

1 **Identificação genotípica, fatores de virulência e capacidade de formação de**
2 **biofilme in vitro de *Enterococcus* spp. isolados de leite bubalino no sul do**
3 **Brasil.**

4 R. I. Pereira^{1,2}, J. Prichula^{1,2}, N.A. Santestevan¹, P.A. d'Azevedo², A.P.G. Frazzon¹

5 ¹Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia,
6 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil;

7 ²Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Microbiologia, Universidade Federal de Ciências da
8 Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil.
9

10 **RESUMO**

11 O consumo de leite de búfala e seus derivados têm aumentado significativamente em
12 decorrência da procura por produtos mais nutritivos e com menor teor de colesterol. O queijo
13 mussarela é o principal produto processado a partir do leite bubalino cru, entretanto, a
14 presença de bactérias patogênicas podem trazer muitos prejuízos aos consumidores desses
15 alimentos *in natura*. Neste sentido, o objetivo desse estudo foi identificar genotipicamente e
16 caracterizar os fatores de virulência de enterococos isolados de amostras de leite cru de
17 búfalas no sul do Brasil. Setenta e nove bactérias isoladas de leite bubalino foram submetidas
18 a identificação genotípica para confirmação do gênero através da presença ou ausência do
19 gene *tuf* e as espécies foram identificadas por PCR multiplex. Além disso, os enterococos
20 foram avaliados quanto à capacidade de formação de biofilme e análise genotípica dos fatores
21 de virulência *agg*, *ace*, *gelE* e produção da enzima gelatinase. Das setenta e nove amostras
22 testadas, apenas 3 apresentaram resultados discordantes quando comparado as técnicas de
23 identificação fenotípica e genotípica. Entre as espécies encontradas, *E. faecalis* foi a mais
24 frequente entre os isolados, sendo também a que mais abrigou genes de virulência e a que
25 mais teve representantes formadores de biofilme. Dessa forma, *Enterococcus* spp. são

26 patógenos nosocomiais e a sua investigação, faz-se necessária para garantir segurança e
27 qualidade dos alimentos que consumimos.

28 **PALAVRAS-CHAVE:** enterococos, leite bubalino, fatores de virulência, biofilme.

29

30 **INTRODUÇÃO**

31 O leite de búfala possui elevado teor de proteínas e gorduras, baixo teor de colesterol
32 em relação ao leite de animais de outras espécies (Amaral *et al.*, 2005). A partir do leite de
33 búfala, podem-se elaborar diversos tipos produtos como os queijos, requeijão, manteiga,
34 iogurte, entre outros produtos lácteos. O queijo mussarela é o produto principal, sendo a
35 maior parte da produção deste leite destinada à sua fabricação. Assim como na Itália, no
36 Brasil, a mussarela é elaborada a partir do leite cru de búfala com o propósito de não alterar o
37 processo tecnológico, além de garantir as características organolépticas particulares e
38 inerentes ao produto, apesar da importância da pasteurização (Buzi *et al.*, 2009).

39 Bactérias do gênero enterococos têm implicações importantes na indústria de laticínios
40 visto que desempenham um papel significativo no desenvolvimento de características
41 sensoriais durante o amadurecimento e fermentação de muitos produtos lácteos. Entretanto, a
42 segurança dos produtos lácteos contendo enterococos é uma questão que a indústria deve
43 tratar com cuidado antes de prosseguir para sua aplicação (Giraffa, 2003).

44 *Enterococcus* spp. são bactérias ácido lácticas, produtoras de bacteriocinas e estão
45 amplamente distribuídos na natureza, estando presentes em solos, águas, plantas, vegetais e
46 são comumente encontrados no trato gastrointestinal de humanos e animais (Giraffa, 2002;
47 Giraffa, 2003; Pangallo *et al.*, 2004; d'Azevedo *et al.*, 2006; Riboldi *et al.*, 2008; Cassenego
48 *et al.*, 2011). Além disso, microscopicamente são cocos Gram-positivos que se dispõem em

49 pares ou em cadeias curtas, não formadores de esporos. São catalase negativos e toleram
50 condições adversas como altas concentrações de sais, variações de pH e uma ampla faixa de
51 temperatura, inclusive podendo sobreviver as temperaturas de pasteurização do leite (Fisher;
52 Phillips, 2009; Teixeira *et al.*, 2011; McAuley *et al.*, 2012).

