano (n=44)		Dieta com anticoccidiano (n=26)		Total (n=70)	
	N	%	N	%	N	%
<i>agg</i>	31	70,5	24	92,3	55	80
<i>ace</i>	40	90,9	25	96,1	65	92,85
<i>bopA</i>	43	97,7	26	100	69	98,6
<i>bopB</i>	37	84,1	23	88,4	60	85,7
<i>bopC</i>	44	100	25	96,1	69	98,6
<i>bopD</i>	44	100	26	100	70	100

*P≤0,05.

A frequência do gene *agg* observado no presente estudo está de acordo com outros estudos com *Enterococcus faecalis* de isolados de amostras clínicas e alimentares (Eaton & Gasson, 2001; Franz et al., 2001; Mannu et al., 2003; Martín et al., 2006; Barbosa et al., 2010). O gene *agg* apresentou maior frequência nas cepas que foram isoladas dos frangos que receberam dieta suplementada de anticoccidiano, quando comparado com o grupo que não recebeu anticoccidiano. A diferença entre os índices apresentados pode estar relacionada ao quadro diarreico causado pela *Eimeria* spp., que causa uma modificação estrutural das vilosidades intestinais, levando a um encurtamento destas, resultando em diminuição da capacidade de absorção e predispõe os frangos a disbiose (alteração do equilíbrio bacteriano no organismo) (Williams, 2005). A função da proteína Agg tem sido relatada na bibliografia, como sendo responsável pelo aumento da aderência de *Enterococcus* ao epitélio intestinal e renal. Esta destruição das células epiteliais do intestino pode ter sido uma das causas da redução na frequência do gene *agg* nos *Enterococcus faecalis* isolados do grupo de frangos que não recebeu anticoccidiano. Em

Enterococcus faecalis o gene *agg* está localizado em um plasmídeo responsivo a feromônios, causando agregação entre células doadoras e receptoras, facilitando a transferência de plasmídeos que podem carrear genes de virulência e resistência antimicrobiana (Barbosa et al., 2010). Portanto, um epitélio intestinal com possíveis danos teciduais e maior absorção de líquidos pelo interstício e luz intestinal, torna-se um ambiente desfavorável para agregação celular e posterior processo de estabelecimento de biofilme microbiano neste ambiente de crescimento. Apesar da diferença no percentual dos dois grupos tratados, os frangos que não receberam anticoccidiano na dieta também apresentaram alto percentual de genes dos fatores de virulência. Tal fato pode ser atribuído a presença de diarreia nos animais não tratados, selecionando através do fluxo intestinal aumentado, bactérias mais patogênicas (com maior número de genes de virulência), e conseqüentemente, mais resistentes às variações do ambiente intestinal. Esses resultados concordam com os apresentados por Hume et al. (2012) que demonstram efeitos negativos da infecção por *Eimeria*, modificando a população microbiana do ceco. Tal fato foi anteriormente relatado por Collier et al. (2008), demonstrando que esse gênero de coccídios pode desenvolver um papel importante na patologia de coccidioses cecais, tendo forte efeito na taxa da comunidade bacteriana dominante.

Por outro lado, o único estudo que relata a influência do quadro clínico diarreico sobre a presença de bactérias com múltiplos fatores de virulência, foi realizado em *Escherichia coli* isoladas de bezerros com e sem diarreia. A pesquisa observou que os fatores de virulência eram mais

prevalentes em *Escherichia coli* isoladas dos bezerros que apresentavam quadro clínico de diarreia, causado por vários agentes enteropatogênicos, entre eles, *Eimeria* spp. (Herrera-Luna et al., 2009). Em trabalho realizado por Martynova-VanKley et al. (2012), uma análise de pirosequenciamento da microbiota bacteriana de frangos infectados com *Eimeria* spp. e tratados com óleos essenciais sugere que os animais tratados apresentaram uma modulação positiva na microbiota a qual pode causar impactos favoráveis ao hospedeiro, concordando com nosso estudo. Animais tratados com dietas contendo anticoccidianos têm seu quadro clínico diarreico diminuído e, com isso, sua microflora em equilíbrio, permitindo a comensalidade entre cepas com maior ou menor número de genes de virulência.

O gene *ace* que codifica uma proteína com características de adesina bacteriana e ligante a colágeno do tipo I, não apresentou variação significativa quanto à diferença nas frequências entre os dois grandes grupos de frangos ($P > 0,05$). Este gene tem sido apontado como um importante fator de virulência, onde sua deleção resulta em significativa atenuação de *Enterococcus faecalis* (Singh et al., 1998; Piekarska & Jagielski, 2007). Tal característica justifica a elevada frequência do gene em ambos os grupos de frangos. A frequência do gene *ace* em ambos os grupos está de acordo com outros estudos que avaliaram a presença deste gene em amostras de suabes cloacais de frangos. Diarra et al. (2010) detectaram o gene *ace* em todos os *Enterococcus faecalis* isolados de frangos pesquisados. Olsen et al. (2011) pesquisaram o gene *ace* em isolados clínicos e de frangos e detectaram a presença do gene em todas as amostras pesquisadas.

Os genes do operon *bopABCD* foram identificados em ambos os grupos de frangos e sua frequência não foi significativamente afetada pela presença ou ausência de anticoccidiano na ração. O operon *bop* tem sido descrito no envolvimento do metabolismo da maltose e formação de biofilme. Os genes *bopA*, *bopC* e *bopD* foram detectados com elevada frequência em ambos os grupos de frangos. O gene *bopB* também não apresentou diferenças entre os frangos que receberam ou não anticoccidiano na ração, entretanto apresentou uma frequência menor quando comparado com *bopA*, *bopC* e *bopD*. Até o momento, não existem registros nem dados de outros estudos envolvendo a incidência dos genes do operon *bopABCD* em cepas de *Enterococcus faecalis* ou em outras espécies do gênero *Enterococcus*. Este estudo é o primeiro a estimar a incidência de fatores de virulência de *Enterococcus faecalis* isolados de frangos que receberam uma solução contendo oocistos de *Eimeria maxima* e *Eimeria acervulina* e dieta padrão contendo ou não anticoccidiano (monensina). Apesar de evidenciado o importante papel desses genes na formação e persistência do biofilme microbiano, mais pesquisas são requeridas no objetivo de estudar a atividade de outros fatores de virulência envolvidos na formação de biofilmes.

4.1.3 Capacidade de formação de biofilme *in vitro* sob diferentes meios e temperaturas

A capacidade de formar biofilme foi observada em todos os isolados quando crescidos no meio de cultura LB suplementado com 10% de sangue, 10% de urina ou 0,75% de glicose nas temperaturas de 36°C e 42°C. Os perfis

fenotípicos de formação de biofilme dos isolados de *Enterococcus faecalis* de acordo com a dieta empregada, substratos dos meios de cultura e temperaturas de crescimento utilizadas estão demonstrados na Tabela 4. Isolados de *Enterococcus faecalis* provenientes dos frangos de corte submetidos à dieta com anticoccidiano apresentaram maiores índices de forte aderência quando crescidos na presença de 0,75% de glicose (92,3-88,5%) e 10% de urina (77%), quando comparados com enterococos isolados de frangos que não receberam anticoccidiano na dieta. Por outro lado, quando os mesmos isolados foram crescidos na presença de 10% de sangue, observou-se uma elevada frequência de isolados moderados formadores de biofilme em ambas as temperaturas e dietas (52-69%).

TABELA 4. Relação do fenótipo de formação de biofilme com os diferentes meios de cultura e temperaturas de incubação de 36°C e 42°C em *Enterococcus faecalis*.

Número de isolados produtores de biofilme (%)															
Dieta ^d	LBG ^a						LBS ^b						LBU ^c		
	36°C			42°C			36°C			42°C			36°C		
	Fo ^e	M ^e	Fr ^e	Fo ^e	M ^e	Fr ^e	Fo ^e	M ^e	Fr ^e	Fo ^e	M ^e	Fr ^e	Fo ^e	M ^e	Fr ^e
S/Aco	90,9	0	9,1	59,1	36,3	4,5	31,8	52,2	15,9	11,3	61,3	27,2	63,6	29,5	6,8
C/Aco	92,3	7,7	7,7	88,5	88,5	0	23,1	69,2	7,7	23,1	53,8	23,1	77	19,2	3,8

^a: LBG: meio LB suplementado com 0,75% de glicose,

^b: LBS: meio LB suplementado com 10% de sangue,

^c: LBU: meio LB suplementado com 10% de urina,

^d: Dietas: S/Aco: sem anticoccidiano; C/Aco: Com anticoccidiano,

^e: Fr: fraco aderente; M: moderado aderente; Fo: forte aderente.

O maior número de *Enterococcus faecalis* apresentando fenótipo de forte aderente foi observado nos isolados provenientes dos frangos que receberam uma solução contendo oocistos de *Eimeria maxima* e *Eimeria acervulina* e a dieta padrão contendo anticoccidiano. A presença de anticoccidiano na dieta, mantém a integridade intestinal, melhora a digestão e a

absorção de nutrientes, disponibilizando o máximo de energia necessária para o crescimento e multiplicação celular bacteriana. Quando o animal está infectado por *Eimeria* spp. e não é realizado tratamento adequado, sua integridade intestinal fica comprometida e os nutrientes normalmente usados no desenvolvimento do animal e também dos micro-organismos presentes não são absorvidos de maneira efetiva. Em ambos os casos observam maior índice de forte aderente em 36°C de temperatura de crescimento *in vitro*, sendo esta a temperatura ideal do crescimento celular de *Enterococcus faecalis in vivo*. Porém, altos índices também foram observados na temperatura de 42°C, revelando adaptação dos isolados aos diferentes ambientes e temperaturas não ideais aumentando o seu potencial patogênico pela presença de genes de virulência.

Em relação aos suplementos adicionados ao meio de cultura, a presença de 0,75% de glicose elevou os índices de isolados classificados como fortes aderentes em ambos os grupos de frangos e temperaturas de crescimento testadas. Entretanto, o grupo de animais que recebeu anticoccidiano na dieta, apresentou maiores índices de isolados fortes aderentes. A alta disponibilidade de nutrientes com fonte de carbono, como a glicose, permitiu maior crescimento e multiplicação das cepas e, conseqüente estabelecimento do biofilme microbiano. Marinho et al. (2013) verificaram que a adição 0,75% de glicose ao meio de BHI também influenciou a capacidade de formação de biofilme de *Enterococcus faecalis* isolados de alimentos. Pillai et al. (2004) demonstraram que a formação de biofilme em placas de poliestireno foi maior em meio suplementado com 1% de glicose, concordando com nosso

estudo, assim como outros estudos que mostram a influência da glicose na formação de biofilme através de um regulador transcricional dependente de glicose (*fsr*) mediando o controle de catabólitos através da formação de proteases (Baldassarri et al., 2001; Kristich et al., 2004).

A presença de 10% de urina no meio de cultura estimulou a capacidade dos isolados em formarem biofilmes mais densos, onde 77% dos isolados que receberam anticoccidiano e 63% dos que não receberam, foram classificados como fortes aderentes. Uma explicação para este fenótipo seria primeiro: a urina além de conter ureia em grande quantidade, também apresenta fosfatos, sulfato, amônia, magnésio, cálcio, ácido úrico, creatina, sódio, potássio e outros elementos em menor quantidade. Além disso, tal composição estimula a ativação de diferentes vias metabólicas bacterianas que as torna capazes de degradar tais substâncias e captar nutrientes necessários ao crescimento e multiplicação celular e ativação de mecanismos de expressão gênica necessários para o aumento de sua patogenicidade, como a formação da estrutura do biofilme. O gene *agg*, que codifica a proteína Agg, encontrado no genoma destas bactérias também exerce um papel importante *in vivo*, pois atua na aderência e processo inicial da infecção enterocócica em células renais e do restante do trato urinário (Seno et al., 2005). Estudos realizados com outras enterobactérias patogênicas relatam respostas de sistemas envolvidos na aquisição de ferro e genes envolvidos no metabolismo de açúcares e aminoácidos responsáveis por uma maior adaptação das cepas ao sistema urinário ou à presença de urina (Alteri & Mobley, 2007).

O crescimento de *Enterococcus faecalis* na presença de soro sanguíneo induz a expressão de ligantes de carboidratos responsáveis pela adesão celular (Guzmán et al., 1991). O sangue contém nutrientes como as proteínas albumina e hemoglobina, ferro proveniente das células vermelhas e micronutrientes como aminoácidos, pequenos peptídeos, glicose, lipídios, ácidos graxos, fosfolipídios e triglicerídeos, além da fração celular branca. Células sanguíneas mortas podem compor a matéria orgânica necessária para a formação da matriz do biofilme e seus componentes intracelulares servirem como nutrientes para as células em biofilme, assim como células planctônicas potencialmente capazes de desencadear um novo processo de formação do biofilme microbiano. Vebo et al. (2009) analisaram isolados de *Enterococcus faecalis* cultivados em sangue *in vitro* e concluíram que a regulação dos genes e suas vias sob essas condições revelaram a capacidade de adaptação fisiológica e metabólica, principalmente no metabolismo dos carboidratos, o que pôde ser observado no grande número de isolados que demonstraram formação fenotípica menos densa, classificados como formadores moderados na presença de sangue, uma provável adaptação fisiológica ao meio ambiente em questão.

Comparando os resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que o substrato mais favorável ao crescimento e que estimulou a aderência dos isolados de *Enterococcus faecalis* nas microplacas de poliestireno foi a presença de 0,75% de glicose no meio de cultura LB, independente das temperaturas de crescimento. Entretanto, os altos níveis obtidos a 42°C de temperatura de crescimento sugerem uma grande

capacidade de adaptação dos isolados a condições e hospedeiros como frangos de corte. Os resultados obtidos com suplementação de sangue e urina também apontam o grande potencial patogênico das cepas, visto seu crescimento e capacidade de formação de biofilme na presença de fluidos humanos ou animais (Wani et al., 2012).

Ressaltando a importância deste estudo, *Enterococcus faecalis* isolados de frangos de corte que receberam oocistos de *Eimeria maxima* e *Eimeria acervulina* e ração suplementada ou não com anticoccidiano apresentaram capacidade de se adaptar a diferentes nichos biológicos, como por exemplo, sangue e urina. Associado a esta plasticidade dos microorganismos, a capacidade dos isolados de formar biofilme e a presença de fatores de virulência sugerem que *Enterococcus faecalis* isolados de frangos tratados com anticoccidiano estão mais bem adaptados ao ambiente intestinal dos animais. No futuro, estudos de expressão gênica e análise pós-transcricional destes fatores de virulência poderão esclarecer parte desta complexa fisiologia da formação de biofilme em isolados da espécie *Enterococcus faecalis*.

Os dados do experimento 1 foram publicados na Revista de Pesquisa Veterinária Brasileira, no número 12 do volume 33, entre as páginas 1433-1440, edição de dezembro de 2013.

4.2 Experimento 2

4.2.1 Frequência dos genes dos fatores de virulência e resistência antibiótica entre as amostras

Para caracterizar a distribuição dos genes dos fatores de virulência, 182 *Enterococcus faecalis* foram escolhidos. As amostras são originárias de pacientes, alimentos e animais e foram isolados no Sul do Brasil entre 2005 e 2009. A Tabela 5 mostra a prevalência dos genes dos fatores de virulência em todos os isolados estudados.

Enterococcus faecalis provenientes dos suabes cloacais de frangos são os que apresentaram o maior número de genes de virulência, quando comparados com os isolados alimentares e clínicos. Neste estudo, o gene *ace* foi detectado em 94,2% e 86,6% dos isolados de suabes cloacais de frangos e alimentares, respectivamente, e 75% nos isolados clínicos. O gene *agg* foi observado com maior frequência entre os isolados de frangos (78,5%), seguidos dos isolados clínicos (57,7%) e de alimentos (45%). O gene *bopA* apresenta alta prevalência entres os isolados provenientes dos suabes cloacais (98,5%), seguidos imediatamente pelos isolados de origem clínica (96,1%) e alimentares (90%). Assim como o gene *bopA*, o gene *bopC* também foi mais prevalente entre os isolados de suabes cloacais de frangos (98,5%). O gene *tet(M)*, por sua vez, foi encontrado em 87,1% das amostras de suabes cloacais de frango e em 61,6% dos alimentos e em 57,7% das amostras clínicas.

TABELA 5. Prevalência de fatores de virulência e resistência antimicrobiana entre *Enterococcus faecalis* isolados de frangos de corte, amostras clínicas e alimentares*.

Genes	Percentual de PCR positivas			
	Frangos	Clínicas	Alimentares	Total
<i>ace</i>	94,2	75	86,6	86,2
<i>agg</i>	78,5	57,7	45	61,5
<i>bopA</i>	98,5	96,1	90	95
<i>bopB</i>	85,7	88,4	95	89,5
<i>bopC</i>	98,5	96,1	95	96,7
<i>bopD</i>	100	100	98,3	99,4
<i>tet(L)</i>	18,5	15,4	23,3	19,2
<i>tet(M)</i>	87,1	57,7	61,6	70,3

*P≤0,05

Isolados que apresentaram o gene *bopB*, compreendem 89,5% do total, sendo os de origem alimentar (95%) os que detêm o referido gene em maior número. Níveis elevados também foram observados nos isolados de origem clínica (88,4%) e de cloaca de frangos (85,7%). O gene *bopD* apresentou frequências muito equivalentes (98,3% - 100%) entre os isolados. Entre os genes avaliados no presente estudo, o gene *tet(L)* foi o que apresentou as frequências (23,3 a 15,4%) mais baixas entre os isolados.

Em relação aos os genes do operon *bopABCD*, o gene *bopD* apresentou as frequências mais elevadas (99,4%) entre os isolados avaliados, seguido imediatamente por *bopC* (96,7%), *bopA* (95%) e *bopB* (89,5%). As frequências dos genes de virulência entre as amostras estão de acordo aos observados em outros estudos. McBride et al. (2007) mostraram que os fatores de virulência podem ser encontrados em diversas linhagens de *Enterococcus faecalis*. Prevalência semelhante à observada no presente estudo para o gene *agg* entre os isolados de alimentos e clínicos foram observadas por Dupont et al. (2008), Bittencourt & Suzart (2004) e Eaton & Gasson (2001). Por outro

lado, o gene *agg* foi detectado com uma elevada frequência entre os *Enterococcus faecalis* isolados de amostras de cloacas de frango, quando comparado com os estudos realizado por Poeta et al. (2006) que detectou uma frequência do *agg* de 39,5% em amostras fecais de frangos de corte. Porém a frequência relatada pelos autores ainda foi considerada alta, pois a presença de tal gene foi detectada apenas em isolados de *Enterococcus faecalis* entre todos enterococos pesquisados.

O gene *ace*, que codifica a adesina de colágeno de *Enterococcus faecalis* (Ace), também apresentou níveis elevados entre os isolados de cloaca de frango (94,2%). Esta é uma proteína da superfície celular, específica de *Enterococcus faecalis*, que permite a ligação da bactéria às proteínas da matriz extracelular, colágenos tipo I e IV e laminina e pode desempenhar um papel na patogênese de endocardites (Nallaparedy et al., 2000; Koch et al., 2004). Novamente, Poeta et al. (2006) vem ao encontro dos resultados obtidos neste estudo, com uma prevalência de 62.8% de *Enterococcus faecalis* isolados de amostras fecais de frangos de corte, com *ace* sendo detectado apenas em isolados dessa espécie. Prevalência semelhante às observadas para o gene *ace* entre as amostras clínicas no presente estudo foi encontrada por Nallaparedy & Murray (2008) que detectaram uma frequência de 60% do gene *ace*. A prevalência de 86.6% do gene *ace* nos isolados alimentares também corroboram com os determinados por Cariolato et al. (2008) em amostras de alimentos. Diarra et al. (2010), demonstraram que 100% de *Enterococcus faecalis* isolados de fezes ou ceco de frangos de corte continham o gene *ace*. Olsen et al. (2011) pesquisaram o gene em isolados de humanos com

bacteremia e suabes cloacais de frangos de corte e também obtiveram 100% de presença do gene e 99% de similaridade de *ace* entre os diferentes isolados estudados em ambas origens. Silva et al. (2013) demonstraram diferentes níveis de presença do gene *ace* variando entre 75 e 94.2% em *Enterococcus faecalis* isolados de frangos e amostras clínicas de humanos hospitalizados, respectivamente.

