



¹Bolsista de iniciação científica do Departamento de Microbiologia-UFRGS

²Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente- UFRGS

³Professor do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde- UFRGS

INTRODUÇÃO

O gênero *Enterococcus* compreende bactérias Gram-positivas, que são caracterizadas por sua capacidade de crescer em temperaturas de 10 a 45 °C, em pH de até 9,6 e em meios com altas concentrações de NaCl. Habitam o trato gastrointestinal de humanos e de outros animais, sendo também encontradas em solo, água e alimentos (AARESTRUP et al., 2004). Estes microrganismos possuem fatores de virulência responsáveis por sucessivos eventos que levam à colonização, à adesão aos tecidos, à invasão e à resistência a mecanismos específicos e inespecíficos da imunidade do paciente, entre eles, capacidade de formar biofilme, onde atuam proteínas específicas responsáveis por cada evento (JOHNSON; 1994).

Biofilme é uma associação de microrganismos e de seus produtos extracelulares, que se encontram aderidos a superfícies bióticas ou abióticas. Apresentam grande importância médica, sendo responsáveis por mais de 80% das infecções causadas por microrganismos (LEWIS, 2001).

OBJETIVO

Analisar a frequência dos genes dos genes *agg* e *ace* envolvidos com a virulência e formação de biofilme em *Enterococcus faecalis* isolados de diversos alimentos, frangos de corte e amostras clínicas, através da PCR, e observar a atividade da enzima gelatinase sob duas temperaturas de crescimento. Realizar ensaio de biofilme em microplacas de 96 poços nas temperaturas de 37°C e 42°C, observando a capacidade em formar biofilme.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram testadas 196 amostras de *Enterococcus faecalis*, isoladas de cloacas de frangos, amostras clínicas, carnes, verduras, legumes e leite. Os isolados cresceram em caldo BHI e o DNA total foi extraído pelo método Fredricks e Relman (1998).

Para as reações de PCR dos genes *ace* e *agg*, foram utilizados: 1µL de DNA, 10µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 200µM de cada dNTP, 1U de Taq DNA Polimerase, 1,5mM de MgCl₂, tampão de reação e água MilliQ.

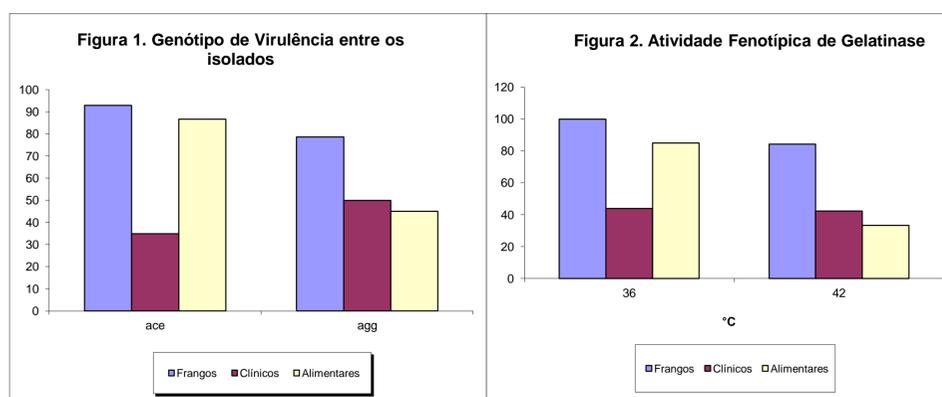
Para a detecção da produção de gelatinase, foi utilizado caldo BHI suplementado com gelatina (4%), para visualizar a liquefação da gelatina. O protocolo utilizado seguiu o descrito por Eaton & Gasson (2001).

Os ensaios de biofilme serão realizados em todos os isolados, como descrito por Tendolkar et al. (2004), suplementando o meio de crescimento caldo TSB com sangue (10%), glicose (1,5%) e uréia.

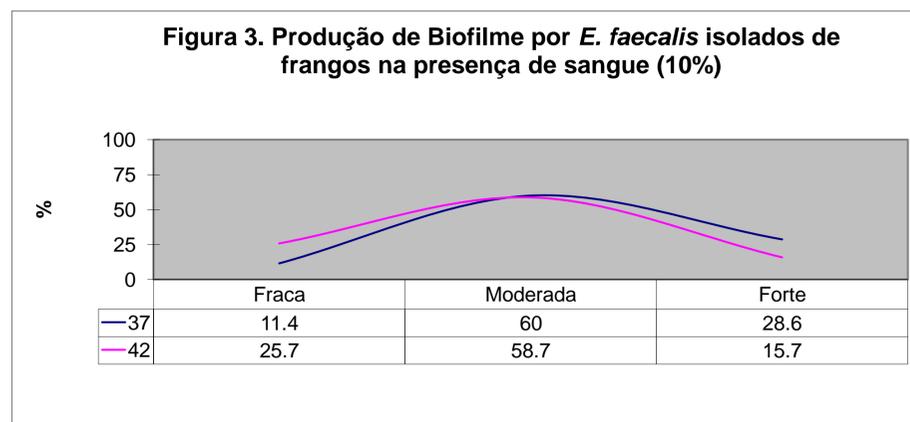
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 196 isolados avaliados, 92,85% dos isolados de frangos, 34,85% dos isolados clínicos e 86,6% dos isolados alimentares possuem o gene *ace*, enquanto 78,6% dos isolados de frangos, 50% dos isolados clínicos e 45% dos isolados alimentares tiveram resultado positivo para o gene *agg* (Figura 1).

Em relação aos testes de atividade da gelatinase, em temperatura de 36°C, todos os isolados de frangos demonstraram-se positivos, enquanto 43,9% dos isolados clínicos e 85% dos isolados alimentares tiveram fenótipo positivo. Em temperatura de 42°C, 84,3% dos isolados de frangos, 42,4% dos isolados clínicos e 33,3% dos isolados alimentares degradaram a gelatina (Figura 2).



Nos ensaios de biofilme realizados até o momento, 70 *E. faecalis* isolados de frangos e crescidos em caldo TSB na presença de sangue (10%) a 37°C e 42°C, foram classificados de acordo com a capacidade em formar biofilme em microplacas de 96 poços, demonstrados na Figura 3.



CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos pode-se observar uma elevada prevalência dos genes *ace* e *agg*, relacionados com a formação de biofilme, assim como a redução da atividade fenotípica de gelatinase em temperaturas mais altas que a ideal para crescimento de *E. faecalis*.

Os ensaios de biofilme realizados nos isolados de frangos, mostram uma leve redução na capacidade de formação do biofilme, também decorrente das mesmas temperaturas de crescimento.

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F. M. Monitoring of antimicrobial resistance among food animals: principles and limitations. *J. Vet. Med.* B 51, 380–388, 2004.
- EATON, T.J. & GASSON, M.J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(4), 1628-35, 2001.
- Fredricks, D.N.; Relman, D.A. Sequencing of DNA bacteria by universal 16Sr DNA PCR. *Journal of Clinical Microbiology.* 36: 2810-2816, 1998.
- JOHNSON, A. P. The pathogenicity of enterococci. *J. Antimicrob. Chemother.* 33, 1083–1089, 1994.
- LEWIS, K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 45, 999–1007, 2001.
- TENDOLKAR, P. M., BAGHDAYAN, A. S., GILMORE, M. S. SHANKAR, N. Enterococcal surface protein, *esp*, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect. Immun.* 72, 6032–6039, 2004.