53 Os fatores de virulência são determinantes que permitem a bactéria colonizar, invadir,
54 evitar o sistema de defesa e causar dano tecidual ao hospedeiro (Foulquié-Moreno *et al.*,
55 2006). Entre os fatores de virulência amplamente encontrados nesse gênero estão a gelatinase,
56 codificada pelo gene *gelE*; substância de agregação de *Enterococcus*, codificada pelo gene
57 *agg*, adesina de colágeno, codificada por *ace* e a capacidade de formar biofilme (Kayaoglu;
58 Orstavik, 2004; Chuang *et al.*, 2009; Mohamed; Huang, 2007). Quando comparado com outros
59 microorganismos Gram-positivos, os enterococos são pouco virulentos, o que torna o estudo
60 de sua patogenicidade mais complexo (Abriquel *et al.*, 2008; Cariolato *et al.*, 2008). Possuem
61 vantagens adaptativas, como a transferência horizontal de genes, que facilitam o ganho de
62 determinantes de resistência e de virulência, que podem, ser transmitido entre linhagens,
63 tornando-se não raras, às vezes, multirresistentes e o seu manejo clínico complicado (Fisher;
64 Phillips, 2009; Eaton; Gasson, 2001).

65 Entre as espécies de enterococos, *E. faecalis* e *E. faecium* são as mais presentes em
66 contaminação por alimento, sendo a última a que apresenta maior e bem elucidado arsenal de
67 fatores de virulência quando comparado com as demais, possuindo múltiplos determinantes
68 de virulência, o que reforça a evidencia na patogenicidade (Abriquel *et al.*, 2008; Cariolato *et*
69 *al.*, 2008). A presença de enterococos em alimentos pode ser um indicador de contaminação
70 fecal na produção e/ou no processamento dos alimentos e também servem como reservatórios
71 de genes de resistência, que podem se disseminar através da cadeia alimentar, contribuindo
72 para a propagação da resistência aos antibióticos na população humana. Estudos
73 epidemiológicos mostram que pela sua natureza oportunista, os enterococos têm emergido

74 como patógenos associados com infecções nosocomiais (Eaton; Gasson, 2001; Franz *et al.*,
75 2003; Gales *et al.*, 2009; Bender *et al.*, 2009, Lin *et al.*, 2012) o qual pode estar relacionado,
76 em parte, à resistência aos antibióticos e a presença de determinantes de virulência.

77 No Brasil, estudos que avaliam a qualidade microbiológica do leite bubalino ainda são
78 escassos. Nesse cenário, o conhecimento das cepas circulantes, principalmente, em se tratando
79 de alimentos, contribui para o melhor entendimento do comportamento oportunista destes
80 microorganismos na cadeia alimentar. Diante disso, o objetivo desse estudo foi identificar
81 genotipicamente e avaliar os fatores de virulência e capacidade de formação de biofilme *in*
82 *vitro* de enterococos isolados de amostras de leite cru de búfalas no sul do Brasil.

83

84 **MATERIAIS E MÉTODOS**

85 **Isolados de *Enterococcus* spp.**

86 Neste estudo, foram utilizadas 79 bactérias selecionadas e isoladas de quatro amostras
87 de leite bubalino cedidas pela *Cooperativa Sulriograndense de Bubalinocultores Ind. Com.*
88 *Ltda.* no período de junho a agosto de 2012, conforme estudo anterior de Prichula *et al.*, 2013.
89 Os isolados foram preservados em uma solução de 10% (p/v) de *Skim Milk* (Difco) e 10%
90 (v/v) glicerol (Neon Comercial Ltda.), congelados a - 20°C, na bacterioteca do Laboratório de
91 Microbiologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). É
92 importante ressaltar que das 79 bactérias utilizadas nesse estudo, 13,9% (11/79) apresentaram
93 resistência á nitrofurantoína, 12,7% (10/79) à tetraciclina, 1,3% (1/79) ao cloranfenicol, 1,3%
94 (1/79) à estreptomicina, 1,3% (1/79) à norfloxacina e 1,3% (1/79) à eritromicina. Quarenta e
95 sete isolados (59,5%) apresentaram resistência intermediária à norfloxacina, 58,2% (46/79) à
96 ciprofloxacina, 51,9% (41/79) à eritromicina e 6,3% (5/79) à nitrofurantoina, como
97 demonstrado em estudo anterior (Prichula *et al.*, 2013).