Os genes do operon *bopABCD*, foram observados com elevada frequência entre todos os isolados. O gene *bopA* codifica uma glicosiltransferase, imediatamente *downstream* localiza-se *bopB* responsável pela polimerização da enzima fosfoglicomutase, seguido por *bopC*, que codifica uma aldolase-1-epimerase. O último gene do operon, o *bopD*, é o regulador transcricional ligante de açúcar e está envolvido na formação de biofilme por *Enterococcus faecalis* (Hufnagel et al., 2004). Até o momento, não existem estudos sobre a prevalência dos genes do operon *bopABCD* em isolados de *Enterococcus faecalis* isolados de amostras clínicas e alimentares. O único trabalho que avalia a prevalência deste operon, foi realizado pelo grupo (Cassenege et al., 2013) em amostras de cloacas de frango. Outro dois estudos realizados por Creti et al. (2006) e Hufnagel et al. (2004) avaliaram a importância do gene *bopD* em isolados de *Enterococcus faecalis* com a formação de biofilme, apoiando a hipótese de que este gene é importante na formação de biofilme.

Os resultados observados para os genes *tet(M)* e *tet(L)* estão de acordo com estudos realizados por vários autores (Aarestrup et al., 2000; De Leener, 2004; Cauwerts et al., 2007; Frazzon et al., 2009). O gene *tet(L)* foi

encontrado em menor número nos isolados pesquisados (19,2%). Este gene codifica proteínas de membrana, denominadas de efluxo, na qual carregam para o meio extracelular moléculas como a tetraciclina e doxiciclina (Chopra & Roberts, 2001). O gene *tet(M)* é comumente localizado no cromossomo bacteriano e pode ser carregado por transposons conjugativos da família Tn916/Tn1545 (Clewell et al., 1995; Poeta et al., 2006). Situação similar foi encontrada durante uma pesquisa realizada em hospitais na França, onde 229 enterococos foram isolados durante 10 coletas. Neste estudo, os genes *tet(M)* e *tet(L)* tiveram alta prevalência entre as amostras e foram os determinantes para resistência à tetraciclina (Charpentier et al., 1994). A menor frequência do gene *tet(L)* pode ser explicada em razão da sua transferência para as outras células uma vez que tal gene é capaz de transferir-se de forma independente. Por outro lado, a associação do gene *tet(M)* com elementos conjugativos como transposons tem sido um fator importante para a disseminação de resistência à tetraciclina em enterococos (Chopra & Roberts, 2001).

4.2.2 Diversidade filogenética dos genes de virulência e resistência de *Enterococcus faecalis*

O agrupamento filogenético foi feito com base no método de PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores referentes aos genes dos fatores de virulência do operon *bopABCD*, *agg*, *ace*, *tet(M)* e *tet(L)*. A árvore filogenética foi construída a partir da análise da presença desses genes em isolados de diferentes ambientes a fim de avaliar a variabilidade genética dos isolados (Figura 1). Um total de 182 cepas de *Enterococcus faecalis* isoladas de

humanos, frangos de corte e alimentos foram distribuídos em quatro grupos filogenéticos (A, B, C e D) e quatro subgrupos (A1, A2, B1 e B2). Os grupos A e B mostraram 65% de similaridade e possuem 173 dos 182 isolados testados. O grupo B contém a maioria dos isolados pesquisados (161 isolados, 87,36%), seguido pelo grupo A (12 isolados, 6,59%). Nove isolados (4,94%) não foram agrupados nos grupos descritos acima, porque tinham coeficientes de similaridade de 0,16 e 0,52. Estes isolados foram reunidos em dois grupos, de modo a facilitar a compreensão, e chamados C e D, respectivamente.

O grupo A foi dividido em dois subgrupos (A1 e A2), com um coeficiente de similaridade acima de 0,70 indicando a proximidade genética. Em A1, foi incluído apenas um *Enterococcus faecalis* isolado de cloaca de frangos que foi positivo para todos os genes do operon *bopABCD* e também do gene *tet(M)*. O subgrupo A2 composto por cepas com operon *bop* completo com seis isolados de origem clínica (sangue e urina) e cinco isolados de alimentos (laticínios, legumes e carne) pertenciam a este subgrupo.

As diferenças entre as cepas do grupo B geraram dois subgrupos, B1 e B2, com coeficientes de similaridade 0,73, indicando a proximidade genética e sugerindo que esses isolados podem representar um pool genético de cepas de *Enterococcus faecalis*. O grupo B1 foi subdividido em dois subgrupos, gerando B1.1 e B1.2 com coeficientes de similaridade 1,0.

O B1.1 foi composto por sete isolados (3 de suabes cloacais de frangos de corte e 4 de diversos alimentos, tais como carne, laticínios e verduras) que foram positivos para os genes do operon *bop*, *ace*, *tet(L)* e *tet(M)*. No B1.2 foram agrupados isolados que possuem os genes de

*bop*ABCD, *ace* e *tet*(L). Os quatro isolados desse subgrupo foram obtidos a partir de vegetais, como batata e batata doce em 2006.

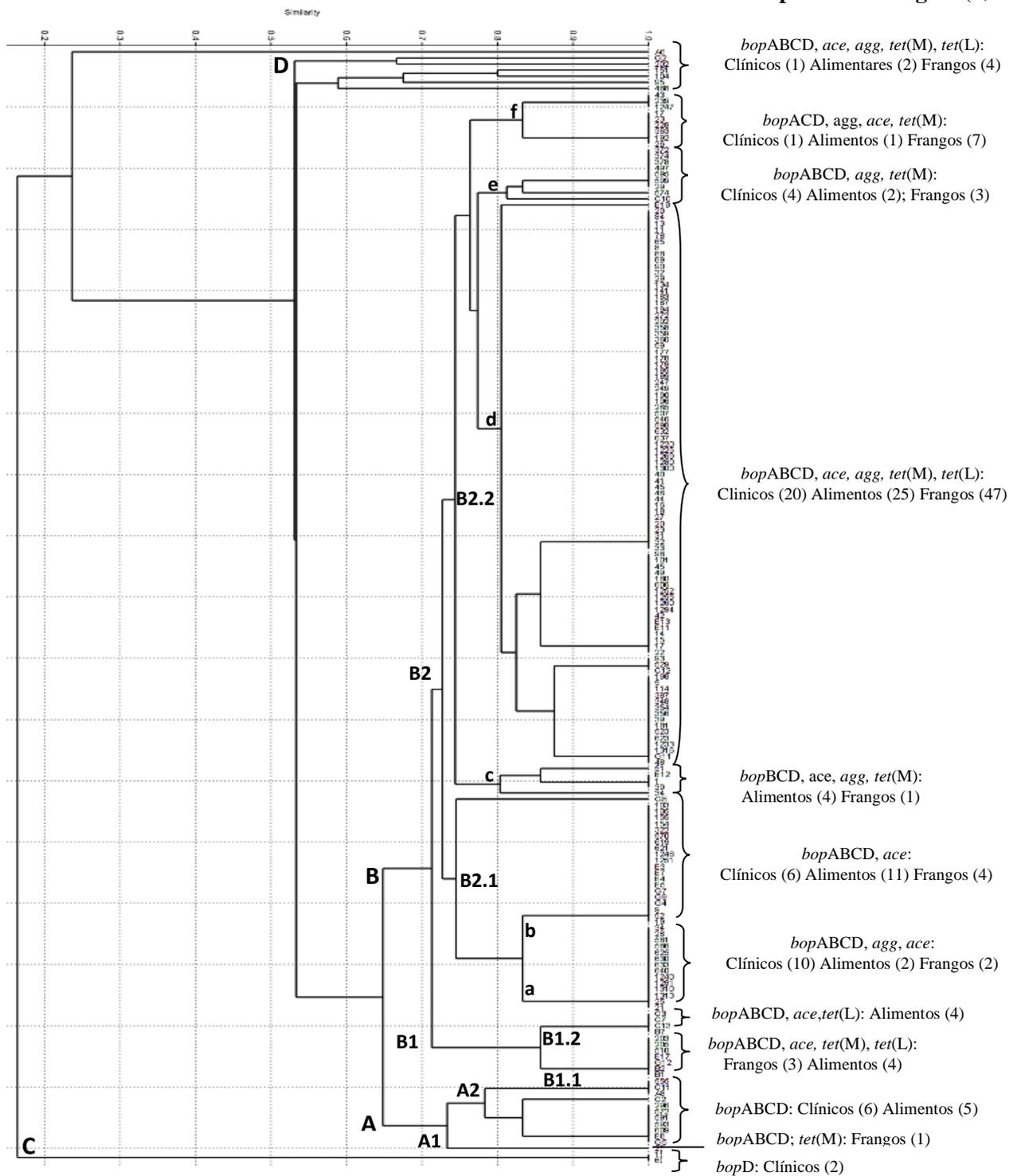


FIGURA 1. Dendrograma baseado em resultados de PCR com oligonucleotídeos iniciadores para fatores de virulência e genes de resistência a antimicrobianos. A similaridade foi calculada utilizando o coeficiente de correlação de Jaccard e os agrupamentos foram construídos com o software PAST.

A maioria dos isolados coletados (150 isolados, 82,41%) foram agrupados no grupo B2. Neste grupo estão 67 dos 70 isolados de suabes cloacais de frangos de corte. Os isolados deste grupo tiveram três ou quatro genes do operon *bop*, além dos genes *tet(L)*, *tet(M)*, *ace* ou *agg*, de acordo com a classificação dos subgrupos. O grupo B2 foi dividido em dois subgrupos, com 75% de similaridade cada, sendo B2.1 e B2.2.

O subgrupo B2.1 foi dividido novamente em "a" e "b" e incluiu 35 isolados. O subtipo "a" contém 14 amostras (10 isolados clínicos de urina, dois alimentos isolados de carcaça de frango em 2007 e de dois frangos isolados em 2008) com os genes *bopABCD*, *agg* e *ace*. O subtipo "b" compreende isolados (seis clínicos, 11 de carcaça de frango e laticínios isolados em 2006 e 2007 e 4 de cloaca de frangos) positivos para *bopABCD* e gene *ace*.

No subgrupo B2.2 foram reunidos 115 isolados divididos em subtipos de "c", "d", "e" e "f" com coeficientes de similaridade 0,8. O subtipo "c" contém quatro isolados de queijo e um isolado de suabes cloacais de frangos. Essas cepas contêm os genes de virulência *bopBCD*, *ace*, *agg*, *tet(M)*. O subtipo "e" agrupou quatro isolados de origem clínica, dois isolados de alimentos e três de suabes de cloaca, e os seus genes presentes são *bopABCD*, *agg*, *tet(M)*. O subtipo "d" é o maior grupo da árvore filogenética e contém 92 isolados, onde 25 foram isoladas a partir de amostras de alimentos,

20 clínicos e 47 isolados de suabes cloacais de frangos e possuem todos os genes estudados. O subtipo "e" contém os genes *bopABCD*, *agg* e *tet(M)*, com quatro isolados clínicos, dois isolados de alimentos e três de aves (cloaca), enquanto o subtipo "f" possui um isolado clínico, um isolado de alimentos e sete isolados de suabes cloacais de frangos e contém os genes *bopACD*, *agg*, *ace* e *tet(M)*. O grupo C contém dois isolados de origem clínica (urina) e o grupo D, agrupou sete isolados, sendo três de suabes cloacais de frangos de corte, dois de alimentos (queijo) e dois de origem clínica (urina) e foram os mais distantes dos outros isolados (coeficientes de similaridade 0,53).

A capacidade de *Enterococcus faecalis* colonizar uma ampla gama de hospedeiros e ambientes mais adequados a um determinado nicho particular pode proliferar e preencher o nicho onde a análise filogenética avalia a presença de fatores de virulência revelando isolados aglomerados de todas as origens em diferentes períodos de tempo. No entanto, a força seletiva que conduz a uma convergência de tais características e adaptabilidade continua a ser estudada. Nossa pesquisa avaliou a diversidade de *Enterococcus faecalis* a partir de diferentes fontes e observou que os isolados apresentam um valor coeficientes de similaridade de 0,65 a 1,0.

Castillo-Rojas et al. (2013) relataram que *Enterococcus faecalis* isolados a partir de amostras de urina, fluido pleural, sangue e água apresentaram coeficiente de similaridade de 0,6, o que sugere que as estirpes foram relacionadas. *Enterococcus faecalis* provenientes de amostras clínicas isoladas de sangue, urina, pus e fluido vaginal de um hospital na Malásia, demonstraram um elevado nível de diversidade na tipagem por PFGE e MLST

concordando com resultados observados neste estudo e em pesquisa realizada por Lloyd et al. (1998), assim como estudo desenvolvido por Silva et al. (2013) utilizando PCR multiplex no mesmo e em outros hospitais.

A técnica de RAPD também é comumente usada na identificação espécie-específica e tipagem, por exemplo, com a utilização do *primer* M13, desenvolvido por Rossetti & Giraffa (2007), também utilizado na análise da diversidade genética de *Enterococcus* por Riboldi et al. (2008) e Costa et al. (2009). A técnica de filotipagem por PCR foi descrita por Clermont et al. (2000) e vem sendo utilizada na avaliação filogenética de diferentes estirpes de *Escherichia coli* utilizando uma combinação de genes (Derakhshandeh et al., 2013). No presente estudo avaliou-se a filotipagem por PCR usando uma combinação de genes de virulência (*agg*, *ace*, *tet(M)*, *tet(L)* e operon *bopABCD*) para *Enterococcus faecalis* e esta técnica mostrou resultados similares aos obtidos pelo método de RAPD também utilizado em *Enterococcus faecalis* em estudo realizado por Costa et al. (2009), sugerindo ser uma técnica alternativa para uma rápida e barata caracterização em diferentes grupos filogenéticos de isolados desta espécie.

Estes estudos sugerem a possibilidade de *Enterococcus faecalis* possuir uma capacidade de adaptação a diferentes ambientes com seu estabelecimento e possível isolamento de amostras de diferentes fontes. Outro estudo sobre o fenótipo de resistência entre as populações de *Enterococcus faecalis* isolados de carcaças de frango após o processamento de refrigeração em cinco lugares diferentes, mostrou que todas as plantas de abate possuem isolados com um alto grau de diversidade, apesar de seu fenótipo de

resistência agrupá-los amplamente em um único cluster, relatando que os procedimentos de padronização provavelmente exercem pressões seletivas conforme os procedimentos operacionais padrões empregados, caracterizando o ambiente como um determinante fenotípico (Olsen et al., 2011).

Cobo Moinhos et al. (2008) sugerem que a presença do operon *ebp* (codificação de pili) em *Enterococcus faecalis*, exerce um papel na ubiquidade das espécies isoladas a partir de amostras clínicas e de alimentos, em que a presença de certas características genéticas aumenta a sua adaptação a ambientes específicos. Este fato exalta a importância da divulgação de enterococos contendo determinantes de virulência e genes de resistência a antimicrobianos em diferentes ambientes, aumentando o seu potencial e capacidade de interagir com hospedeiros humanos.

Em conclusão, as diferenças nas frequências dos genes de virulência em *Enterococcus faecalis* isolados de diferentes origens mostra que os ganhos e perdas genéticas são um papel importante e crucial de adaptação a um novo *habitat* e contribuição para o surgimento de novas cepas adaptadas. No entanto, a árvore filogenética mostra que, apesar das diferentes origens dos isolados e dos diversos perfis genotípicos, a espécie *Enterococcus faecalis* exibe uma grande capacidade de adaptação em diferentes ambientes, mesmo quando ocorre pressão seletiva e alta frequência de troca de genes. Tais características podem permitir sua sobrevivência nesses ambientes e proporcionam sua característica de ubiquidade.

Também é importante observar que os diferentes períodos de isolamento das amostras entre 2005 e 2009 não interferiram na divisão dos

clusters, não sendo considerado um determinante da diversidade genética. Além disso, a técnica de filotipagem por PCR provou ser eficaz, rápida e econômica para o estudo da diversidade de isolados de *Enterococcus faecalis* em diferentes grupos filogenéticas.

Os dados do experimento 2 compõem um segundo manuscrito o qual foi submetido à análise para publicação na Revista Brazilian Journal of Microbiology (anexo).

4.3 Experimento 3

4.3.1 Avaliação da atividade da enzima gelatinase e de diferentes meios de cultura na formação de biofilme por *Enterococcus faecalis*

Primeiramente foi avaliada a atividade da enzima gelatinase nos 126 *Enterococcus faecalis* sob as temperaturas de 36°C e 42°C. Os resultados da avaliação total dos isolados evidenciaram que 80,1% dos isolados tiveram atividade enzimática em temperatura de crescimento de 36°C, enquanto que apenas 54,6% foram positivos para o mesmo teste em 42°C de temperatura de crescimento no mesmo tempo de avaliação. Observando-se as diferentes origens das amostras, isolados clínicos contêm 54,54% de atividade enzimática em temperatura de 36°C, enquanto na temperatura de 42°C, sua atividade foi de 42,42%. Já os isolados de origem alimentar apresentam 85% de fenótipo positivo para gelatinase em 36°C e 33,3% em temperatura de crescimento de 42°C.

Embora gelatinase seja considerada um fator de virulência em enterococos e está comumente associada a isolados clínicos, estudos detectaram enterococos produtores de gelatinase em laticínios e carne (Eaton & Gasson, 2001; Semedo et al., 2003). Thurlow et al. (2010) demonstraram a importância da atividade de gelatinase em modelos experimentais de endocardite, concluindo que essa protease é uma das responsáveis pelo aumento da carga bacteriana em locais de infecção.

Lopes et al. (2006) testaram a atividade de gelatinase em *Enterococcus* clínicos e isolados de leite, mostrando que o fator de virulência gelatinase está disseminado entre as espécies desse gênero e que isolados alimentares também são capazes de produzir gelatinase em níveis percentuais comparáveis aos de isolados clínicos, embora esta capacidade possa ser parcialmente diminuída durante a conservação dos isolados ou amostras a baixas temperaturas, como de refrigeração laboratorial. Com isso, seu potencial de produção em isolados alimentares de enterococos pode ser subestimado, e concorda com os resultados obtidos nesse experimento, demonstrando que a temperatura de crescimento e armazenamento influencia positiva ou negativamente na sua atividade.

A segunda etapa do experimento foi realizada para avaliar a influência da glicose, sangue e urina na formação de biofilme dos isolados em crescimento a 36°C e 42°C. Para tanto, o meio de cultura BHI foi suplementado com 0,75% de glicose, 10% de sangue ou 10% de urina. Todos os isolados foram capazes de formar biofilme nos diferentes meios de cultura (Tabela 6).

O meio suplementado com 0,75% de glicose demonstrou ser o mais adequado para estabelecimento de forte aderência e, conseqüente formação do biofilme microbiano nos isolados de todas as origens. Enquanto que o meio suplementado com 10% de sangue, foi o que registrou os menores índices de forte aderência e as maiores taxas de fraca formação de biofilme. As análises estatísticas (Figura 2) demonstram que em isolados clínicos, a concentração de 0,75% de glicose foi o melhor suplemento independente da temperatura, pois os isolados apresentam maior capacidade de formar biofilme (95,45%). Os suplementos de 10% de sangue e 10% de urina não diferem entre si; e a formação com 10% de sangue, também independe de temperatura (39,4%).