98 Os estudos moleculares de confirmação do gênero foram realizados através da reação
99 em cadeia da polimerase (PCR) para ausência ou presença do gene *tuf*, de acordo com os
100 protocolos descritos por Ke *et al.* (1999) e Riboldi *et al.*(2008). A extração do DNA total dos
101 isolados foi realizada através do método de lise química seguindo a técnica descrita por
102 Donato (2007), onde uma colônia do isolado previamente crescida em meio Agar Infusão de
103 Cérebro e Coração (BHI – Difco) foi inoculada em 2 mL de caldo BHI (Difco) por 24 horas a
104 37°C. Posteriormente, 1 mL desse crescimento foi centrifugado por 4 minutos a 14.000 rpm.
105 O sobrenadante foi descartado e o pellet formado na centrifugação foi tratado com 40 µL de
106 solução de lise (contendo NaOH 1M, SDS 10% e TE1X) e incubado em banho seco por 15
107 minutos a 100°C. Após o período de incubação, foi adicionado 460 µL de uma solução de TE
108 1X ao DNA e, em seguida, a solução foi centrifugada a 14.000 rpm por 4 minutos. Por fim, o
109 sobrenadante com o DNA extraído foi armazenado em microtubos de 0,6 mL. A reação da
110 PCR para o gene *tuf* foi realizada em volume total de 25µL, contendo 1µL de DNA molde,
111 1,5 mM de MgCl₂, 10 µM de cada oligonucleotídeo iniciador *tuf*_{Enterococcus}, 200 µM de
112 dNTPs, 1U de *Taq* DNA polimerase, tampão de reação 1X. As condições de PCR para o gene
113 *tuf* foram: desnaturação a 95°C por 3 minutos seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 95°C
114 por 30 segundos, anelamento 54°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos
115 por extensão final a 72°C por 7 minutos.

116 A confirmação das espécies foi realizada por meio da técnica de PCR multiplex,
117 segundo técnica descrita por Nachtigall *et al.* (2013). As sequências dos oligonucleotídeos
118 iniciadores estão descritas na Tabela 1. A reação foi realizada em volume total de 10 µL,
119 contendo 1,0 µL de DNA molde, 1,5 mM de MgCl₂, 10 µM de cada oligonucleotídeo
120 iniciador, 200 µM de cada dNTP, 1U de *Taq* DNA polimerase, 1X tampão de reação. As
121 condições de PCR multiplex foram: desnaturação a 94°C por 5 minutos seguidos de 40 ciclos
122 de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento 50°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1

123 minuto, seguidos por extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram
124 analisados em gel de eletroforese com 1,5% de agarose, corados com solução de brometo de
125 etídio e visualizados sob luz ultravioleta.

126 **Avaliação da capacidade de formação de biofilme**

127 Os isolados foram avaliados quanto a sua capacidade de formação de biofilme
128 conforme protocolo adaptado de Stepanovic *et al.*, (2000). O experimento foi dividido em 3
129 etapas, primeiramente, as bactérias foram previamente inoculadas em placas contendo ágar
130 BHI e incubados 18 horas à 37°C. Após o crescimento, as colônias foram ressuspensas em
131 salina e ajustadas conforme escala de 0,5 de McFarland e 20µL dessa solução foi inoculada
132 em cada poço da microplaca de 96 poços previamente preenchida com 180µL de caldo TSB
133 (Himedia) acrescido de 1% de glicose. Para cada isolado foram utilizados 8 poços da placa de
134 96 poços, desse modo, cada isolado foi analisado 8 vezes quanto à formação de biofilme. A
135 primeira coluna de cada microplaca foi inoculada com *Staphylococcus epidermidis* (ATCC
136 35984), como controle positivo, seguido de um controle negativo contendo somente TSB
137 acrescido de glicose. As placas foram cobertas e incubadas aerobicamente a 37°C durante 24
138 horas. Após o crescimento, foi realizada a lavagem para a retirada das células planctônicas e,
139 posteriormente, a microplaca foi invertida sobre papel absorvente a fim de secar os poços
140 após as lavagens e, na sequência, as placas foram fixadas com 150µL de metanol P.A. durante
141 20 minutos. Passados os 20 minutos, a placa foi invertida e mantida assim por 16 horas. Por
142 fim, a placa foi corada com 150µL de Cristal Violeta 0,5% durante 15 minutos, transcorrido
143 esse tempo o corante foi removido com água corrente. O botão corado foi ressuspensado com
144 150µL de etanol (95%) e mantido em repouso por 30 minutos, após esse tempo foi realizada a
145 quantificação do biofilme. A densidade óptica (D.O) dos biofilmes bacterianos foi
146 quantificada com o auxílio de um leitor espectrofotômetro de microplacas utilizando
147 comprimento de onda de 492 nm.