Em relação à origem das amostras, para os isolados alimentares, a presença da 0,75% de glicose demonstrou diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre as temperaturas, sendo que a intensidade do biofilme é maior a 36°C (65%). O meio contendo 10% de urina teve melhor comportamento nos isolados desta origem do que em isolados clínicos, e quando o suplemento é comparado a 0,75% de glicose a 42°C, também com forte formação de biofilme, não apresentam diferenças estatísticas entre si. Já o meio suplementado com 10% de sangue teve comportamento semelhante, tanto em isolados clínicos, como em isolados alimentares, sendo o responsável pelos resultados menos expressivos (1,7% de forte formação a 42°C). Ainda assim, diferem entre si, demonstrando maior potencial de formação a 36°C (10%).

Isolados clínicos apresentam menor variação entre suplementos e temperaturas. Ou seja, apesar da glicose ter sido confirmada estatisticamente como melhor suplemento, seus resultados não diferem quando suas diferentes

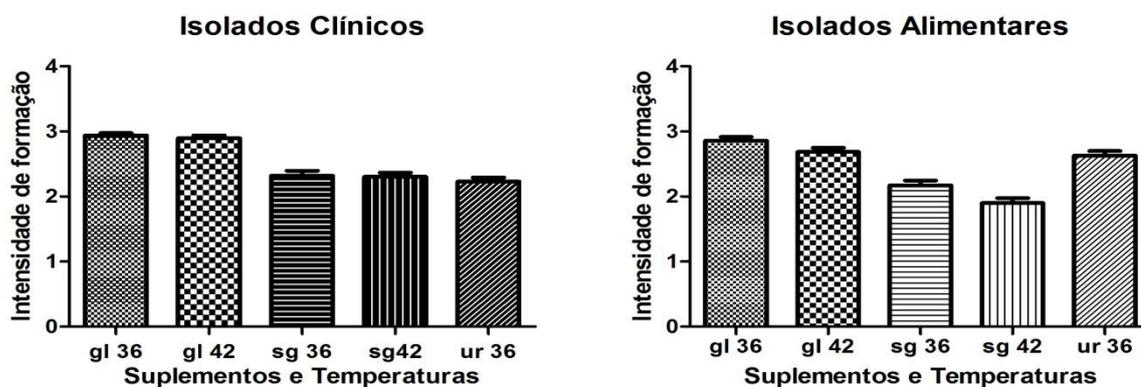
temperaturas são comparadas (90,9 a 95,4% em 0,75% de glicose a 42°C e 36°C). Essa diferença também não se fez notória quando as temperaturas são comparadas com a suplementação de sangue nem em relação a suplementação com urina. Os resultados dos isolados alimentares sugerem uma não adaptação de tais aos suplementos sangue e urina, visto que sua formação de biofilme foi menos intensa do que a encontrada nos isolados clínicos, já adaptados a condições corporais fisiológicas ou patológicas humanas ou animal.

A habilidade de enterococos crescer como biofilme mesmo sob uma variedade de condições ambientais que envolvem hidrodinâmica é reconhecida e pode contribuir para uma colonização mais eficiente dos dispositivos médicos, exercendo assim, seu papel como um importante patógeno hospitalar. Várias condições durante o processo de formação de biofilme podem afetar os resultados obtidos, incluindo as condições de crescimento, o meio de cultivo e a seleção da superfície (Extremina et al., 2011). Os teores de nutrientes do meio de crescimento tais como glicose, disponibilidade de Fe^{++} e CO_2 , soro, osmolaridade, pH e temperatura também influenciam na produção de biofilme (mono ou multi-espécie) entre as diferentes bactérias. O metabolismo de carboidratos regula a produção de biofilme entre várias bactérias Gram-positivas, incluindo *Enterococcus faecalis* (Mohamed & Huang, 2007; Pillai et al., 2004). Uma pesquisa realizada por Baldassarri et al. (2001) mostrou que o meio Caldo Tripsina de Soja (TSB) suplementado com 1% de glicose aumenta a produção de biofilme em *Enterococcus faecalis*, comparado

com TSB sem glicose, concordando com os resultados obtidos nesse experimento.

TABELA 6. Percentual de formação de biofilme por isolados clínicos e alimentares de *Enterococcus faecalis* em diferentes temperaturas e meios de crescimento.

Intensidade de isolados produtores de biofilme (%) com															
Origem de isolados	LBG ^a						LBS ^b						LBU		
	36°C			42°C			36°C			42°C			36°C		
	Fo ^d	M ^d	Fr ^d	Fo ^d	M ^d	Fr ^d	Fo ^d	M ^d	Fr ^d	Fo ^d	M ^d	Fr ^d	Fo ^d	M ^d	Fr ^d
Clínicos	95,4	3	1,5	90,9	7,6	1,5	39,4	53	7,6	31,8	66,7	1,5	28,8	68,2	3
Alimentares	65	31,7	3,3	38,3	51,7	10	10	58,3	30	1,7	56,7	41,7	80	20	0
Total	80,9	16,6	2,4	65,9	28,6	5,5	25,4	55,5	18,2	17,5	61,9	20,6	53,2	45,2	1,6



^a: LBG: meio LB suplementado com 0,75% de glicose,
^b: LBS: meio LB suplementado com 10% de sangue,
^c: LBU: meio LB suplementado com 10% de urina,
^d: Fr: fraco aderente; M: moderado aderente; Fo: forte aderente.

FIGURA 2. Análise da intensidade de formação de biofilme em *Enterococcus faecalis* de acordo com os suplementos e temperaturas testados. (Gl36= glicose, 36°C; Gl42= glicose, 42°C; Sg36= sangue, 36°C; Sg42= sangue 42°C; Ur36= urina, 36°C) nos isolados de diferentes origens ($P \leq 0,05$).

Outro estudo mostrou uma redução na produção de biofilme em *Enterococcus faecalis* com concentrações de glicose aumentadas de zero para 0,2% no meio de cultura (Kristich et al., 2004). O mesmo também observou um

aumento na produção de biofilme em meio suplementado com 0,5% de glicose quando comparado ao meio com 0,2% de concentração do suplemento. Marinho et al. (2013) avaliaram a capacidade de formação de biofilme em isolados de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* nas temperaturas de 10°C, 37°C e 45°C na ausência e presença de 0,75% de glicose e seus resultados vem ao encontro dos resultados obtidos neste estudo, demonstrando que a associação de glicose ao meio de cultura aumenta o potencial de aderência *in vitro* entre 6,2 e 9,6%.

O efeito do soro humano na adesão de *Enterococcus faecalis* também vem sendo pesquisado. Gallardo-Moreno et al. (2002) relataram um aumento na adesão de *Enterococcus faecalis* em superfícies de vidro e silicone com uso de meio de cultura suplementado com 10% de soro humano. Em estudo realizado com transcriptomas Vebo et al. (2009) mostraram que a cepa de *Enterococcus faecalis* V583 revelou respostas adaptativas em crescimento em sangue incluindo o número de fatores de virulência. Observando regulação de genes e suas vias de expressão, revelaram uma nova compreensão sobre suas características fisiológicas e capacidade metabólica, que permite a adaptação e o crescimento de *Enterococcus faecalis* em sangue e concorda que, determinados genes podem ser potenciais candidatos para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas no tratamento de infecções por *Enterococcus faecalis*.

Evidências sugerem que características biológicas no soro e na urina humanos possam desempenhar um papel importante na modulação da virulência em enterococos e seus locais de infecção. Para determinar a

extensão dessa modulação biológica, Shepard & Gilmore (2002) utilizaram PCR em tempo real para comparar os níveis de mRNA em culturas de *Enterococcus faecalis* cultivadas em soro e urina obtidos em meio laboratorial. Variações específicas tanto em ambiente e fase de crescimento foram observadas, demonstrando a ocorrência de mecanismos até então, não caracterizados para o controle da expressão dos genes de virulência em *Enterococcus faecalis*, que podem desempenhar um papel importante *in vivo*.

5. CONCLUSÃO

A partir dos objetivos apresentados no presente estudo e após análise dos resultados obtidos, podem-se determinar algumas características de *Enterococcus faecalis* e o estabelecimento de biofilme microbiano em relação ao ambiente de crescimento:

Os genes de virulência *agg*, *ace* e operon *bopABCD* foram observados com elevada frequência entre os genes analisados no presente estudo em *Enterococcus faecalis* isolados de suabes cloacais de frangos de corte desafiados com *Eimeria* spp. e alimentados com dietas suplementadas ou não com anticoccidiano;

A atividade da enzima gelatinase teve maior atividade a 36°C de temperatura de crescimento dos isolados e a presença de 0,75% de glicose influenciou positivamente o fenótipo de forte formação de biofilme *in vitro* em *Enterococcus faecalis* isolados de suabes cloacais de frangos;

As diferenças nas frequências dos genes de virulência em *Enterococcus faecalis* isolados de diferentes origens mostram que os ganhos e perdas genéticas exercem um papel importante e crucial na adaptação a um novo *habitat* e contribuem para o surgimento de novas cepas adaptadas. No entanto, a árvore filogenética construída no segundo experimento mostra que, apesar das diferentes origens dos isolados e dos diversos perfis genotípicos, a

espécie *Enterococcus faecalis* exibe uma grande capacidade de adaptação em diferentes ambientes, mesmo quando ocorre pressão seletiva e alta frequência de troca de genes.

E por fim, os resultados do último experimento realizado, sugerem que os isolados alimentares revelaram uma não adaptação aos suplementos sangue e urina, visto que sua formação de biofilme foi menos intensa do que a encontrada nos isolados clínicos. De acordo com o comportamento demonstrado *in vitro* estes isolados parecem demonstrar uma boa adaptação a condições corporais fisiológicas ou patológicas em organismos animais.

Com base nos resultados obtidos, pesquisas posteriores poderão ser realizadas objetivando a análise transcricional ou pós transcricional dos genes envolvidos no processo de formação de biofilme microbiano por *Enterococcus faecalis*.

6. REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F.M.; AGERSO, Y.; GERNER-SMIDT, P.; MADSEN, M.; JENSEN, L.B. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. **Diagnostic Microbiology and Infections Disease**. v. 37, p. 127-137, 2000.

AARESTRUP, F. M. Monitoring of antimicrobial resistance among food animals: principles and limitations. **Journal of Veterinary Medicine**. v. 51, p. 380–388, 2004.

ABRIOUEL, H.; OMAR, N.B.; MOLINOS, A.C.; LÓPEZ, R.L.; GRANDE, M.A.; MARTÍNEZ-VIEDMA, P.; 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, n. 1-2, p. 38-49, 2008.

ALI, S.A.; HASAN, K.A.; BIN ASIF, H.; ABBASI, A. Environmental enterococci: Prevalence of virulence, antibiotic resistance and species distribution in poultry and its related environment in Karachi, Pakistan. **Letters in Applied Microbiology**. DOI: 10.1111/lam.12208, 2014.

ALTERI, C.J. & MOBLEY, H.L. Quantitative profile of the uropathogenic *Escherichia coli* outer membrane proteome during growth in human urine. **Infection Immunity**. v. 75, p. 2679–2688, 2007.

BALDASSARRI, L.; CECCHINI, R.; BERTUCCINI, L. *Enterococcus* spp. produces slime and survives in rat peritoneal macrophages. **Medicine Microbiology Immunity**. v. 190, 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**. 21, 651-656, 2010.

BENSALAH, F.; FLORES, M.J.; MOUATS, A. A rapid PCR based method to distinguish between *Enterococcus* species by using degenerate and species-

specific *sodA* gene primers. **African Journal of Biotechnology**. v. 5, n. 9, p. 697-702, 2006.

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.

BOURGOGNE, A.; THOMSON, L.C.; MURRAY, B.E. Bicarbonate enhances expression of the endocarditis and biofilm associated pilus locus, *ebpR-ebpABC*, in *Enterococcus faecalis*. **BMC Microbiology**. v. 10, n. 17, p. 1-13, 2010.

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.

CASSENEGO, A.P.V.; ELLWANGER, J.; D'AZEVEDO, P.A.; RIBEIRO, A.M.L.; FRAZZON, J.; FRAZZON, A.P.G. Virulência e formação de biofilme microbiano por *Enterococcus faecalis* isolados de *suabes* cloacais de frangos de corte infectados com *Eimeria* spp. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 33, n. 12, p. 1433-1440, 2013.

CASSENEGO, A.P.V.; D'AZEVEDO, P.A.; RIBEIRO, A.M.L.; FRAZZON, J.; VAN DER SAND, S.T.; FRAZZON, A.P.G. Species distribution and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from broilers infected experimentally with *Eimeria* spp. and fed with diets containing different supplements. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 42, p. 480-488, 2011.

CASTILLO-ROJAS, G.; MAZARI-HIRIÁRT, M.; LEÓN, S.P.; AMIEVA-FERNÁNDEZ, R.I.; AGIS-JUÁREZ, R.A.; HUEBNER, J.; LÓPEZ-VIDAL, Y. Comparison of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Strains Isolated from Water and Clinical Samples: Antimicrobial Susceptibility and Genetic Relationships. **Plos one**. v. 8, n. 4, doi:10.1371/journal.pone.0059491, 2013.

CAUWERTS, K.; DECOSTERE, A.; DE GRAEF, E.M.; HAESEBROUCK, F.; PASMANS, F. High prevalence of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from broilers carrying the *erm(B)* gene. **Avian Pathology**. v. 36, n. 5, 395-399, 2007.

CENTIKAYA, Y.; FALK, P.; MAYHALL, C. G. Vancomycin-Resistant Enterococci. **Clinical Microbial Review**. p. 686–707, 2000.

CHARPENTIER, E.; GERBAUD, G.; COURVALIN, P. Presence of *Listeria* tetracycline resistance genes *tet(S)*. In: *Enterococcus faecalis*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 38, p. 2330-2335, 1994.

CHOPRA, I. & ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Molecular Microbiology Biology Reviews**. v. 65, p. 232-260, 2001.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Applied Environmental Microbiology**. v. 66, p. 4555-4558, 2000.

CLEWELL, D.B.; FLANNAGAN, S.E.; JAWORSKI, D.D. Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn916-Tn1545 family of conjugative transposons. **Trends in Microbiology**. v. 3, p. 229-236, 1995.

CRETI, R.; KOCH, S.; FABRETTI, F.; BALDASSARRI, L.; HUEBNER, J. Enterococcal colonization of the gastro-intestinal tract: role of biofilm and environmental oligosaccharides. **BMC Microbiology**. v. 6, n. 60, doi:10.1186/1471-2180-6-60, 2006.

COBO MOLINOS, A.; ABRIOUEL, H.; OMAR, N.B.; LÓPEZ, R.L.; GALVEZ, A. Detection of *ebp* (endocarditis- and biofilm-associated pilus) genes in enterococcal isolates from clinical and non-clinical origin. **International Journal of Food Microbiology**. v. 126, p. 123-126, 2008.

COLLIER, C.T.; HOFACRE, C.L.; PAYNE, A.M.; ANDERSON, D.B.; KAISER, P.; MACKIE, R.I.; GASKINS, H.R. Coccidia-induced mucogenesis promotes the onset of necrotic enteritis by supporting *Clostridium perfringens* growth. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 122, n. 1-2, p. 104-115, 2008.

CORTÉS, C.; DE LA FUENTE, R.; CONTRERAS, A.; SÁNCHEZ, A. Occurrence and preliminary study of antimicrobial resistance of enterococci isolated from dairy goats in Spain. **International Journal of Food Microbiology**. v. 110, n. 1, p. 100-103, 2006.

COSENTINO, S.; PODDA, G.S.; CORDA, A.; FADDA, M.E.; DEPLANO, M.; PISANO, M.B. Molecular detection of virulence factors and antibiotic resistance pattern in clinical *Enterococcus faecalis* strains in Sardinia. **Journal of preventive medicine hygiene**. v. 51, p. 31-36, 2010.

COSTA, P.M.; BELO, A.; GONÇALVES, J.; BERNARDO, F. Field trial evaluating changes in prevalence and patterns of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. isolated from growing broilers medicated with enrofloxacin, apramycin and amoxicillin. **Veterinary Microbiology**. v. 139, p. 284-292, 2009.

DE LEENER, E.; MARTEL, A.; DECOSTERE, A.; HAESEBROUCK, F. Distribution of the *erm*(B) gene, tetracycline resistance genes, and Tn 1545-like transposons in macrolide- and lincosamide-resistant enterococci from pigs and humans. **Microbial Drug Resistance**. v. 10, n. 4, p. 341-345, 2004.

DEPARDIEU, F.; PERICHON, B.; COURVALIN, P. Detection of the *van* alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, p. 5857-5860, 2004.

DIARRA, M.S.; REMPEL, H.; CHAMPAGNE, J.; MASSON, L.; PRITCHARD, J.; TOPP, E. Distribution of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus* spp. and characterization of isolates from broiler chickens. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 76, n. 24, p. 8033-8043, 2010.

DONABEDIAN, S.M.; THAL, L.A.; HERSHBERGER, E. Molecular characterization of gentamicin-resistant *Enterococci* in the United States: evidence of spread from animals to humans through food. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 41, n. 3, p. 1109-1113, 2003.

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 & Infection Disease**. v. 60, n. 3, p. 247-253, 2008.

DUPRÈ, S.; ZANETTI, A.M.; SCHITO, G.; FADDA, C.; SECHI, L.A. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). **Journal of Medicine Microbiology**. v. 52, p. 491-498, 2003.

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

ELHADIDY, M. & ELSAYYAD, A. Uncommitted role of enterococcal surface protein, Esp, and origin of isolates on biofilm production by *Enterococcus faecalis* isolated from bovine mastitis. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**. v. 46, p. 80-84, 2013.

EXTREMINA, C.I.; COSTA, L.; AGUIAR, A.I.; PEIXE, L.; FONSECA, A.P. Optimization of processing conditions for the quantification of enterococci biofilms using microtitre-plates. **Journal of Microbiological Methods**. v. 84, p. 167-173, 2011.

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

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

FRANZ, C.M.A.P.; HOLZAPFEL, 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, p. 4385-4389, 2001.

FRANZ, C.M.A.P. & STILES, M.E. Enterococci in foods- a conundrum for food safety. **International Journal of Food Microbiology**. v. 88, n. 2-3, 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 and Biotechnology**. (On line). doi: 10.1007/s11274-009-0160-x, 2009.

FREDRICKS, D.N. & RELMAN, D.A. Cultivation of Whipple *bacillus*: the irony and the ecstasy. **The Lancet**. v. 350, p. 1262-1263, 1997.

GELSOMINO, R.; VANCANNEYT, M.; CONDON, S.; SWINGS, J.; COGAN, T.M. Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar-type cheese making factory. **International Journal of Food Microbiology**. v. 71, n. 2–3, p. 177-188, 2001.

GIRAFFA, G. Enterococci from food. **FEMS Microbiologi Reviews**. v. 744, p. 1–9, 2002.

GOMES, B.C.; ESTEVES, C.T.; PALAZZO, I.C.V.; DARINI, A.L.C. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. **Food Microbiology**. v. 25, n. 5, p. 668-675, 2008.

GUZMÁN, C.A.; PRUZZO, C.; PLATÈ, M.; GUARDATI, M.C.; CALEGARI, L. Serum dependent expression of *Enterococcus faecalis* adhesins involved in the colonization of heart cells. **Microbial Pathogens**. v. 11, p. 399-409, 1991.

HERRERA-LUNA, C.; KLEIN, D.; LAPAN, G.; REVILLA-FERNANDEZ, S.; HASCHEK, B.; SOMMERFIELD-STUR, I.; MOESTL, K.; BAUMGATNER, W. Characterization of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from diarrheic and healthy calves in Austria shedding various enteropathogenic agents. **Veterinary Medicine**. v. 1, p. 1-11, 2009.