148 **Análise genotípica da presença de fatores de virulência**

149 Em relação à presença de fatores de virulência foram avaliados os genes *agg*
150 (expressão da proteína de agregação), *ace* (expressão da proteína de adesão do colágeno) e
151 *gelE* (expressão da enzima gelatinase), conforme descrito por Medeiros (2011). As sequências
152 dos oligonucleotídeos iniciadores estão descritas na Tabela 1. A extração do DNA total se deu
153 através do método de lise química seguindo a técnica descrita por Donato (2007). A reação da
154 PCR para os genes *ace*, *agg* e *gelE*, foi realizada em volume total de 25µL, contendo 2µL de
155 DNA molde, 1,5 mM de MgCl₂, 10µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 200 µM de cada
156 dNTP, 1U de Taq DNA polimerase, tampão de reação 1X. As condições de PCR para todos
157 os genes foram: desnaturação a 94°C por 5 minutos seguidos de 30 ciclos de desnaturação a
158 94°C por 1 minuto, anelamento 56°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto, seguidos
159 por extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram analisados em gel de
160 eletroforese com 1,5% de agarose, corados com solução de brometo de etídio e visualizados
161 sob luz ultravioleta.

162 **Deteção da produção da enzima gelatinase**

163 Foi avaliada a produção da enzima gelatinase nas 79 bactérias. As colônias crescidas
164 em placas de meio ágar BHI (Difco), a 37°C por 24 horas, foram inoculadas em tubos
165 contendo 4 mL de BHI caldo (Difco) com gelatina 4% (Labsynth), a 37°C durante 24 horas.
166 Posteriormente, os tubos foram refrigerados a 4°C por 30 minutos. Após esse período, as
167 amostras que apresentaram o meio liquefeito foram consideradas positivas e as demais foram
168 incubadas, novamente, durante 5 dias a 37°C. Por fim, as amostras em que o meio
169 permaneceu sólido foram consideradas negativas para a produção de gelatinase (adaptado de
170 Marra *et al.* 2007).

171 **TABELA 1.** Oligonucleotídeos iniciadores e temperaturas de anelamento utilizadas para
 172 detectar as espécies e os genes de virulência em enterococos isolados de leite de búfalas.

Gene	O.I*	Sequência (5'-3')	Produto (pb) *	TA * (°C)	Referências
<i>tuf</i>	Ent1	TACTGACAAACCATTCATGATG	112	54	Ke <i>et al.</i> (1999)
	Ent2	AACTTCGTCACCAACGCGAAC			
<i>ddl_{E.faecium}</i>	F	TTGAGGCAGACCAGATTGACG	658	54	Cheng <i>et al.</i> (1997)
	R	TATGACAGCGACTCCGATTCC			
<i>ddl_{E.faecalis}</i>	F	ATCAAGTACAGTTAGTCTTAATTA	475	54	Depardieu <i>et al.</i> (2004)
	R	ACGATTCAAAGCTAACTGAATCAGT			
<i>gelE</i>	gelE1	AGTTCATGTCTATTTTCTTCAC	402	56	Mannu <i>et al.</i> (2003)
	gelE2	CTTCATTATTTACACGTTTG			
<i>ace</i>	ACE1	AAAGTAGAATTAGATCCACAC	320	56	Mannu <i>et al.</i> (2003)
	ACE2	TCTATCACATTCGGTTGCG			
<i>agg</i>	TE3	AAGAAAAAGAAGTAGACCAAC	1553	56	Eaton & Gasson (2001)
	TE4	AAACGGCAAGACAAGTAAATA			