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

HUFNAGEL, M.; KOCH, S.; CRETU, R.; BALDASSARRI, L.; HUEBNER, J.A. Putative sugar-binding transcriptional regulator in a novel gene locus in *Enterococcus faecalis* contributes to production of biofilm and prolonged bacteremia in mice. **Journal of Infectious Diseases**. v. 189, p. 420-430, 2004.

HUME, M.E.; HERNÁNDEZ, C.A.; BARBOSA, N.A.; DOWD, S.E.; SAKOMURA, N.K.; OVIEDO-RONDÓN, E.O. Molecular identification and characterization of ileal and cecal fungus communities in broilers given probiotics, specific essential oil blends and under mixed *Eimeria* infection. **Foodborne Pathogens Disease**. v. 9, p. 853-960, 2012.

HUMMEL, A.; HOLZAPFEL, W.H.; FRANZ, C.M. Characterization and transfer of antibiotic resistance genes from enterococci isolated from food. **System of Applied Microbiology**. v. 30, n. 1-7, 2007.

HUYS, G.; D'HAENE, K.; COLLARD, J.M.; SWINGS, J. Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from food. **Applied Environmental Microbiology**. v. 70, p. 1555-1562, 2004.

HUYCKE, M.M.; SAHM, D.F.; GILMORE, M.S. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. **Emergent Infection Disease**. v. 4, p. 239-249, 1998.

JACKSON, C.R.; FURTULA, V.; FARRELL, E.G.; BARRETT, J.B.; HIOTT, L.M.; CHAMBERS, P. A Comparison of BOX-PCR and Pulsed-Field Gel Electrophoresis to Determine Genetic Relatedness of *Enterococci* from Different Environments. **Microbial Ecology**. v. 64, p. 378-387, 2012.

JAHAN, M. & HOLLEY, R.A. Incidence of virulence factors in enterococci from raw and fermented meat and biofilm forming capacity at 25 °C and 37 °C. **International Journal of Food Microbiology**. v. 170, p. 65–69, 2014.

JEFFERSON, K.K., What drives bacteria to produce a biofilm? **FEMS Microbiology Letters**. v. 236, p. 163–173, 2004.

JENSEN, L.B.; FRIMODT-MOLLER, N.; AARESTRUP, F.M. Prevalence of the *erm* genes in gram positive bacterial spp. of animal and human origin. **FEMS Microbiology Letters**. v. 170, p. 151-158, 1999.

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

- KOBAYAKAWA, S.; JETT, B. D.; GILMORE, M. S. Biofilm formation by *Enterococcus faecalis* on intraocular lens material. **Current Eye Research**. v. 30, p. 741–745, 2005.
- KOCH, S.; HUFNAGEL, M.; THEILACKER, C.; HUEBNER, J. Enterococcal infections: host response, therapeutic and prophylactic possibilities. **Vaccine**. v. 22, n. 7, p. 822-830, 2004.
- KRISTICH, C.J.; LI, Y.H.; CVITKOVITCH, D.G.; DUNNY, G.M. Esp-independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. **Journal of Bacteriology**. v. 186, p. 154-163, 2004.
- LAYTON, B.A.; WALTERS, S.P.; LAM, L.H.; BOEHM, A.B. *Enterococcus* species distribution among human and animal hosts using multiplex PCR. **Journal of Applied Microbiology**. v. 109, p. 539–547, 2010.
- LEBRETON, Y.; PICHEREAU, V.; SAUVAGEOT, Y.; AUFRAY, Y.; RINCE A. Maltose utilization in *Enterococcus faecalis*. **Journal of Applied Microbiology**. v. 98, p. 806-813, 2009.
- LEWIS, K. Riddle of biofilm resistance. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 45, p. 999–1007, 2001.
- LLOYD, S.; ZERVOS, M.; MAHAYNI, R.; LUNDSTROM, T. Risk factors for enterococcal urinary tract infection and colonization in a rehabilitation facility. **American Journal of Infection Control**. v. 26, n. 1, p. 35-39, 1998.
- LOPES, M.S.; SIMÕES, A.P.; TENREIRO, R.; MARQUES, F.J.J.; 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.
- LOW, D.E.; WILLEY, B.M.; BETSCHEL, S.; KREISWIRTH, B. Enterococci: pathogens of the 90s. **European Journal of Surgery Supply**. v. 573, p. 19-24, 1994.
- 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 agricultural environment. **Environmental Microbiology**. v. 11, p. 1540-1547, 2009.
- MAIDEN, M. C. J. Multilocus sequence typing of bacteria. **Annual Review Microbiology**. v. 60, p. 561–588, 2006.
- MANNU, L.; PABA, A.; DAGA, E.; COMUNIANA, 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.; MARTINS, P.D.; DITMER, E.M.; D'AZEVEDO, P.A.; FRAZZON, J.; VAN DER SAND, S.T.; FRAZZON, A.P.G. Biofilm formation on polystyrene under different temperatures by antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from food. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 44, n. 2, p. 423-426, 2013.

MARRA, A.; DIB-HAJJ, F.; LAMB, L.; KACZMAREK, F. Enterococcal virulence determinants may be involved in resistance to clinical therapy. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 58, p. 59-65, 2007.

MARTÍN, M.; GUTIÉRREZ, J.; CRIADO, R.; HERRANZ, C.; CINTAS, L.M.; HERNÁNDEZ, P.E. Genes encoding bacteriocins and their expression and potential virulence factors of enterococci isolated from wood pigeons (*Columba palumbus*). **Journal of Food Protection**. v. 69, p. 520-531, 2006.

MARTYNOVA-VAN KLEIN, M.A.; OVIEDO-RONDÓN, E.O.; DOWD, S.E.; HUME, M.; NALIAN, A. Effect of *Eimeria* infection on cecal microbiome of broilers fed essential oils. **International Journal of Poultry Science**. v. 11, p. 747-755, 2012.

MCBRIDE, S.M.; FISCHETTI, V.A.; LEBLANC, D.J.; MOELLERING, R.C.; GILMORE, M.S. Genetic Diversity among *Enterococcus faecalis*. **Plos one**. v. 2, n. 7, e582. doi:10.1371/journal.pone.0000582, 2007.

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

MONTANARO, L.; POGGI, A.; VISAI, L.; RAVAIOLI, S.; CAMPOCCIA, D.; SPEZIALE, P.; ARCIOLA, C.R. Extracellular DNA in biofilms. **International Journal of Artificial Organs**. v. 34, n. 9, p. 824-831, 2011.

MORRISON, D.; WOODFORD, N.; COOKSON, B. Enterococci as emerging pathogens of humans. **Society of Applied Bacteriology Symposium Supplement**. v. 83, p. 89S-99S, 1997.

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

NALLAPAREDDY, S.R. & MURRAY, B.E. Role played by serum, a biological cue, in the adherence of *Enterococcus faecalis* to extracellular matrix proteins, collagen, fibrinogen, and fibronectin. **J. Infect. Dis.** 197:1728-1736, 2008.

NALLAPAREDDY, S.R.; SINGH, K.V.; SILLANPA, J.; ZHAO, M.; MURRAY,

B.E. Relative Contributions of Ebp Pili and the Collagen Adhesin Ace to Host Extracellular Matrix Protein Adherence and Experimental Urinary Tract Infection by *Enterococcus faecalis* OG1RF. **Infection Immunity**. v. 79, n. 7, p. 2901-2910, 2011.

OLSEN, H.R.; SCHØNHEYDER, H.C.; CHRISTENSEN, H.; BISGAARD, M. *Enterococcus faecalis* of human and poultry origin share virulence genes supporting the zoonotic potential of *E. faecalis*. **Zoon and Pub Health**. v. 59, P. 256–263, 2011.

PETERS, J.; MAC, K.; WICHMANN-SCHAUER, H. Species distribution and antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from food of animal origin in Germany. **International Journal of Food Microbiology**. p. 311-314, 2003.

PIEKARSKA, K.; JAGIELSKI, M. Prevalence of virulence associated genes of *Enterococcus faecalis* clinical strains isolated from patients and volunteers. **Med. Dosw. Mikrobiol**. v. 59, p. 207-216, 2007.

PILLAI, S.K.; SAKOULAS, G.; ELIOPOULOS, G.M.; MOELLERING, R.C.; MURRAY, B.E.; INOUYE, R.T. Effects of glucose on *fsr*-mediated biofilm formation in *Enterococcus faecalis*. **Journal of Infection Disease**. v. 190, p. 967-970, 2004.

PIRES-BOUÇAS, P.D.; IZUMI, E.; FURLANETO-MAIA, L.; STURION, L.; SUZART, S. Effects of environmental and nutritional factors on gelatinolytic activity by *Enterococcus faecalis* strains isolated from clinical sources. **African Journal of Microbiology Research**. v. 4, p. 969-976, 2010.

POETA, P.; COSTA, D.; RODRIGUES, J.; TORRES, C. Detection of genes encoding virulence factors and bacteriocins in fecal enterococci of poultry in Portugal. **Avian Disease**. v. 50, p. 64-68, 2006.

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.

RASOOLY, A. & HEROLD, K. E. Food microbial pathogen detection and analysis using DNA microarray technologies. **Foodborne Pathogens Diseases**. v. 5, p. 531-550, 2008.

REFFUVEILLE, F.; SERROR, P.; CHEVALIER, S.; BUDIN-VERNEUIL, A.; LADJOUZI, R.; BERNAY, B.; AUFFRAY, Y.; RINCÉ, A. The prolipoprotein diacylglycerol transferase (Lgt) of *Enterococcus faecalis* contributes to virulence. **Microbiology**. v. 158, n. 3, p. 816-825, 2011.

RIBOLDI, G.; MATTOS, E.P.; FRAZZON, A.P.G.; D'AZEVEDO, P.; FRAZZON, J. Phenotypic and genotypic heterogeneity of *Enterococcus* species isolated

from foods in Southern Brazil. **Journal of Basic Microbiology**. v. 48, p. 31-37, 2008.

ROBERTS, M.C.; MONCLA, B.J.; HILLIER, S.H. Characterization of unusual tetracycline-resistant gram-positive bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 35, n. 12, p. 1555-1557, 2003.

ROMEO, T. Bacterial biofilms. **Current topics in Microbiology and Immunology**. v. 322, DOI 10.1007/978-3-540-75418-3, 2008.

ROSSETTI, L. & GIRAFFA, G. Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-461 generated, RAPD-PCR fingerprint databases. **Journal of Microbiology Methods**. v. 63, n. 2, p. 135-44, 2007.

SEMEDO, T.; SANTOS, M. A.; LOPES, M. F. S.; MARQUES, J. J. F.; CRESPO, M. T. B.; TENREIRO, R. Virulence factors in food, clinical and reference enterococci: A common trait in the genus? **Systematic and Applied Microbiology**. v. 26, p. 13–22, 2003.

SEMEDO-LEMSADDEK, T.; NÓBREGA, C.S.; RIBEIRO, T.; PEDROSO, N.M.; SALES-LUÍS, T.; LEMSADDEK, A.; TENREIRO, R.; TAVARES, L.; VILELA, C.L.; OLIVEIRA, M. Virulence traits and antibiotic resistance among enterococci isolated from Eurasian otter (*Lutra lutra*). **Veterinary Microbiology**. v. 163, p. 378–382, 2013.

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

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

SILVA, J.; RODRÍGUEZ, Y.; ARAYA, J.; GAHONA, J.; VALENZUELA, N.; GUERRERO, K.; BÁEZ, J.; BAQUERO, F.; DEL CAMPO, R. Detección de genes de virulência em cepas de *Enterococcus faecalis* susceptíveis y resistentes a aminoglucósidos. **Revista Chilena de Infectología**. v. 30, n. 1, p. 17-22, 2013.

SINGH, K.V.; COQUE, T.M.; WEINSTOCK, G.M.; MURRAY, B.E. *In vivo* testing of an *Enterococcus faecalis* *efaA* mutant and use of *efaA* homologs for species identification. **FEMS Immunology Medicine Microbiology**. v. 21, p. 323-331, 1998.

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

STOBBERINGH, E.E. & VAN DEN BOGAARD, A.E. Contamination of animal feed by multiresistant enterococci. **The Lancet**. v. 354, n. 9173, p.163, 1999.

THAMMAVONGS, B.; CORROLER, D.; PANOFF, J.M.; AUFRAY, Y.; BOUTIBONNES, P. Physiological response of *Enterococcus faecalis* JH2-2 to cold shock: growth at low temperatures and freezing/thawing challenge. **Lett Appli Microbiol**. v. 23, p. 398-402, 1996.

THURLOW, L.R.; THOMAS, V.C.;NARAYANAN, S.; OLSON, S.; FLEMING, S.D.; HANCOCK, L.E. Gelatinase Contributes to the Pathogenesis of Endocarditis Caused by *Enterococcus faecalis*. **Infection and Immunity**. v. 78, n. 11, p. 4936–4943, 2010.

TREVORS, J.T. Viable but non-culturable (VBNC) bacteria: Gene expression in planktonic and biofilm cells. **Journal of Microbiological Methods**. v. 86, p. 266–273, 2011.

VANKERCKHOVEN, V.; VAN AUTGAERDEN, T.; VAEL, C.; LAMMENS, C.; CHAPELLE, S.; ROSSI, R.; JABES, D.; GOOSSENS, H. Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp* and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European Hospital isolates of *Enterococcus faecium*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, n. 10, p. 4473-4479, 2004.

VEBO, H.C.; SNIPEN, L.; NES, I.F.; BREDE, D.A. The transcriptome of the nosocomial pathogen *Enterococcus faecalis* V583 reveals adaptive responses to growth in blood. **Plos One**. v. 4, n. 11, e7660. doi:10.1371/journal.pone.0007660, 2009.

VERMELHO, A.B.; BASTOS, M.C.F.; SÁ, M.H.B. **Bacteriologia geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Ed. 1, 582 p., 2008.

WANI, S.A.; HUSSAIN, I.; RATHER, M.A.; KABLI, Z.A.; NAGAMANI, K.; NISHIKAWA, Y.; QURESHI, S.D.; KHAN, I. Putative virulence genes and biofilm production among typical entero aggregative *Escherichia coli* isolates from diarrhoeic children in Kashmir and Andhra Pradesh. **Indian Journal of Microbiology**. v. 52, p. 587-592, 2012.

WHITCHURCH, C.B.; TOLKER-NIELSEN, T.; RAGAS, P.C. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. **Science**. v. 295, n. 5559, p. 1487. doi:10.1126/science.295.5559.1487, 2002.

WILLEMS, R. J.; HOMAN, W.; TOP, J. Variant *esp* gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. **The Lancet**. v. 357, p. 853–855, 2001.

WILLIAMS, R.B. Intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens: rational, integrated disease management by maintenance of gut integrity. **Avian Pathology**. v. 34 p. 159-180, 2005.

YEONG, H.I.; LIM, S.K.; KU, H.O.; PARK, C.K.; JUNG, S.C.; PARK Y.H.; NAM, H.M. Occurrence of virulence determinants in fecal *Enterococcus faecalis* isolated from pigs and chickens in Korea. **Journal of Microbial Biotechnology**. v. 21, p. 1352-1355, 2011.

ZHANEL, G.G.; HOMENUIK, K.; NICHOL, K.; NOREDDIN, A.; VERCAIGNE, L.; EMBIL, J.; GIN, A.; KARLOWSKY, J.A.; HOBAN, D.J. The glycylicyclines: a comparative review with the tetracyclines. **Drugs**. v. 64, n. 1, p. 63-88, 2004.

7. ANEXO

7.1 Manuscritos

7.1.1 Manuscrito 1

Título: “Virulência e formação de biofilme microbiano por *Enterococcus faecalis* isolados de *swabs* cloacais de frangos de corte infectados com *Eimeria* spp.”.

Periódico: Pesquisa Veterinária Brasileira.

Data de publicação: 12/2013.

Assunto: Artigo 3330LD

Remetente: Mateus Matiuzzi <mmatiuzzi@hotmail.com>

Para: Rinaldo Aparecido Mota <rinaldo.mota@hotmail.com>,
jorgen.dobereiner@pvb.com.br <jorgen.dobereiner@pvb.com.br>,
ana.cassenego@ufrgs.br <ana.cassenego@ufrgs.br>

Data: 2013-10-26 07:47

Caros autores

Informamos que o artigo 3330LD está aceito para publicação, sendo que o mesmo será encaminhado para publicação.

Favor aguardar o restante da tramitação.

Certo de sua atenção.

Agradeço,

Mateus Matiuzzi da Costa

Editor Adjunto Animais de Produção

Pesquisa Veterinária Brasileira

Virulência e formação de biofilme microbiano por *Enterococcus faecalis* isolados de swabs cloacais de frangos de corte infectados com *Eimeria* spp.¹

Ana Paula V. Cassenego², Juliana Ellwanger², Pedro A. d'Azevedo³, Andreia M.L. Ribeiro⁴, Jeverson Frazzon⁵e Ana Paula G. Frazzon²

ABSTRACT.- Cassenego A.P.V., Ellwanger J., d'Azevedo P.A., Ribeiro A.M.L., Frazzon J. & Frazzon A.P.G. 2013. [**Virulence and biofilm formation by *Enterococcus faecalis* isolates from cloacal swabs of broilers infected with *Eimeria* spp.**] Virulência e formação de biofilme microbiano por *Enterococcus faecalis* isolados de swabs cloacais de frangos de corte infectados com *Eimeria* spp. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 33(12):1433-1440. Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite 500, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil. E-mail: ana.cassenego@ufrgs.br

The microbiota dynamics in the gastrointestinal tract (GT) of animals can be disrupted by pathogens, such as *Eimeria* spp. Enterococci are saprophytic bacteria that colonize the GT of mammals and birds. The influence on the intestinal microbiota is related to the adaptive capacity of bacteria to adhere to host cells and colonize the mucosal cells. The aim of this study was to analyze the frequency of virulence genes *ace*, *agg* and *bopABCD* operon in *Enterococcus faecalis* isolated from cloacal swabs of broilers challenged with *Eimeria* spp. and fed a standard diet supplemented or not with anticoccidial (monensin), and, also evaluated for the ability of these strains to form biofilms under *in vitro* conditions. A total of 70 *E. faecalis* were selected and the *agg* gene was more frequent in strains isolated from the broilers treated with anticoccidial (92.3%) when compared to the group that not received anticoccidial (70.5%). On the other hand, the *ace* and *bopABCD* operon genes showed no significant difference between the two groups of broilers ($P > 0.005$). The *E. faecalis* isolated from the broilers treated with anticoccidial showed a higher frequency of strong biofilm formation when growing in medium supplemented with glucose (92.3 - 88.5%) and urine (77%) when compared with enterococci isolated from broilers that not received anticoccidial. It was observed that *E. faecalis* isolated from broilers treated with anticoccidial showed a higher frequency of virulence factors genes and stronger biofilms formation, indicating better adaptation of the isolates in healthy intestinal environment.

INDEX TERMS: *Enterococcus faecalis*, biofilm, virulence factors, broilers, *Eimeria* spp., anticoccidial.

RESUMO.-A dinâmica da microbiota no trato gastrointestinal (TG) de animais pode ser afetada por patógenos, tais como *Eimeria* spp. Os enterococos são bactérias

saprófitas que o colonizam TG de mamíferos e aves. A influência sobre a microbiota intestinal está relacionada com a capacidade de adaptação das bactérias em se aderir às células hospedeiras e de colonizar as células das mucosas. O objetivo deste estudo foi analisar a frequência de genes de virulência *ace*, *agg* e operon do *bopABCD* em *Enterococcus faecalis* isolados de swabs cloacais de frangos de corte desafiados com *Eimeria* spp com. e alimentados com dietas padrões suplementadas ou não com anticoccidiano (monesina) e também avaliar a capacidade dessas cepas em formar biofilmes sob condições *in vitro*. Um total de 70 *E. faecalis* foram selecionadas e o gene *agg* foi mais freqüente em cepas isoladas de frangos de corte alimentados com anticoccidiano (92,3%) quando comparado ao grupo que não recebeu anticoccidiano (70,5%). Por outro lado, os genes *ace* e do operon *bopABCD* não demonstrou nenhuma diferença significativa entre os dois grupos de frangos ($P > 0,005$). Os *E. faecalis* isoladas de frangos de corte alimentados com anticoccidiano demonstraram uma maior frequência de fortes aderentes quando crescendo em meio suplementado com glicose (92,3-88,5%) e urina (77%), quando comparado com enterococos isolados de frangos que não receberam anticoccidiano. Observou-se que *E. faecalis* isolados frangos tratados com anticoccidiano mostraram uma maior frequência dos genes dos fatores de virulência e de perfil de fortes formadores de biofilme, o que indica uma melhor adaptação dos isolados em ambiente intestinal saudável.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Enterococcus faecalis*, biofilme, fatores de virulência, frangos de corte, *Eimeria* spp., anticoccidiano.

INTRODUÇÃO

Enterococos são bactérias saprófitas que colonizam o trato gastrointestinal de mamíferos e pássaros (Murray 1990, Martynova-Van Klein et al. 2012). A colonização de animais pelas diferentes espécies de enterococos está sujeita a variações que podem ser associadas a fatores como a localização geográfica, dieta, idade, espécie de animal e também variações sazonais. Na produção de animais como aves, bovinos e suínos, as espécies mais comumente isoladas são *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus cecorum* e *Enterococcus durans*. Em estudo realizado na região Sul do Brasil, foi observado que a espécie *E. faecalis* foi a mais frequente (40%) em amostras de cloacas de frangos de corte, seguida de *E. casseliflavus/E. gallinarum* (10,8%), *E. mundtii* (10,8%), *E. faecium* (10,8%), *E. columbae* (5,8%) e *E. gallinarum* (4,2%) (Casseneo et al. 2011).

A virulência de enterococos pode ser aumentada pela expressão de fatores de virulência como a proteína de superfície de adesão da matriz à molécula (Ace), produzida sob condições fisiológicas, mas que contribui para a patogênese da infecção (Shepard & Gilmore 2002), assim como a proteína de agregação (Agg) que facilita a agregação entre as bactérias e parece estar envolvida na virulência em *E. faecalis* (Duprè et al. 2003). O operon *bopABCD* contém genes responsáveis pela prolongação da bacteremia por cepas de *E. faecalis* produtoras de biofilme e seu envolvimento na utilização da maltose, sugere uma nova via catabólica no metabolismo de bactérias ácido lácticas semelhante ao locus MalPBMR em *Lactococcus lactis* (Hufnagel et al. 2004, LeBreton et al. 2005). O gene *bopA* codifica uma glicosil-transferase, o gene *bopB* por sua vez, codifica uma β -fosfoglicomutase, o gene *bopC* uma aldose-1-

epimerase e o *bopD* uma proteína reguladora que tem capacidade de restaurar parcialmente a formação do biofilme, sendo importante no transporte carboidrato aos tecidos e pode ser controlado positiva ou negativamente por *bopABC* (LeBreton et al. 2005, Bourgogne et al. 2006, Creti et al. 2006, Vebo et al. 2009).

A habilidade em formar biofilme é uma importante característica de virulência das bactérias (Donelli & Guaglianone 2004). O biofilme é um complexo multicelular caracterizado por colônias aderentes circundadas por uma matriz exopolissacarídica que protege as bactérias contra agentes antimicrobianos e fagócitos, permitindo sua sobrevivência em ambientes hostis (George et al. 2005, Chai et al. 2007). Deste modo, a detecção de cepas produtoras de biofilme é de grande importância para o estabelecimento de políticas de controle, uma vez que falhas no processo de higienização permitem que resíduos aderidos aos equipamentos e superfícies transformem-se em potencial fonte de contaminação na indústria de alimentos.

A microbiota intestinal tem efeito significativo na nutrição, saúde e desenvolvimento do sistema digestivo do hospedeiro (Barrow 1992). Esta interação é muito complexa e depende da composição e atividade de sua microbiota que pode exercer efeito positivo ou negativo na saúde e crescimento de aves, por exemplo, quando patógenos atacam a mucosa intestinal comprometendo a integridade, o funcionamento tecidual e seu sistema imune (Droleskey et al. 1994, Neish 2002). Dentre os parasitas que afetam o intestino das aves se destacam os protozoários e helmintos, sendo o protozoário do gênero *Eimeria* spp., agente etológico de coccidiose aviária, considerada a doença mais importante na indústria avícola (Smith & Beal 2008). Os sinais clínicos mais graves incluem: diarreia, diminuição do ganho de peso, baixa conversão alimentar, podendo haver hemorragia intestinal e mortalidade. Ocorre a destruição de vilosidades, diminuição do pH intestinal, diminuição da viscosidade intestinal e predisposição a infecções secundárias (Williams 2005). A gravidade da doença depende da espécie do parasita, podendo haver variação de patogenicidade (Santos et al. 2008) e também está sujeita a fatores do hospedeiro como linhagem e idade.

A importância em se elucidar a dinâmica da microbiota no trato gastrointestinal dos animais é bem reconhecida e é sabido que fatores como idade dos animais, dieta, tipo de criação e presença de patógenos, tais como, o coccídio *Eimeria* spp. podem influenciar a microbiota do intestino. Esta influência sobre a microbiota intestinal esta relacionada com a capacidade adaptativa das bactérias em se aderir às células e colonizar as mucosas.

O objetivo deste estudo foi analisar a frequência dos genes *agg*, *ace* e do operon *bopABCD* envolvidos com a virulência e formação de biofilme em *Enterococcus faecalis* isolados de swabs cloacais de frangos de corte desafiados com *Eimeria* spp. e alimentados com dietas suplementadas ou não com anticoccidiano e avaliação da capacidade dessas cepas formar biofilmes a 36°C e 42°C, crescendo em caldo Luria-Bertani suplementado com 10% de sangue, ou 10% de urina ou 0,75% de glicose.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados 70 *E. faecalis* isolados de um estudo anterior realizado pelo grupo, onde avaliou-se a diversidade de enterococos isolados de swabs cloacais de frangos machos Cobb 500 com 28 dias alimentados com uma dieta baseada em milho e farelo de soja, óleos vegetais, minerais e vitaminas e suplementados (n=44) ou não (n=26)

com 100 ppm de anticoccidiano (monensina). Aos 14 dias de idade, todas as aves receberam uma solução contendo 5×10^4 e 1×10^4 oocistos/animal de *Eimeria maxima* e *Eimeria acervulina*, respectivamente (Cassenege et al. 2011).

A confirmação da espécie *Enterococcus faecalis* de todos os isolados selecionados foi realizada pela técnica de reação em cadeia (PCR) utilizando os oligonucleotídeos iniciadores espécie-específico *ddl_{E-faecalis}* (Quadro 1). A reação da PCR foi realizada no termociclador (Amplitherm- Thermal Cyclers-) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C por 1 minuto; temperatura de anelamento 52 °C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, com extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos da amplificação da PCR foram visualizados em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio e observado através de luz ultravioleta (UV).

Ensaio *in vitro* para a detecção de atividade da enzima gelatinase em ágar suplementado com gelatina (4%) foram realizados a 36°C (temperatura corporal de mamíferos) e 42°C (temperatura corporal de aves), seguindo o protocolo descrito por Eaton & Gasson (2001).

O DNA total de todos os isolados foi extraído pelo método de Fredricks & Relman (1997) com modificações. Uma alíquota de 5 µL do inóculo crescido por 16 horas em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) à 37°C foi centrifugada por 5 minutos a 300 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado três vezes com 1 mL de tampão TE 1x e suspenso em 100 µL do mesmo tampão. Ao *pellet* foi adicionado 100 µL de TE⁵N, 10 % do volume de SDS e 5 µL de Proteinase K (20 mg/ml). A seguir, incubou-se em banho-maria por 1 hora a 55°C. Adicionou-se 15 µl NaCl 5M e 200 µl de fenol em fração 1:1, seguido de agitação em vortex. As amostras foram colocadas em rotor por 30 minutos e após, centrifugadas por 30 minutos a 14000 rpm. A fase aquosa foi coletada e transferida para outro microtubo, adicionando 1 mL de etanol absoluto. As amostras foram incubadas por 1 hora a -20°C e centrifugadas por 15 minutos a 13.000 rpm e, logo após, desprezou-se o sobrenadante e o *pellet* foi suspenso em 100 µL de TE e 5 µL de RNase. As amostras foram incubadas por 30 minutos a 37°C e 6 µL do produto foram aplicados em gel de agarose 1 % para analisar a concentração e a qualidade do material.

A detecção da presença dos genes *agg*, *ace* e do operon *bopABCD* envolvidos com a virulência e formação de biofilme, foi realizada por PCR. A reação foi realizada em termociclador (Amplitherm- Thermal Cyclers). As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores e as temperaturas de anelamento estão demonstradas no Quadro 1. Para a reação de PCR foram utilizados: 1µL de DNA bacteriano, 10 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 200 µM de cada dNTP, 1U de *Taq* DNA Polimerase, 1,5 mM de MgCl₂, tampão de reação e água MilliQ. Os fragmentos foram amplificados em termociclador sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C por 1 minuto; temperatura de anelamento (Quadro 1) por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, com extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos da amplificação da PCR foram visualizados em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio e observado através de luz ultravioleta (UV).

Os ensaios de biofilme foram realizados em todos os isolados de acordo com protocolo modificado de Stepanovic et al. (2000). As amostras foram incubadas por 16h a 37°C em ágar BHI. As culturas foram diluídas em 5 mL de solução salina (0,9%) até atingir a concentração de $1,5 \times 10^8$ células bacterianas/mL de solução. Após, foram depositadas em microplacas de poliestireno com 96 poços utilizando caldo Luria Bertani

(LB) acrescido de 10% de sangue (LBS) ou LB acrescido de 10% de urina (LBU) ou LB acrescido de 0,75% de glicose (LBG). Os isolados foram crescidos a 37°C por 16 horas com todos os suplementos citados e os ensaios realizados com meio acrescido de glicose (0,75%) ou sangue (10%) também foram incubados a 42°C. Após, as células planctônicas foram coletadas por aspiração e os poços lavados três vezes com 200 µL de solução salina. Para fixação das células aderidas, foram adicionados 150 µL de álcool metílico em cada poço por 15 minutos. Após, as placas foram secadas em temperatura ambiente por 16 horas. Para determinar a quantificação do biofilme formado, 150 µL de uma solução de cristal violeta 0,5% foram adicionados em cada poço e as placas incubadas por 15 minutos e lavadas em água corrente. Para leitura, 150 µL de álcool 95% foram adicionados a cada poço. A densidade ótica (DO) dos biofilmes bacterianos foi determinada em leitor espectrofotométrico de microplacas utilizando filtro de comprimento de onda de 595 nm. Cada teste foi realizado em oitoplicatas e a formação do biofilme determinada a partir da densidade ótica obtida seguindo os critérios de Stepanovic et al. (2000). A cepa *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 35984) foi utilizada como controle positivo (forte aderente) em todos os ensaios.

A DO média do controle negativo foi utilizada como ponto de corte. Os isolados foram classificados como: $DO \leq DOc$ Não-aderente; $DOc < DO \leq 2x DOc$ Fraco aderente; $2x DOc < DO \leq 4x DOc$ Moderado aderente; $4x DOc < DO$ Forte aderente.

Os resultados obtidos em *score* seguiram a normalidade e foram submetidos à análise da variância (ANOVA) e ao teste de Kruskal-Wallis a 1% (sendo $P \leq 0,05$), para comparar a presença dos fatores de virulência e a intensidade de formação de biofilme entre os isolados, os suplementos e as temperaturas utilizadas. Para tanto, utilizou-se o programa estatístico *Graphpad Prism* versão 5.0.

RESULTADOS

Todos os isolados selecionados confirmaram pertencer à espécie *E. faecalis* através de pesquisa do gene *ddl_{E-faecalis}*. A maior atividade da enzima gelatinase em temperatura de 36°C em detrimento a 42°C. No que se referem à dieta empregada aos animais, todos isolados (100%) apresentaram atividade gelatinolítica quando submetidos a 36°C de crescimento independente da presença do ionóforo. Por outro lado, sob crescimento a 42°C, temperatura corpórea das aves, o nível de atividade da enzima foi variável entre 81,8% na ausência de anticoccidiano e 88,5% na presença destes, não apresentando grande diferença no comportamento fenotípico referente à dieta empregada.

A distribuição dos genes *ace*, *agge* do operon *bopABCD* avaliada de acordo com a presença ou não de anticoccidiano na dieta dos frangos está demonstrada no Quadro 2. O gene *agg* apresentou maior frequência nos *E. faecalis* isolados dos frangos que receberam a dieta suplementada com anticoccidiano e não apresentou quadro clínico diarreico (92,3%), quando comparado ao grupo que não recebeu cocidiostáticos (70,5%). O gene *ace* não apresentou variação significativa na sua frequência entre os dois grupos de frangos (90,9-96,1%). Os genes do operon *bopABCD* foram identificados em ambos os grupos dos animais e sua frequência não foi significativamente afetada pela presença ou ausência de anticoccidiano na dieta dos frangos ($P > 0,05$). Todos isolados apresentaram mais de um gene pesquisados.

A capacidade de formar biofilme foi observada em todos os isolados quando crescido no meio de cultura LB suplementado com 10% de sangue, 10% de urina ou 0,75% de glicose nas temperaturas de 36°C e 42°C. Os perfis fenotípicos de formação

de biofilme dos isolados de *E. faecalis* de acordo com a dieta empregada, substratos dos meios de cultura e temperaturas de crescimento utilizadas estão demonstrados no Quadro 3. Isolados de *E. faecalis* provenientes dos frangos de corte submetidos à dieta com anticoccidiano apresentaram maiores índices de forte aderente quando crescido na presença de 0.75% de glicose (92,3-88,5%) e 10% de urina (77%) quando comparados com enterococos isolados de frangos que não receberam anticoccidiano na dieta. Por outro lado, quando os mesmos isolados foram crescidos na presença de 10% de frango, observou-se uma elevada frequência de isolados moderados formadores de biofilme em ambas as temperaturas e dietas (52-69%).

DISCUSSÃO

Neste estudo foi possível constatar-se um mecanismo de resposta adaptativa quanto à atividade da enzima gelatinase dos *E. faecalis* isolados de swabs cloacais de frangos de corte em função da temperatura de crescimento empregada. No entanto, apesar da temperatura corpórea das aves, nem todos os isolados de frangos mostraram tal capacidade de adaptação, visto que o índice de atividade da enzima diminuiu com o aumento da temperatura. Este resultado já foi detectado por Marinho (2010) que obteve resultados similares no fenótipo de gelatinase em diferentes temperaturas de crescimento (28, 37 e 45°C) em *E. faecalis* isolados de alimentos e amostras clínicas. Yeong et al. (2011), também observaram diferenças na atividade da enzima gelatinase em *E. faecalis* isolados de frangos de diferentes sistemas de criação, onde 90,9% dos enterococos isolados de frangos de corte foram positivos para atividade da enzima gelatinase, quando comparados com 88% dos isolados provenientes de aves criadas em sistema extensivo. Por outro lado, os resultados observados para a atividade da enzima gelatinase são diferentes dos apresentados por Poeta et al. (2006) que pesquisaram a atividade de gelatinase em enterococos isolados de fezes de frangos de corte e observaram que apenas 47% destes apresentavam fenótipo positivo.

A atividade da enzima gelatinase é influenciada por diversos parâmetros ambientais, tais como meio de cultura, variação de pH, diferença de atividade *in vitro/in vivo*, formação de cátions divalentes e diferentes fontes de carbono, anteriormente relatadas no que se refere à influência na atividade gelatinolítica das células bacterianas. A produção de gelatinase é sensível ao calor, principalmente quando em temperaturas maiores que 50°C, sendo associada também com o tempo de crescimento. Sua atividade varia amplamente quando células bacterianas são suplementadas com diferentes carboidratos como fonte de carbono e aumentam na presença de arabinose, xilose, glicose, maltose e manose, enquanto diminuem com outros diversos açúcares (Pires-Bouças et al. 2010). Macovei et al. (2009) relataram a plasticidade genômica e a importância da pressão seletiva na manutenção da virulência bacteriana, onde alguns isolados, após longo período de descanso metabólico em temperaturas baixas (4-8°C) e em subculturas, perderam sua capacidade de expressar a gelatinase.

A frequência do gene *agg* observado no presente estudo está de acordo com outros estudos com *E. faecalis* de isolados de amostras clínicas e alimentares (Eaton & Gasson 2001, Franz et al. 2001, Mannu et al. 2003, Martín et al. 2006, Barbosa 2010). O gene *agg* apresentou maior frequência nos *E. faecalis* isolados dos frangos, que receberam dieta suplementada de anticoccidiano (92,3%) quando comparado ao grupo que não recebeu anticoccidiano (70,5%). A diferença entre os índices apresentados pode estar relacionada ao quadro diarreico causado pela *Eimeria* spp., que causa uma

modificação estrutural das vilosidades intestinais, levando a um encurtamento destas, resultando em diminuição da capacidade de absorção e predispõe os frangos a disbacteriose (Williams 2005). A função da proteína Agg tem sido relatada na bibliografia, como sendo responsável pelo aumento da aderência de *Enterococcus* ao epitélio intestinal e renal. Esta destruição das células epiteliais do intestino pode ter sido uma das causas da redução na frequência do gene *agg* nos *E. faecalis* isolados do grupo de frangos que não recebeu anticoccidiano. Em *E. faecalis* o gene *agg* está localizado em um plasmídeo responsivo a feromônios, causando agregação entre células doadoras e receptoras, facilitando a transferência de plasmídeos que podem carrear genes de virulência e resistência antimicrobiana (Barbosa 2010). Portanto, um epitélio intestinal com possíveis danos teciduais e maior absorção de líquidos pelo interstício e luz intestinal, torna-se um ambiente desfavorável para agregação celular e posterior processo de estabelecimento de biofilme microbiano neste ambiente de crescimento. Apesar da diferença no percentual dos dois grupos tratados, os frangos que não receberam anticoccidiano na dieta também apresentaram alto percentual de genes dos fatores de virulência. Esses resultados concordam com os apresentados por Hume et al. (2012) que demonstram efeitos negativos da infecção por *Eimeria*, modificando a população microbiana do ceco. Tal fato foi anteriormente relatado, demonstrando que esse gênero de coccídios pode desenvolver um papel importante na patologia de coccidioses cecais, tendo forte efeito na taxa da comunidade bacteriana dominante (Bradley & Radhakishnan 1973).

Por outro lado, o único trabalho que relata a influência do quadro clínico diarréico sobre os fatores de virulência, foi realizado em *Escherichia coli* isoladas de bezerros com e sem diarreia, observou que os fatores de virulência eram mais prevalentes em *E. coli* isoladas dos bezerros que apresentavam quadro clínico de diarreia, causado por vários agentes enteropatogênicos, entre eles, *Eimeria* spp. (Herrera-Luna et al. 2009). Em trabalho realizado por Martynova-Van Kley et al. (2012), uma análise de pirosequenciamento da microbiota bacteriana de frangos infectados com *Eimeria* spp. e tratados com óleos essenciais sugere que os animais tratados apresentaram uma modulação positiva na microbiota a qual pode causar impactos favoráveis ao hospedeiro.