173 O.I.: Oligonucleotídeos iniciadores; pb: pares de bases; TA: temperatura de anelamento

174 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

175 **Identificação genotípica dos *Enterococcus* spp.**

176 O presente estudo avaliou 79 *Enterococcus* spp. isolados de leite bubalino que foram
 177 submetidos, em estudo anterior, a testes fisiológicos convencionais para caracterização
 178 fenotípica da espécie e perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos (Prichula *et al.*, 2013).
 179 Dentre esses isolados, 17 foram caracterizados como *E. faecalis* atípicos, 3 foram
 180 caracterizados como *E. faecium* atípicos e 3 amostras não foram identificadas através das
 181 provas bioquímicas conforme Prichula (2013). Em vista disso, o presente estudo,
 182 inicialmente, verificou por meio de ensaios genotípicos, se os 23 isolados pertenciam mesmo
 183 ao gênero *Enterococcus* através da reação em cadeia da polimerase para o gene *tuf*. Por meio
 184 desses ensaios moleculares foi possível confirmar que os 23 isolados pertenciam ao gênero
 185 enterococos.

186 Posteriormente, as 79 bactérias identificadas como pertencentes ao gênero
 187 *Enterococcus* foram submetidos a técnica de PCR multiplex para a confirmação das espécies,
 188 previamente identificadas por provas bioquímicas (Prichula *et al.*, 2013), o resultados estão

189 representados na Tabela 2. Apenas 3 isolados apresentaram resultados discordantes entre as
190 técnicas fenotípicas e as moleculares, o que demonstra que as duas técnicas avaliadas foram
191 complementares e os resultados foram semelhantes em mais de 96% dos isolados
192 investigados. As duas análises são confiáveis, contudo, os ensaios genotípicos são mais
193 rápidos e práticos, além de mais sensíveis quando comparados com as provas bioquímicas.
194 Como demonstram os trabalhos de Knudtson e Hartman (1992) e Moore *et al.* (2006), em que
195 salientam que métodos de identificação que usam ferramentas moleculares permitem uma
196 detecção mais precisa, evitam intervalos longos de incubação da cultura e eliminam resultados
197 fenotípicos ambíguos.

198 De acordo com as características fenotípicas para a caracterização de espécies de
199 *Enterococcus* (Teixeira *et al.*, 2011), dois isolados foram identificados como *E. durans* e um
200 isolado como *E. faecalis* atípico. Contudo pela técnica de reação em cadeia da polimerase
201 essas amostras foram identificadas como *E. faecium*. Como as amostras analisadas eram
202 oriundas de alimentos e a análise fenotípica foi realizada com base no perfil fenotípico de
203 isolados clínicos isso pode justificar, em parte, a discordância entre os resultados fenotípicos e
204 moleculares. Além disso, Jahan *et al.* (2013) cita que os resultados negativos das provas
205 bioquímicas podem ser explicadas a diversidade metabólica dos organismos neste gênero.

206

207 **TABELA 2.** Perfil genotípico e fenotípico dos enterococos isolados de leite de búfalas
208 avaliados neste estudo.

Percentual de enterococos positivos para

GENÓTIPO	FENÓTIPO
----------	----------

Espécie	PCR				Identificação		
	multiplex	<i>gelE</i>	<i>ace</i>	<i>agg</i>	Bioquímica	Gelatinase	Biofilme*
<i>E. faecalis</i>	63,30%	86%	96%	26%	64,56% **	56%	NF= 10% (5/50)
	(50/79)	(43/50)	(48/50)	(13/50)	(51/79)	(28/50)	FR= 6% (3/50) M = 64% (32/50) F= 20% (10/50)
<i>E. faecium</i>	36,70%	17,24%	10,34%	0%	29,11%	0%	NF= 75,9% (22/29)
	(29/79)	(5/29)	(3/29)		(23/79)		M = 10,3% (3/29) F = 13,8% (4/29)
<i>E. durans</i>					2,53% ***		
<i>Enterococcus sp.</i>					3,80% ****		
					(2/79)		
					(3/79)		