O gene *ace* que codifica uma proteína com características de adesina bacteriana e ligante a colágeno do tipo I, não apresentou variação significativa quanto à diferença nas frequências entre os dois grandes grupos de frangos ($P > 0,05$). Este gene tem sido apontado como um importante fator de virulência, onde sua deleção resulta em significativa atenuação de *E. faecalis* (Singh et al. 1998, Piekarska & Jagielski 2007). Tal característica justifica a elevada frequência do gene em ambos os grupos de frangos. A frequência do gene *ace* em ambos os grupos está de acordo com outros estudos que avaliaram a presença deste gene em amostras de swabs cloacais de frangos. Diarra et al. (2010) detectaram o gene *ace* em todos os *E. faecalis* isolados de frangos pesquisados. Olsen et al. (2011) pesquisaram o gene *ace* em isolados clínicos e de frangos e detectaram a presença do gene em todas as amostras pesquisadas.

Os genes do operon *bopABCD* foram identificados em ambos os grupos de frangos e sua frequência não foi significativamente afetada pela presença ou ausência de anticoccidiano na ração. O operon *bop* tem sido descrito no envolvimento do metabolismo da maltose e formação de biofilme. Os genes *bopA*, *bopC* e *bopD* foram detectados com elevada frequência em ambos os grupos de frangos. O gene *bopB* também não apresentou diferenças entre os frangos que receberam ou não

anticoccidiano na ração, entretanto apresentou uma frequência menor quando comparado com *bopA*, *bopC* e *bopD*. Até o momento, não existem registros nem dados de outros estudos envolvendo a incidência dos genes do operon *bopABCD* em cepas de *E. faecalis* ou em outras espécies do gênero *Enterococcus*. Este estudo é o primeiro a estimar a incidência de fatores de virulência de *E. faecalis* isolados de frangos que receberam uma solução contendo oocistos de *Eimeria maxima* e *Eimeria acervulina* e dieta padrão contendo ou não anticoccidiano (monensina). Apesar de evidenciado o importante papel desses genes na formação e persistência do biofilme microbiano, mais pesquisas para melhor elucidar os demais fatores envolvidos na formação de biofilmes são requeridas.

O maior índice de *E. faecalis* apresentando fenótipo de forte aderente, foi observado nos isolados provenientes dos frangos que receberam que receberam uma solução contendo oocistos de *Eimeria maxima* e *Eimeria acervulina* e a dieta padrão contendo anticoccidiano. A presença de anticoccidiano na dieta mantém a integridade intestinal, melhora a digestão e a absorção de nutrientes, disponibilizando o máximo de energia necessária para o crescimento e multiplicação celular bacteriana. Quando o animal está infectado por *Eimeria* spp. e não é realizado o tratamento adequado, sua integridade intestinal fica comprometida e os nutrientes normalmente usados no desenvolvimento do animal e também dos micro-organismos presentes não são absorvidos de maneira efetiva. Em ambos os casos observam maior índice de forte aderente em 36°C de temperatura de crescimento *in vitro*, sendo esta a temperatura ideal do crescimento celular de *E. faecalis in vivo*. Porém, altos índices também foram observados na temperatura de 42°C, revelando adaptação dos isolados aos diferentes ambientes e temperaturas não ideais, onde ocorre aumento do seu potencial patogênico através da expressão de genes de virulência.

Em relação aos suplementos adicionados ao meio de cultura, a presença de 0,75% de glicose elevou os índices de isolados classificados como fortes aderentes em ambos os grupos de frangos e temperaturas de crescimento testadas. Entretanto, o grupo de animais que recebeu anticoccidiano na dieta, apresentou maiores índices de isolados fortes aderentes. A alta disponibilidade de nutrientes com fonte de carbono, como a glicose, permitiu maior crescimento e multiplicação das cepas e, conseqüente estabelecimento do biofilme microbiano. Marinho (2010) verificou que a adição 0,75% de glicose ao meio de cultura Caldo Infusão, Cérebro e Coração também influenciou a capacidade de formação de biofilme de *E. faecalis* isolados de alimentos. Pillai et al. (2004) demonstraram que a formação de biofilme em placas de poliestireno foi maior em meio suplementado com 1% de glicose, concordando com nosso estudo, assim como outros estudos que mostram a influência da glicose na formação de biofilme através de um regulador transcricional dependente de glicose (*fsr*) mediando o controle de catabólitos através da formação de proteases (Baldassarri et al. 2001, Kristich et al. 2004).

A presença de 10% de urina no meio de cultura estimulou a capacidade dos isolados em formarem biofilmes mais densos, onde 77% dos isolados que receberam anticoccidiano e 63% dos que não receberam, foram classificados como fortes aderentes. Uma explicação para este fenótipo seria primeira, que a urina além de conter ureia em grande quantidade, também apresenta fosfatos, sulfato, amônia, magnésio, cálcio, ácido úrico, creatina, sódio, potássio e outros elementos em menor quantidade. Tal composição estimula a ativação de diferentes vias metabólicas bacterianas que as torna capazes de degradar tais substâncias e captar nutrientes necessários ao

crescimento e multiplicação celular e ativação de mecanismos de expressão gênica necessários para o aumento de sua patogenicidade, como a formação da estrutura do biofilme. O gene *agg*, que codifica a proteína Agg, encontrado no genoma destas bactérias também exerce um papel importante *in vivo*, pois atua na aderência e processo inicial da infecção enterocócica em células renais e do restante do trato urinário (Seno et al. 2005). Estudos realizados com outras enterobactérias patogênicas relatam respostas de sistemas envolvidos na aquisição de ferro e genes envolvidos no metabolismo de açúcares e aminoácidos responsáveis por uma maior adaptação das cepas ao sistema urinário ou à presença de urina (Alteri & Mobley 2007).

O crescimento de *E. faecalis* na presença de soro sanguíneo induz a expressão de ligantes de carboidratos responsáveis pela adesão celular (Guzmán et al. 1991). O sangue contém nutrientes como as proteínas albumina e hemoglobina, ferro proveniente das células vermelhas e micronutrientes como aminoácidos, pequenos peptídeos, glicose, lipídios, ácidos graxos, fosfolipídios e triglicerídeos, além da fração celular branca. Células sanguíneas mortas podem compor a matéria orgânica necessária para a formação da matriz do biofilme e seus componentes intracelulares servirem como nutrientes para as células em biofilme, assim como células plantônicas potencialmente capazes de desencadear um novo processo de formação do biofilme microbiano. Vebo et al. (2009) analisaram isolados de *E. faecalis* crescidos em sangue *in vitro* e concluíram que a regulação dos genes e suas vias sob essas condições revelaram a capacidade de adaptação fisiológica e metabólica, principalmente no metabolismo dos carboidratos, o que pôde ser observado no grande número de isolados que demonstraram formação fenotípica menos densa, classificados como formadores moderados na presença de sangue, uma provável adaptação fisiológica ao meio ambiente em questão.

Comparando os resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que o substrato mais favorável ao crescimento e estimulou a aderência dos isolados de *Enterococcus faecalis* nas microplacas de poliestireno foi à presença de 0,75% de glicose no meio de cultura LB, independente das temperaturas de crescimento. Entretanto, os altos níveis obtidos em 42°C de temperatura de crescimento sugerem uma grande capacidade de adaptação dos isolados a condições e hospedeiros diversos (frangos de corte). Os resultados obtidos com suplementação de sangue e urina também apontam o grande potencial patogênico das cepas, visto seu crescimento e capacidade de formação de biofilme na presença de fluidos humanos ou animais (Wani et al. 2012).

Ressaltando a importância deste estudo, *E. faecalis* isolados de frangos de corte que receberam oocistos de *Eimeria maxima* e *Eimeria acervulina* e ração suplementada ou não com anticoccidiano apresentaram *capacidade de se adaptar a diferentes nichos biológicos*, como por exemplo, sangue e urina. Associado a esta plasticidade dos microrganismos, a capacidade dos isolados de formar biofilme e a presença de *fatores de virulência*, sugerem que os *E. faecalis* isolados de frangos tratados com anticoccidiano estão mais bem adaptados ao ambiente intestinal dos animais. No futuro, estudos de expressão gênica poderão esclarecer parte desta complexa fisiologia da formação de biofilme em isolados da espécie *Enterococcus faecalis*.

Agradecimentos.- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro disponibilizado.

REFERÊNCIAS

- Alteri C.J. & Mobley H.L. 2007. Quantitative profile of the uropathogenic *Escherichia coli* outer membrane proteome during growth in human urine. *Infect. Immun.* 75:2679–2688.
- Barbosa J., Gibbs P.A. & Teixeira P. 2010. Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in the North of Portugal. *Food Control.* 1:651-656.
- Barrow P.A. 1992. Probiotics for chickens, p.255-257. In: Fuller R. (Ed.), *Probiotics: The scientific Basis.* Vol. 1 Chapman and Hall, London.398p.
- Baldassarri L., Cecchini, R. & Bertuccini L. 2001. *Enterococcus* spp. produces slime and survives in rat peritoneal macrophages. *Med. Microbiol. Immun.* 190:113–20.
- Bradley R.E. & Radhakrishnan C.V. 1973. Coccidiosis in chickens: obligate relationship between *Eimeria tenella* and certain species of cecal microflora in the pathogenesis of the disease. *Avian Dis.* 17:325-349.
- Bourgogne A., Hilsenbeck S.G., Dunny G.M. & Murray B.E. 2006. Comparison of OG1RF and an isogenic *fsrB* deletion mutant by transcriptional analysis: the Fsr system of *Enterococcus faecalis* is more than the activator of gelatinase and serine protease. *J. Bacteriol.* 188:2875-2884.
- Cassenege A.P.V., D'azevedo P.A., Ribeiro A.M.L., Frazzon J., Van Der Sand S.T. *Mol Microbiol.* 2008 January ; 67(2): 254–263. Frazzon A.P.G. 2011. Species distribution and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from broilers infected experimentally with *Eimeria* spp. and fed with diets containing different supplements. *Braz. J. Microbiol.* 42:480-488.
- Chai Y., Chu F., Kolter R. & Losick R. 2007. Bistability and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 67: 254–263.
- Creti R., Koch S., Fabretti F., Baldassarri L. & Huebner J. 2006. Enterococcal colonization of the gastro-intestinal tract: role of biofilm and environmental oligosaccharides. *BMC Microbiol.* 6:60.
- Depardieu F., Perichon B. & Courvalin P. 2004. Detection of the *van* alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42: 5857-5860.
- Diarra M.S., Rempel H., Champagne J., Masson L., Pritchard J. & Tropp E. 2010. Distribution of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus* spp. and characterization of isolates from broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:8033-8043.
- Donelli G. & Guaglianone E. 2004. Emerging role of *Enterococcus* spp. in catheter related infections: biofilm formation and novel mechanisms of antibiotic resistance. *J. Vasc. Access.* 5:3-9.
- Droleskey R.E., Oyofu B.A., Hargis B.M., Corrier D.E. & DeLoach, J.R. 1994. Effect of mannose on *Salmonella typhimurium*-mediated loss of mucosal epithelial integrity in cultured chick intestinal segments. *Avian Dis.* 38:275-281.
- Duprè S., Zanetti A.M., Schito G., Fadda & Sechi L.A. 2003. Incidence of virulence

- determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). *J. Med. Microbiol.* **52**:491–498.
- Eaton T.J. & Gasson M.J. 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:1628-1635.
- Franz C.M.A.P., Muscholl-Silberhorn A.B., Yousif N.M.K., Vancanneyt M., Swings J. & Holzapfel W.H. 2001. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4385-4389.
- Fredricks D.N. & Relman D.A. 1997. Cultivation of Whipple *bacillus*: the irony and the ecstasy. *The Lancet.* **350**:1262-1263.
- George S., Kishen A. & Song K.P. 2005. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. *J. Endod.* **31**:867-72.
- Guzmán C.A., Pruzzo C., Platè M., Guardati M.C. & Calegari L. 1991. Serum dependent expression of *Enterococcus faecalis* adhesins involved in the colonization of heart cells. *Microb Pathog.* **11**:399-409.
- Herrera-Luna C., Klein D., Lapan G., Revilla-Fernandez S., Haschek B., Sommerfield-Stur I., Moestl K. & Baumgatner W. 2009. Characterization of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from diarrheic and healthy calves in Austria shedding various enteropathogenic agents. *Vet Med.* **1**:1-11.
- Hufnagel M., Koch S., Creti R., Baldassarri L. & Huebner J.A. 2004. Putative sugar-binding transcriptional regulator in a novel gene locus in *Enterococcus faecalis* contributes to production of biofilm and prolonged bacteremia in mice. *J. Infect. Dis.* **189**:420-430.
- Hume M.E., Hernández C.A., Barbosa N. A., Dowd S.E., Sakomura N.K. & Oviedo-Rondón E.O. 2012. Molecular identification and characterization of ileal and cecal fungus communities in broilers given probiotics, specific essential oil blends and under mixed *Eimeria* infection. *Foodborne Pathog. Dis.* **9**:853-960.
- Kristich C.J., Li Y.H., Cvitkovitch D.G. & Dunny G.M. 2004. Esp-independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **186**:154-63.
- Lebreton Y., Pichereau V., Sauvageot Y., Auffray Y. & Rince A. 2005. Maltose utilization in *Enterococcus faecalis*. *J. Appl. Microbiol.* **98**:806-813.
- Macovei L., Ghosh A., Thomas V. C., Hancock L. E., Mahmood S. & Zurek L. 2009. *Enterococcus faecalis* with the gelatinase phenotype regulated by the *fsr* operon and with biofilm-forming capacity are common in the agricultural environment. *Environ. Microbiol.* **11**:1540-1547.
- Mannu L., Paba A., Daga E., Comuniana R., Zanetti S., Duprè I. & Sechi L.A. 2003. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *Int. J. Food Microbiol.* **88**:291-304.
- Marinho A.R. 2010. Avaliação fenotípica e genotípica de fatores relacionados com a formação de

- biofilme por *Enterococcus* isolados de alimentos. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 88p.
- Martín M., Gutiérrez J., Criado R., Herranz C., Cintas L. M. & Hernández P.E. 2006. Genes encoding bacteriocins and their expression and potential virulence factors of enterococci isolated from wood pigeons (*Columba palumbus*). *J. Food Protect.* 69:520-531.
- Martynova-Van Klein M.A., Oviedo-Rondón E.O., Dowd S.E., Hume M. & Nalian A. 2012. Effect of *Eimeria* infection on cecal microbiome of broilers fed essential oils. *Int. J. Poultry Sci.* 11:747-755.
- Murray B.E. 1990. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 3:46-65.
- Neish A.S. 2002. The gut microflora and intestinal epithelial cells: A continuing dialogue. *Microbes Infect.* 4:309-317.
- Olsen H.R., Schønheyder H.C., Christensen H. & Bisgaard M. 2011. *Enterococcus faecalis* of human and poultry origin share virulence genes supporting the zoonotic potential of *E. faecalis*. *Zoon and Pub Health.* 59: 256–263.
- Piekarska K. & Jagielski M. 2007. Prevalence of virulence associated genes of *Enterococcus faecalis* clinical strains isolated from patients and volunteers. *Med. Dosw. Mikrobiol.* 59:207–216.
- Pillai S.K., Sakoulas G., Eliopoulos G.M., Moellering R.C., Murray B.E. & Inouye R.T. 2004. Effects of glucose on *fsr*-mediated biofilm formation in *Enterococcus faecalis*. *J. Infect. Dis.* 190:967-970.
- Pires-Bouças P.D., Izumi E., Furlaneto-Maia L., Sturion L. & Suzart S. 2010. Effects of environmental and nutritional factors on gelatinolytic activity by *Enterococcus faecalis* strains isolated from clinical sources. *Afric. J. Microbiol. Res.* 4:969-976.
- Poeta P., Costa D., Rodrigues J. & Torres C. 2006. Detection of genes encoding virulence factors and bacteriocins in fecal enterococci of poultry in Portugal. *Avian Dis.* 50:64-68.
- Santos G.J.R., Conceição F.R. & Gil-Turnes C. 2008. Enterite necrótica aviária. *Cienc. Rural* 38: 2076-2082.
- Seno Y., Kariyama R., Mitsuhashi R., Monden K. & Kumon H. 2005. Clinical implications of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in the urinary tract. *Acta Med.* 59:79-87.
- Shepard B.D. & Gilmore M.S. 2002. Differential expression of virulence-related genes in *Enterococcus faecalis* in response to biological cues in serum and urine. *Infect. Immun.* 70:4344-4352.
- Singh K. V., Coque T.M., Weinstock G.M. & Murray B.E. 1998. In vivo testing of an *Enterococcus faecalis* efaA mutant and use of efaA homologs for species identification. *FEMS Immunol. Med. Mic.* 21:323-331.
- Smith A.L. & Beal R. 2008. The avian enteric immune system in health and disease, p. 243–271. In: Davison F., Kaspers B. & Schat K.A. (Ed.), *Avian Immunology*. Vol 1 Academic Press, London. 496p.
- Stepanovic S., Vukovic D., Dakic I., Savic B. & Svabic-Vlahovic M. 2000. A modifier

microtiter-

platetest for quantification of staphylococcal biofilm formation. J. Microbial Meth.40:175-179.

Vebo H.C., Snipen L., Nes I.F. & Brede D.A. 2009. The transcriptome of the nosocomial pathogen *Enterococcus faecalis* V583 reveals adaptive responses to growth in blood. Plos One. 4(11):e7660. doi:10.1371/journal.pone.0007660.

Wani S.A., Hussain I., Rather M.A., Kabli Z.A., Nagamani K., Nishikawa Y., Qureshi S.D. & Khan

I. 2012. Putative virulence genes and biofilm production among typical enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from diarrhoeic children in Kashmir and Andhra Pradesh. Indian J. Microbiol. 52:587-592.

Williams R.B. 2005. Intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens: rational, integrated

disease management by maintenance of gut integrity. Avian Pathol.34:159-180.

Yeong H.I., Lim S.K., Ku H.O., Park C.K., Jung S.C., Park Y.H. & Nam H.M. 2011. Occurrence of virulence determinants in fecal *Enterococcus faecalis* isolated from pigs and chickens in Korea. J. Microbial Biotech. 21:1352-1355.

QUADROS

Quadro 1. Oligonucleotídeos iniciadores e temperaturas de anelamento utilizados na reação de PCR para amplificação dos genes de *Enterococcus faecalis*

Genes	Oligonucleotídeos iniciadores(5'-3')	Amplicon (pb)	Temperatura de anelamento	Referência
<i>ddl</i> _{E-faecalis}	CACCTGAAGAAACAGGC ATGGCTACTTCAATTTACAG	475	52 °C	Depardieu et al. (2004)
<i>agg</i>	AAGAAAAAGTAGACCAAC AACGGCAAGACAAGTAAATA	1553	56 °C	Eaton & Gasson (2001)
<i>ace</i>	AAAGTAGAATTAGATCACAC TCTATCACATTCGGTTGCG	320	56 °C	Duprè et al.(2003)
<i>bopA</i>	CAGCGACATGGACAGCCTAC TTGCAGGACCGTCGAGTAAA	108	48 °C	Neste estudo
<i>bopB</i>	ATGACAGAATCCAAAACACTGC TTACGAAGGGGTTGATTAC	687	48 °C	Neste estudo
<i>bopC</i>	TTATAGAAGGTTAAATTGAT ATGAAGGATAATCGTATCAC	1010	48 °C	Neste estudo
<i>bopD</i>	GGCTTCCTCGTTGATGGCTTC ACGGCACGGAATTTGGGTAAAC	126	60 °C	Hufnagel et al. (2004)

* pb= pares de bases

Quadro 2. Frequência dos genes codificadores dos fatores de virulência detectados em cepas de *Enterococcus faecalis* isolados de frangos de corte infectados com *Eimeria* spp.*

Genes	Dieta sem anticoccidiano (n=44)		Dieta com anticoccidiano (n=26)		Total (n=70)	
	n	%	N	%	n	%
<i>agg</i>	31	70,5	24	92,3	56	80
<i>ace</i>	40	90,9	25	96,1	65	92,85
<i>bopA</i>	43	97,7	26	100	69	98,6
<i>bopB</i>	37	84,1	23	88,4	60	85,7
<i>bopC</i>	44	100	25	96,1	69	98,6
<i>bopD</i>	44	100	26	100	70	100

*P≤0,05.

Quadro 3. Relação do fenótipo de formação de biofilme com os diferentes meios de cultura e temperaturas de incubação de 36°C e 42°C em *E. faecalis*

Dieta ^d	Intensidade de isolados produtores de biofilme (%)														
	LBG ^a						LBS ^b						LBU ^c		
	36°C			42°C			36°C			42°C			36°C		
	Fo ^e	M ^e	Fr ^e	Fo ^e	M ^e	Fr ^e	Fo ^e	M ^e	Fr ^e	Fo ^e	M ^e	Fr ^e	Fo ^e	M ^e	Fr ^e
S/Aco	90,9	0	9,1	59,1	36,3	4,5	31,8	52,2	15,9	11,3	61,3	27,2	63,6	29,3	6,8
C/Aco	92,3	7,7	7,7	88,5	88,5	0	23,1	69,2	7,7	23,1	53,8	23,1	77	19,2	3,8

^a: LBG: meio LB suplementado com 0,75% de glicose, ^b: LBS: meio LB suplementado com 10% de sangue, ^c: LBU: meio LB suplementado com 10% de urina, ^d: Dietas: S/Aco: sem anticoccidiano; C/Aco: Com anticoccidiano, ^e: Fr: fraco aderente; M: moderado aderente; Fo: forte aderente.

7.1.1 Manuscrito 2

Título: “Genetic relationships of *Enterococcus faecalis* isolated from clinical, food and poultry samples”.

Periódico: Brazilian Journal of Microbiology.

Data de submissão: 19/02/2014.

Assunto: Brazilian Journal of Microbiology - Manuscript ID BJM-2014-0161

Remetente: <bjm@sbmicrobiologia.org.br>

Para: <ana.cassenego@ufrgs.br>, <anacassenego@gmail.com>

Cópia: <ana.cassenego@ufrgs.br>, <anacassenego@gmail.com>

Data: 2014-02-19 22:27

19-Feb-2014

Dear Dr. Cassenego:

Your manuscript entitled "Genetic relationships of *Enterococcus faecalis* isolated from clinical, food and poultry samples" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Brazilian Journal of Microbiology.

Your manuscript ID is BJM-2014-0161.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <http://mc04.manuscriptcentral.com/bjm-scielo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc04.manuscriptcentral.com/bjm-scielo>.

Thank you for submitting your manuscript to the Brazilian Journal of Microbiology.

Sincerely,

Brazilian Journal of Microbiology Editorial Office.

**GENETIC RELATIONSHIPS OF *Enterococcus faecalis* ISOLATED FROM
CLINICAL, FOOD AND POULTRY SAMPLES**

**A.P.V. Cassenego¹, J. Ellwanger⁵, A.W. Medeiros¹, P.A. d'Azevedo², A.M.L.
Ribeiro³, J. Frazzon⁴, A.P.G. Frazzon⁵**

¹Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil; ²Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Microbiologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil; ³Faculdade de Veterinária, Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil; ⁴Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil; ⁵Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

ABSTRACT

Enterococcus faecalis do not only inhabit the intestines of many animals, but also food and the environment. The aims of our study were (i) to carry out a comparative analysis of tetracycline resistance and virulence factor genes of *Enterococcus faecalis* isolates from food, poultry and clinical samples and (ii) to determine the genetic relationships of these factors among these isolates. A total of 182 *E. faecalis* were studied; 70, 52, and 60 strains were isolated from clinical samples, broiler cloacal swabs and food, respectively. *Enterococcus faecalis* isolates were submitted to research genes for virulence factors (*tet(L)*, *tet(M)*, *bopABCD*, *ace* and *agg*) by PCR and grouped into clusters according to their genotype. The prevalence among all the genes studied could be considered high, ranging from 61.5 to 99.4 % between genes virulence factors and 19.2 to 70.3% of the antimicrobial resistance genes, *tet(L)* and *tet(M)*, respectively,

where it was possible to obtain different genetic profiles. The enterococci isolated from food, humans and broiler cloacal swabs showed high genetic diversity, although some strains seemed to be closely related. The 182 isolates formed twelve different clusters independent of the origin of the samples or the diets used in the feeding of broilers, with the similarity index value ranging from 0.16 to 1.0. similarity coefficient. In conclusion, enterococci isolated from food, humans and broiler cloacal swabs are genetically different. In addition, the analysis of virulence factors genes and *tet* genes by PCR proved to be an effective methodology for determining the microbial diversity of *Enterococcus faecalis* isolates of different environmental sources.

Key words: *Enterococcus faecalis*, antimicrobial resistance, virulence traits, diversity.

INTRODUCTION

Enterococcos comprises a group of Gram-positive bacteria, which have fewer requirements for growth, able to grow at temperatures from 10 to 45°C, pH 9.6 in 6.5% saline and surviving 60°C for 30 minutes. Due to their ability to grow and survive in harsh environmental conditions, enterococci can be found in many different environments, such as the gastrointestinal tract of humans and warm-blooded animals (Nallapareddy *et al.*, 2000), soil, liquid surfaces and plants or vegetables (Riboldi *et al.*, 2008; Cassenego *et al.*, 2011; Castillo-Rojas *et al.*, 2013). However, the performance of enterococcal species as the etiologic agent of human infections is known.

In recent years, some species have acquired greater importance in nosocomial frames as opportunistic pathogens (Giraffa, 2002). The main species of enterococci that cause human infections are *Enterococcus faecalis* (80 to 90%) and *Enterococcus faecium* (5 to 15%). In these species associated with the virulence of bacterial

pathogenicity and virulence factors was gender (Mannu *et al.*, 2003; Qin *et al.*, 2000; Riboldi *et al.*, 2008; Semedo *et al.*, 2003).

One bacterium to be pathogenic, it must essentially clinging to tissues, invade them, multiply and survive the host defense mechanisms and other bacteria in competition, producing tissue damage. Among the virulence factors most frequently cited in the literature in strains of *E. faecalis* are the production of aggregation substance (*agg*), the surface adhesins (*ace*) and biofilm formation (*bopABCD* operon) (Duprè *et al.*, 2003; Hufnagel *et al.*, 2004; Lebreton *et al.*, 2005). These genes, alone or in combination, may play an important role in cell adhesion and biofilm formation (Donlan and Costerton, 2012). Besides this characteristic virulence, one reason for the increase of enterococci infections is related to its ability to develop resistance to a wide variety of antimicrobials.

Enterococcus faecalis reservoirs and vehicles of antibiotic resistance are known and many studies have dealt with over the distribution of antimicrobial resistance genes in strains isolated from enteric habitat, and food samples collected at various stages of the food chain (Rice and Carias, 1998, Aarestrup *et al.*, 2000; Hummel *et al.*, 2007; Frazzon *et al.*, 2009). The tetracycline resistance phenotype is a highly prevalent among enterococci, and resistant to many classes of antimicrobials such genes have been identified. Different genetic mechanisms are responsible for resistance to tetracycline, the most studied are the ribosome protection encoded by *tet(M)* gene and efflux systems encoded by the *tet(L)* gene (Clewell *et al.*, 1995; Huys *et al.*, 2004; Hummel *et al.*, 2007). Several techniques can be performed to determine phylogenetic group in enterococcus, such as pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) (Jackson *et al.*, 2012), random amplified polymorphic DNA (RAPD) (Rossetti and Giraffa, 2007, Riboldi *et*

al., 2008; Costa *et al.*, 2009), multilocus sequence type (MLST) (Castillo-Rojas *et al.*, 2013). PFGE is the “gold standard” technique, but it is costly and time-consuming.

The epidemiological importance of *Enterococcus faecalis* is associated with the fact that species not only provide intrinsic susceptibility to multiple antimicrobials, but also the presence of virulence factors. This study aimed to evaluate the distribution and diversity of virulence factors in *E. faecalis* isolates from broilers cloacal swabs, foods of various origins and clinical specimens from infected patients.

MATERIAL AND METHODS

Origin of strains of *Enterococcus faecalis*

A total of 182 *E. faecalis* were studied; 70 were isolated from broiler cloacal swabs in 2009, 52 clinical samples such as blood, urine and body secretions collected during the years 2005 to 2009 and 60 isolated from food samples, collected from vegetables, dairy and meat during the years 2006 to 2007 (d’Azevedo *et al.*, 2006; Riboldi *et al.*, 2008; Frazzon *et al.*, 2009, Cassenego *et al.*, 2011). The isolates were selected from bacterioteca Department of Microbiology (ICBS/UFRGS) and Gram-positive Cocos laboratory UFCSPA. All isolates were confirmed at genus and specie by the technique of polymerase chain reaction (PCR). The primers sequences of of *tuf* and *dll_{E.faecalis}* genes are shown in Table 1.

Total DNA extraction, amplification of virulence genes by PCR and phylogenetic grouping

Strains were grown on BHI liquid medium at 35°C for 24h. Total DNA was extracted using the protocol described by Cassenego *et al.* (2013). The presence of *bopABCD* operon, *agg*, *ace*, *tet* (M) and *tet* (L) genes was performed by PCR (Eaton and

Gasson, 2001; Duprè *et al.*, 2003; Frazzon *et al.*, 2009; Cassenego *et al.*, 2013). The primers sequences and their annealing temperatures are shown in Table 1.

The PCR was carried out in a total volume of 25 µL containing: 200 µM of each dNTP, 0.4 µM of each primer, 1.5 mM MgCl₂, 1X buffer supplied with Taq polymerase, 1.25 U of *Taq* DNA polymerase (Gibco BRL, France) and 100 ng of template DNA. PCR was performed with an Omnigene DNA thermal cycler (Hybaid, UK). Cycles used were as follows: 1 cycle at 94°C for 4 min; 40 cycles at 94°C for 1 min, at temperature annealing (see table 1) for 1 min, at 72°C for 2 min; 1 cycle at 72°C for 15 min.

Table 1- Oligonucleotide primers used in the PCR reactions.

Virulence genes	Nucleotide sequence (5'-3')	Amplicon size (pb)*	Annealing temperature (°C)	Reference
<i>tuf</i>	TACTGACAAACCATTTCATGATG AACTTCGTCACCAACGCGAAC	112	54	Koch <i>et al.</i> , 2004
<i>ddl</i>	CACCTGAAGAAACAGGC ATGGCTACTTCAATTTACAG	475	52	Depardieu <i>et al.</i> , 2004
<i>agg</i>	AAGAAAAAGTAGACCAAC AACGGCAAGACAAGTAAATA	1553	54	Duprè <i>et al.</i> , 2003
<i>ace</i>	AAAGTAGAATTAGATCACAC TCTATCACATTCGGTTGCG	320	52	Eaton and Gasson, 2001
<i>bopA</i>	CAGCGACATGGACAGCCTAC TTGCAGGACCGTCGAGTAAA	108	60	Cassenego <i>et al.</i> , 2013
<i>bopB</i>	ATGACAGAATCCAAAACACTGC TTACGAAGGGGTTGATTCAC	687	56	Cassenego <i>et al.</i> , 2013
<i>bopC</i>	TTATAGAAGGTTAAATTGAT ATGAAGGATAATCGTATCAC	1010	48	Cassenego <i>et al.</i> , 2013
<i>bopD</i>	GGCTTCCTCGTTGATGGCTTC ACGGCACGGAATTTGGGTAAAC	126	66	Hufnagel <i>et al.</i> , 2004
<i>tet</i> (M)	GTAAATAGTGTCTTGGAG CTAAGATATGGCTCTAACAA	406	54	Frazzon <i>et al.</i> , 2009
<i>tet</i> (L)	ACTCGTAATGGTGTAGTTGC TGTAACCTCCGATGTTTAAACAG	625	58	Frazzon <i>et al.</i> , 2009

*base pairs

Phylogenetic grouping was done on the basis of the presence or absence of the virulence factors genes.

Statistical Analysis

The results were subjected to statistical analysis using the program Paleontological statistics software package for education and data analysis (PAST) version 2.17ce followed normality. The dendrograms was performed using the Jaccard similarity coefficient.

RESULTS

Frequency of genes of virulence factors and antibiotic resistance among samples

To evaluate the distribution of virulence factors genes, 182 *E. faecalis* strains isolated from humans, food and animals in South Brazil between 2005 and 2009 were chosen. In Table 2, the results for the prevalence of the genes of the virulence factors in all isolates studied.

Enterococcus faecalis isolated from broiler cloacal swabs showed the elevated number of virulence genes compared to food and clinical isolates. In this study, the *ace* gene was detected in 94.2% and 86.6 % of isolates from broiler cloacal swabs and food, respectively, and 75% of the clinical isolates. The *agg* gene was more often in strains isolated from broiler cloacal swabs (78.5%), followed by clinical (57.7%) and food (45%). The *bopA* gene was detected more frequently (98.5%) in broiler cloacal isolates, followed immediately by clinical (96.1%) and food (90%) isolates. Like *bopA* gene, *bopC* gene was also more prevalent among broiler cloacal swabs (98.5%). The *tet(M)* gene, in turn, was found in 87.1% of samples from cloacal swabs chicken and 61.6% food and 57.7% of the clinical samples.

Table 2- Prevalence of virulence and antimicrobial resistance among *Enterococcus faecalis* isolates from food and clinical samples broilers factors.

Genes	Broilers	Percentual of PCR positive in		
		Clinical	Food	Total
<i>ace</i>	94.2	75	86.6	86.2
<i>agg</i>	78.5	57.7	45	61.5
<i>bopA</i>	98.5	96.1	90	95
<i>bopB</i>	85.7	88.4	95	89.5
<i>bopC</i>	98.5	96.1	95	96.7
<i>bopD</i>	100	100	98.3	99.4
<i>tet(L)</i>	18.5	15.4	23.3	19.2
<i>tet(M)</i>	87.1	57.7	61.6	70.3

Isolates presenting the *bopB* gene, comprising 89.5% of the total, with the food isolates (95%), than humans and broilers sample, 88.4% and 85.7%, respectively. The *bopD* gene showed very similar frequencies (98.3% - 100%) among the isolates. Among the genes evaluated in this study, the *tet(L)* gene showed the lower frequencies among the isolates (23.3 to 15.4%).

Regarding the genes of the operon *bopABCD*, the *bopD* gene showed the highest frequency (99.4%) among the isolates, followed immediately by *bopC* (96.7%), *bopA* (95%) and *bopB* (89.5%).

Phylogenetic *E.faecalis* divergence of virulence and resitant genes content

Phylogenetic grouping was done based on the PCR method using primers targeted at virulence factors genes, *bopABCD* operon *agg*, *ace*, *tet(M)* and *tet(L)*. The phylogenetic tree was constructed from the analysis of the presence of the genes of the virulence factors of isolated from various environments to evaluate the genetic variability of isolates (Figure 1). A total of 182 *E. faecalis* strains isolated from humans, broilers and food were assigned to four phylogenetic groups (i.e. A, B, C and D) and

four subgroups (i.e. A1, A2, B1 and B2). Groups A and B showed 65% similarity and comprised 173 of the 182 isolates tested. The group B contained the majority of the collected isolates (161 isolates, 87.36%), followed by group A (12 isolates, 6.59%). Nine isolates (4.94%) were not grouped in clusters described above, because they had similarity coefficients above 0.16 to 0.52. These isolates were grouped into two groups so as to facilitate the understanding, being named C and D, respectively.

The group A was divided into two subgroups (A1 and A2) with a similarity coefficient above 0.70, indicating genetic proximity. In A1, was included only one *E. faecalis* isolate of broiler cloacal swabs that was positive to all genes from the *bopACD* operon and also *tet(M)* gene. The subgroup A2 comprised strains with the complete *bop* operon and six isolates from clinical (blood and urine) and five food (dairy, vegetables and meat) isolates belonged to this subgroup.

The differences between the strains of cluster B generated two subgroups, the B1 and B2 with similarity coefficients 0.73, indicating genetic proximity and suggesting that these isolates could represent a genetic pool of *E. faecalis* strains. The B1 was subdivided into two, generating B1.1 and B1.2 subgroups with similarity coefficients 1.0 each other.

The B1.1 was composed by 7 isolates (3 cloacal swabs from broilers and 4 different foods such as meat, dairy and vegetables) which were positive form all *bop* operon, *ace*, *tet(L)* and *tet(M)* genes. In the B1.2 were grouped isolates that showed the *bopABCD*, *ace* and *tet(L)* genes. The four strains of B1.2 were isolated from vegetables such as potatoes and sweet potatoes in 2006.

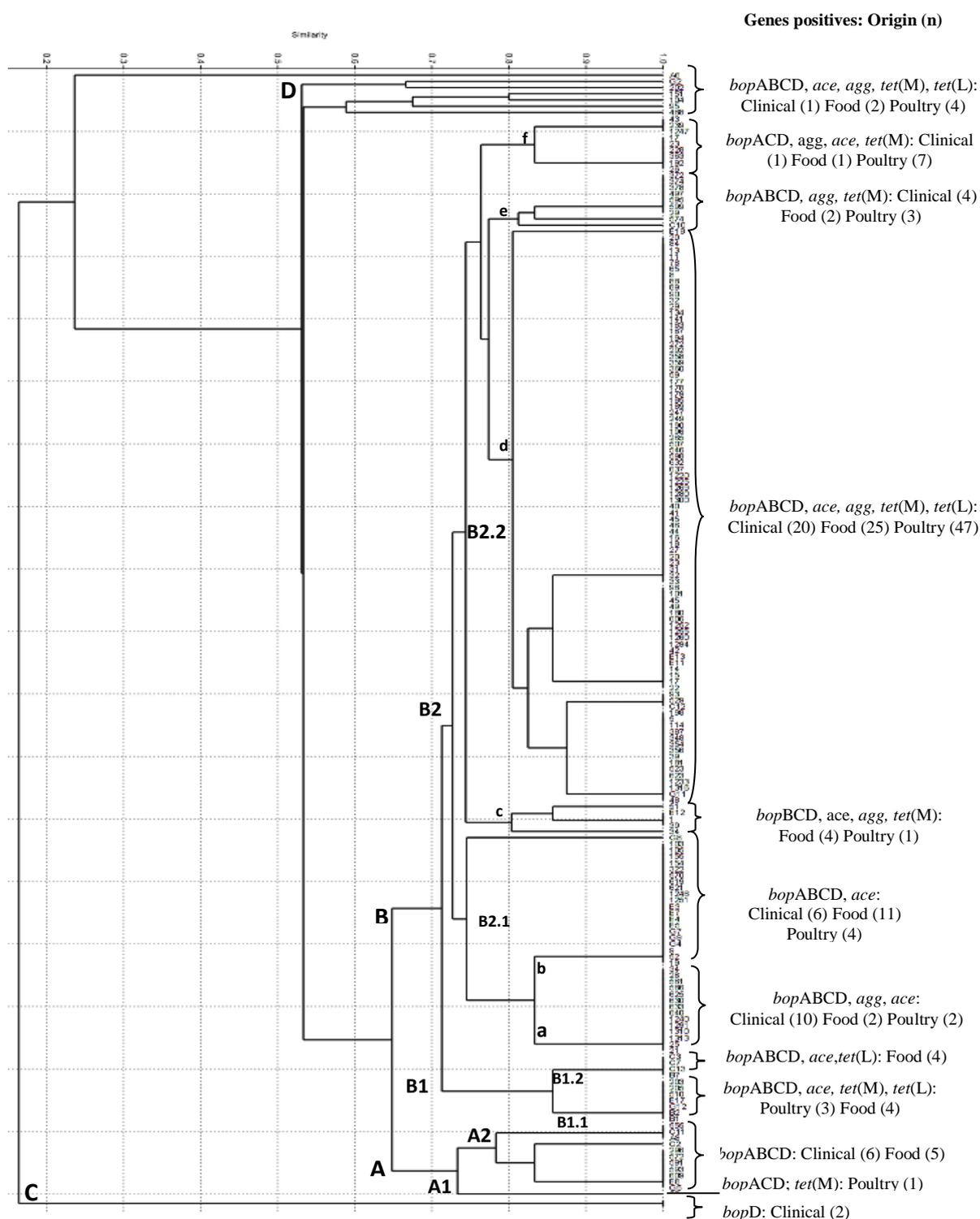


Figure 1-Dendrogram based on results of PCR with primers for genes of virulence and antimicrobial resistance factors. The similarity was calculated using the correlation coefficient of Jaccard and clusters were built with PAST.

The majority of collected isolates (150 isolates, 82.41%) were grouped in group B2. In this group are 67 of 70 isolates from broiler cloacal swabs. Isolates in this group had three or four genes of the operon *bop*, the gene *tet(L)*, *tet(M)*, besides the *ace* or *agg* genes, according to the classification of subgroups. The B2 group was divided into two subgroups with 75 % similarity each the B2.1 and B2.2.

The B2.1 was divided again in “a” and “b”, and included 35 isolates. The subtype a (*bopABCD*, *agg* and, *ace* genes) contains 14 isolates (10 clinical isolates from urine, two food isolates from chicken carcass in 2007 and two broilers isolated in 2008). The subtype b comprises isolates (6clinical, 11 from chicken carcass and dairy isolates in 2006 and 2007 and 4 broilers cloacal) positive to *bopABCD* and *ace* genes.

In the B2.2 subgroup was pooled 115 isolates and divided into subtypes “c”, “d”, “e” and “f” with similarity coefficients 0.8. In subtype "c" contains four isolates of cheese and one isolate from cloacal swabs chickens. These strains contain virulence genes *bopBCD*, *ace*, *agg*, *tet(M)*. The subtype "e" grouped four isolates of clinical origin, two isolates from food and three cloacal swabs and the your present genes are *bopABCD*, *agg*, *tet(M)*. The subtype “d” is the biggest group of the phylogenetic tree and contains 92 isolates, where 25 are isolated from food samples, 20 clinical and 47 are most isolated of chickens cloacal swabs and has all the genes studied. The subtype “e” contain the genes *bopABCD*, *agg*, *tet(M)* with four clinical isolates, two isolates from food and three of poultry (cloacal swabs), while the subtype “f” grouped one clinical isolate, one isolate from food and seven poultry isolates from swabs cloacal which contains the genes *bopACD*, *agg*, *ace*, *tet(M)*.

Group C contains two isolates of clinical origin (urine) and group D, showed seven isolates, three swabs of chickens, two food (cheese) and two clinical origin (urine) and were more distant from the other isolates (similarity coefficients 0.53).

DISCUSSION

Frequency of genes of virulence factors between samples

Frequencies of virulence genes between the samples are consistent to those observed in other studies. McBride *et al.* (2007) demonstrated that the virulence factors can be found in various strains of *E. faecalis*.

The prevalence of the *agg* gene among isolates from food and clinical in the present study are in agreement with those observed by Dupont *et al.* (2008), Bittencourt and Suzart (2004) and Eaton and Gasson (2001). The *agg* gene was detected at a high frequency between samples of *E. faecalis* isolated from broilers cloacae when compared with Poeta *et al.* (2006) that detected a frequency of 39.5% in *agg* in fecal samples of broilers. However, the frequency reported by the authors was still considered high, since the presence of this gene was only detected in isolates of *E. faecalis* enterococci among all surveyed.

The *ace* gene encoding collagen adhesin of *E. faecalis* (Ace) also showed high levels among isolates from broilers cloacal swabs (94.2%). This is a cellular protein, specific surface area *E. faecalis*, which allows the binding of bacteria to the extracellular matrix proteins, collagens type I and IV and laminin may play a role in the pathogenesis of endocarditis (Nallapareddy *et al.*, 2000; Kochet *et al.*, 2004). Diarra *et al.* (2010) demonstrated that 100% of *E. faecalis* isolated from feces or cecum of broilers contained the *ace* gene. Once again, Poeta *et al.* (2006) is in agreement with the results

obtained in this study, with a prevalence of 62.8% of *E. faecalis* isolated from fecal samples of broilers, with *ace* being detected only in isolates of this species. Similar to those observed for the *ace* among clinical samples was found by Nallapareddy *et al.* (2000) who detected a frequency 60% *ace* gene. The prevalence of 86.6% of the *ace* gene in food isolates also corroborate those determined by Cariolato *et al.* (2008) in food samples. Olsen *et al.* (2011) investigated the gene in human isolates with bacteremia and cloacal swabs of broilers and also achieved 100 % attendance and 99 % gene similarity *ace* among different isolates studied in both origins. Silva *et al.* (2013) demonstrated the presence of different levels of *ace* gene ranging between 75 and 94.2% for *E. faecalis* isolated from poultry and clinical specimens, respectively.

The genes of the operon *bopABCD* were observed with high frequency among all isolates. The gene encodes a glycosyltransferase, *bopA*, located immediately downstream *bopB* responsible for the polymerization of phosphoglucomutase enzyme, followed by *bopC* encoding an aldolase-1-epimerase. The last gene in the operon, the *bopD*, the transcriptional regulator is a sugar binder and is involved in biofilm formation by *E. faecalis* (Hufnagle *et al.*, 2004). To date, no studies on the prevalence of genes in the operon *bopABCD* isolates of *E. faecalis* isolated from clinical and food samples.

The results observed for the *tet(M)* and *tet(L)* genes are according to studies by several authors (Aarestrup *et al.*, 2000; De Leener *et al.*, 2004; Cauwerts *et al.*, 2007; Frazzon *et al.*, 2009). The *tet(L)* gene has been found in fewer screened isolates (19.2%). This gene encodes a membrane protein, called efflux, which carries molecules out of the cell such as tetracycline and doxycycline (Chopra and Roberts, 2001). The gene *tet(M)* is commonly located on the bacterial chromosome and can be adduced by

the conjugative transposons Tn916/Tn1545 family (Clewell *et al.*, 1995; Poeta *et al.*, 2006). A similar situation was found during a survey conducted in hospitals in France, where 229 enterococci were isolated for 10 collections. In this study, the *tet(M)* and *tet(L)* genes have high prevalence among samples and were determinants for tetracycline resistance (Charpentier *et al.*, 1994). The lowest frequency of *tet(L)* gene can be explained because their transfer to other cells since they are not able to transfer themselves independently, depending on the presence of conjugative plasmids, so its spread in the population happens slowly. Moreover, the association of *tet(M)* gene of conjugative elements such as transposons have been an important factor in the spread of tetracycline resistance in enterococci (Chopra and Roberts, 2001).

Phylogenetic *E. faecalis* divergence of virulence and resistant genes content

Genetic characteristics variables provide a niche specialization and virulence of *E. faecalis*. Thus, by colonizing ability in a wide range of hosts and environments most suitable for a particular niche variants can proliferate and fill the niche, where the phylogenetic analysis evaluating the presence of virulence factors revealed clusters isolated from all origins and different periods of years. However, the selective forces that lead to convergence of these characteristics and adaptability continue to be studied. Our study assessed the diversity of *E. faecalis* from different sources and noted that the isolated show a similarity coefficients value ranging from 0.65 to 1.0. Castillo-Rojas *et al.* (2013) reported that *E. faecalis* isolated from samples of urine, pleural fluid and blood and water content similarity coefficients 0.6, suggesting that the strains were related.

Enterococcus faecalis originating from clinical samples isolated from blood, urine, pus and vaginal fluid from a hospital in Malaysia, demonstrated a high level of

diversity in typing by PFGE and MLST) agreeing with studies observed in this study and studies by Lloyd *et al.* (1998) and from the same or other hospitals has also been reported (Silva *et al.*, 2013). The technique of RAPD is also commonly used in species-specific identification and typing as use of M13 in a primer sequence developed by Rossetti and Giraffa (2007) used on analysis of genetic diversity of *Enterococcus* by Riboldi *et al.* (2008) and Costa *et al.* (2009).

The PCR phylotyping technique was described by Clermont *et al.*, (2000) and has been used to evaluate the different phylogenetic of *E. coli* strains using a combination of genes (Derakhshandeh *et al.*, 2013). In the present study we evaluated the PCR phylotyping using a combination of virulence genes for *E. faecalis* and this technique showed results strongly correlate with those obtained by RAPD method for *E. faecalis* (Costa *et al.*, 2009). It is an excellent technique for rapid and inexpensive assigning of *E. faecalis* strains in different phylogenetic groups.

These studies support the possibility of *E. faecalis* possess great ability to adapt to different environments, with their establishment and possible isolation of different sample origins. Another study about resistance phenotype between populations of *E. faecalis* isolates from chicken carcasses after cooling processing in five different places, showed that all plants have a high degree of diversity, despite their resistance phenotype were largely grouped into a single cluster, reporting that the likely standardization of procedures exert selective pressures operating uniforms, characterizing the environment as phenotypic determinant (Olsen *et al.*, 2011).

Cobo Molinos *et al.* (2008) suggests that the presence of the operon *ebp* (encoding pilli) in *E. faecalis*, there are a role in the ubiquity of the species isolated

from clinical and food origin, where the presence of certain genetic traits increases their adaptation to specific environments. This fact exalts the importance of dissemination of enterococci containing determinants of virulence and antimicrobial resistance genes across different environments, increasing their potential and ability to interact with human hosts.

In conclusion, the differences in frequencies of virulence genes in *E. faecalis* isolates from different sources shows that genetic gains and losses are important and crucial role of adaptation to a new habitat and the emergence of new strains contribution. However, the phylogenetic tree shows that despite the different origins of the isolates and the various genotypic profiles, the *E. faecalis* species exhibits a great adaptive capacity in different environments, even where selective pressure and high frequency of gene exchange occurs. Such characteristics may allow their survival in these environments and gives its characteristic of ubiquity.

Also important to note that the different period of isolation of the samples between 2005 and 2009 did not interfere during the cluster, not being considered a determinant of genetic diversity. In addition, PCR phylotyping technique proved to be effective, rapid and inexpensive for the study of diversity of *E. faecalis* strains in different phylogenetic groups.

ACKNOWLEDGMENTS

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the financial assistance.

REFERENCES

Aarestrup FM, Agerso Y, Gerner-Smidt P, Madsen M, Jensen LB (2000) Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis*

and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diag Microb and Inf Dis* 37:127-137.

Bittencourt E, Suzart S (2004) Occurrence of virulence-associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina, Brazil. *J Med Microbiol* 53:1069-1073.

Cariolato D, Andrighetto C, Lombardi A (2008) Occurrence of virulence factors and antibiotic resistances in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* collected from dairy and human samples in North Italy. *Food Contr* 19:886-892.

Cassenego APV, d'Azevedo PA, Ribeiro AML, Frazzon J, Van Der Sand ST, Frazzon APG (2011) Species distribution and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from broilers infected experimentally with *Eimeria* spp. and fed with diets containing different supplements. *Braz J Microb* 42:480-488.

Cassenego APV, Ellwanger J, d'Azevedo PA, Ribeiro AML, Frazzon J, Frazzon APG (2013) Virulência e formação de biofilme microbiano por *Enterococcus faecalis* isolados de swabs cloacais de frangos de corte infectados com *Eimeria* spp. *Pesq Vet Bras* 33(12):1433-1440.

Castillo-Rojas G, Mazari-Hiriárt M, León SP, Amieva-Fernández RI, Agis-Juárez RA, Huebner J, López-Vidal Y (2013) Comparison of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Strains Isolated from Water and Clinical Samples: Antimicrobial Susceptibility and Genetic Relationships. *Plos one* 8(4):doi:10.1371/journal.pone.0059491.

Cauwerts K, Decostere A, De Graef E.M, Haesebrouck F, Pasmans F (2007) High prevalence of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from broilers carrying the *erm(B)* gene. *Avian Pathol* 36 (5):395-399.

Charpentier E, Gerbaud G, Courvalin P (1994) Presence of *Listeria* tetracycline resistance genes *tet(S)* in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agent Chemother* 38:2330-2335.

Chopra I, Roberts M (2001) Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Molec Biol Rev* 65:232-260.

Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E (2000) Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 66, 4555–4558.

- Clewell DB, Flannagan SE, Jaworski DD (1995) Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn916-Tn1545 family of conjugative transposons. *Trends in Microbiol* 3:229-236.
- Cobo Molinos A, Abriouel H, Omar NB, López RL, Galvez A (2008) Detection of *ebp* (endocarditis- and biofilm-associated pilus) genes in enterococcal isolates from clinical and non-clinical origin. *Int J Food Microbiol* 126:123-126.
- Costa AG Frazzon APG, D'Azevedo PA, Frazzon J, Van der Sand ST (2009) Perfil genotípico de *Enterococcus faecalis* resistentes a antimicrobianos isolados de carne de frango e de infecção urinária pela técnica molecular RAPD-PCR. *Biociências* 17(1):74-71.
- d'Azevedo PA, Dias CAG, Teixeira LM (2006) Genetic diversity and antimicrobial resistance of enterococcal isolates from southern region of Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 48:11-16.
- Diarra MS, Rempel H, Champagne J, Masson L, Pritchard J, Topp E (2010) Distribution of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus* spp. and characterization of isolates from broiler chickens. *Appl and Environ Microbiol* 76 (24): 8033-8043.
- De Leener E, Martel A, Decostere A, Haesebrouck F (2004) Distribution of the *erm*(B) gene, tetracycline resistance genes, and Tn1545-like transposons in macrolide- and lincosamide-resistant enterococci from pigs and humans. *Microb Drug Resist* 10 (4):341-345.
- Depardieu F, Perichon B, Courvalin P. (2004) Detection of the *van* Alphabet and Identification of Enterococci and Staphylococci at the Species Level by Multiplex PCR. *J Clin Microb* 42 (12):5857-5860.
- Derakhshandeh A, Firouzi R, Moatamedifar M, Motamedi A, Bahadori M, Naziri Z (2013) Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains isolated from human samples *Molec Biol Res Commun* 2 (4):143-149.
- Donlan RM, Costerton JW (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15:167-193.
- Dupont H, Vael C, Muller-Serieys C, Chosidow D, Mantz J, Marmuse JP, Andremont A, Goossens H, Desmonts JM (2008) Prospective evaluation of virulence factors of enterococci isolated from patients with peritonitis: impact on outcome. *Diag Microbiol Inf Dis* 60 (3):247-253.

- Duprè S, Zanetti AM, Schito G, Fadda L, Sechi LA (2003) Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). *J Med Microbiol* 52:491-498.
- Eaton TJ, Gasson MJ (2001) Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol* 67 (4):1628-1635.
- Frazzon APG, Gama BA, Hermes V, Bierhals CG, Pereira RI, Guedes AG, d'Azevedo PA, Frazzon J (2009) 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 J Microbiol Biotech (On line)*. doi: 10.1007/s11274-009-0160-x.
- Giraffa, G (2002) Enterococci from food. *FEMS Microbiol Rev* 744:1-9.
- Hufnagel M, Koch S, Creti R, Baldassarri L, Huebner JA (2004) Putative Sugar-Binding Transcriptional Regulator in a Novel Gene Locus in *Enterococcus faecalis* Contributes to Production of Biofilm and Prolonged Bacteremia in Mice. *J Infect Dis* 189:420-430.
- Hummel A, Holzappel WH, Franz CM (2007) Characterization and transfer of antibiotic resistance genes from enterococci isolated from food. *Syst Appl Microbiol* 30:1-7.
- Huys G, D'Haene K, Collard JM, Swings J (2004) Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from food. *Appl Environ Microbiol* 70:1555-1562.
- Jackson CR, Furtula V, Farrell EG, Barrett JB, Hiott LM, Chambers P (2012) A Comparison of BOX-PCR and Pulsed-Field Gel Electrophoresis to Determine Genetic Relatedness of Enterococci from Different Environments. *Microb Ecol* 64:378-387.
- Koch S, Hufnagel M, Theilacker C, Huebner J (2004) Enterococcal infections: host response, therapeutic and prophylactic possibilities. *Vaccine* 22 (7):822-830.
- Lebreton Y, Pichereau V, Sauvageot Y, Auffray Y, Rince A (2005) Maltose utilization in *Enterococcus faecalis*. *J Appl Microbiol* 98:806-813.
- Lloyd S, Zervos M, Mahayni R, Lundstrom T (1998) Risk factors for enterococcal urinary tract infection and colonization in a rehabilitation facility. *Am J Infect Control* 26(1):35-39.

- Mannu L, Paba A, Daga E, Comunian R, Zanetti S, Duprè I, Sechi LA (2003) Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *Int J Microb* 88:291-304.
- McBride SM, Fischetti VA, LeBlanc DJ, Moellering RC, Gilmore MS (2007) Genetic Diversity among *Enterococcus faecalis*. *Plos one* 2(7):e582. doi:10.1371/journal.pone.0000582.
- Nallapareddy SR, Qin X, Weinstock GM, Murray BE (2000) *Enterococcus faecalis* adhesin, ace, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. *Infect Immun* 68 (9):5218-5224.
- Olsen RH, Schonheyder HC, Christensen H, Bisgaard M (2011) *Enterococcus faecalis* of human and poultry origin share virulence genes supporting the zoonotic potential of *E. faecalis*. *Zoonoses and public health (on line)* doi:10.1111/j.1863-2378.2011.01442.x.
- Poeta P, Costa D, Rodrigues J, Torres, C (2006) Detection of genes encoding virulence factors and bacteriocins in fecal Enterococci of poultry in Portugal. *Avian Dis* 50:64-68.
- Qin X, Singh KV, Weinstock GM, Murray BE (2000) Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and serine protease and virulence. *Inf Immun* 68(5):2579-2786.
- Riboldi G, Mattos EP, Frazzon APG, d'Azevedo P, Frazzon J (2008) Phenotypic and genotypic heterogeneity of *Enterococcus* species isolated from foods in Southern Brazil. *J Basic Microbiol* 48:31-37.
- Rice LB, Carias LL (1998) Transfer of Tn5385, a Composite, Multiresistance Chromosomal Element from *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* 180 (3):714-721.
- Rossetti L, Giraffa G (2007) Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. *J Microbiol Methods* 63 (2):135-44.
- Semedo T, Santos MA, Lopes MFS, Marques JJF, Crespo MTB, Tenreiro R (2003) Virulence factors in food, clinical and reference enterococci: a common trait in the genus? *System Appl Microb* 26:13-22.
- Silva J, Rodríguez Y, Araya J, Gahona J, Valenzuela N, Guerrero K, Báez J, Baquero F, del Campo R (2013) Detección de genes de virulência em cepas de *Enterococcus faecalis* susceptibles y resistentes a aminoglicósidos. *Rev Chilena Infectol* 30(1):17-22.

8. VITA

8.1 Dados Pessoais:

Nome: Ana Paula Vaz Cassenego

Endereço: Rua Luiz Afonso, 526/408. Bairro: Cidade Baixa.

CEP: 90050-310. Porto Alegre, RS.

Telefone: (51) 93597109

E-mail: ana.cassenego@ufrgs.br

8.2 Formação Acadêmica/Titulação:

2010-2014: Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente- Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

2008-2010: Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente- Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

2002-2008: Faculdade de Medicina Veterinária- Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

1999-2001: E.E.E.M. Cilon Rosa- Santa Maria- RS.

1990-1998: E.E.E.F. Marieta d'Ambrósio- Santa Maria- RS.

8.3 Atuação Profissional:

2012-2013: Pesquisadora do Departamento de Microbiologia da Università Degli Studi di Sassari (UNISS), Sassari (SD), Itália.

2007: Estagiária do Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva (HCV)- UFRGS.

2006-2007: Estagiária do Laboratório de Bacteriologia (LABAC)- UFSM.

2004-2006: Bolsista de Iniciação Científica do Laboratório Central de Diagnósticos de Patologia Aviária (LCDPA)- UFSM.