209 N.I: não identificados; * Classificação quanto à formação de biofilme: NF: não formador de biofilme; FR: fraco
210 formador de biofilme; M: moderado formador de biofilme; F: forte formador de biofilme. ** um isolado
211 reclassificados como *E. faecium* após a PCR-multiplex; *** Espécies reclassificadas como *E. faecium*
212 após a PCR-multiplex; **** Espécies identificadas como *E. faecium* após a PCR-multiplex

213

214 **Avaliação da capacidade de formação de biofilme**

215 Os setenta e nove isolados foram avaliados também quanto à capacidade de formação
216 de biofilme *in vitro* através da adesão em placas de poliestireno e o resultado está apresentado
217 na Tabela 2. A classificação foi estabelecida de acordo com a densidade óptica, seguindo o
218 padrão demonstrado por Stepanovic, *et al.*, (2000). Entre as espécies, *E. faecium* foi o que
219 apresentou maior porcentagem de não formadores de biofilme 75,9% (22/29), seguido de
220 10,3% (3/29) como moderados formadores, 13,8% (4/29) fortes formadores e não foi
221 observado *E. faecium* fracos formadores de biofilme. Entre os *E. faecalis* a proporção de não
222 formadores foi menor, 10% (5/50), 6% (3/50) fracos formadores, 64% (32/50) moderados e
223 20% (10/50) de fortes formadores.

224 A relevância de biofilmes formados por enterococos é, principalmente, devido a sua
225 resistência à ação dos antibióticos, quando estão em biofilmes (Mohamed *et al.*, 2007). A
226 formação de biofilmes em microrganismos associados a alimentos está principalmente
227 relacionada ao fato de que esses microrganismos podem prender-se em equipamentos de
228 processamento de alimentos tornando-os fontes de contaminação, além de sua maior
229 resistência a sanitizantes (Dewanti & Wong, 1995), tornando-se um problema para indústria.
230 Há poucos relatos na literatura sobre a formação de biofilme por enterococos em alimentos.
231 No entanto, alguns trabalhos que foram publicados sobre a produção de biofilme por
232 *Enterococcus* em alimentos no Brasil (Gomes *et al.*, 2008) corroboram com os resultados
233 encontrados neste estudo. Além de outros trabalhos com *Enterococcus* isolados de infecções e
234 amostras clínicas, onde obtiveram o mesmo resultado deste estudo, com prevalência de *E.*
235 *faecalis* como formador de biofilme quando comparado com outras espécies (Arciola *et al.*,
236 2008).

237 **Análise genotípica da presença de fatores de virulência**

238 Todos os isolados foram analisados por PCR quanto à presença dos genes *gelE*, *ace*,
239 *agg* envolvidos com virulência, os resultados estão apresentados na Tabela 2. Neste trabalho
240 todos os genes de virulência foram mais frequentes em isolados de *E. faecalis*, quando
241 comparados com *E. faecium*, porém o número de amostras de *E. faecium* é muito restrito para
242 uma comparação fidedigna. Entretanto, *E. faecalis* são conhecidos por abrigarem mais genes
243 de virulência do que *E. faecium*, vários estudos tem demonstrado diferenças significativas entre
244 essas duas espécies. Cariolatto *et al.* (2008) e Gomes *et al.* (2008) observaram que enquanto
245 nos isolados de *E. faecalis* há a presença de múltiplos fatores de virulência, o mesmo padrão
246 não é observado em *E. faecium*.

247 O gene *gelE* que codifica uma metaloendopeptidase capaz de degradar compostos
248 como gelatina, caseína e colágeno foi detectado em 86% (43/50) dos *E. faecalis* e 17,24%
249 (5/29) dos *E. faecium*. O gene *ace* que codifica uma adesina de colágeno envolvida com a
250 ligação do *Enterococcus* ao colágeno e dentina foi detectado em 96% (48/50) dos *E. faecalis* e
251 10,34% (3/29) dos *E. faecium*. Já o gene *agg*, que codifica uma substância de agregação que
252 facilita a adesão celular foi encontrado somente nos isolados identificados como *E. faecalis*,
253 na porcentagem de 26% (13/50).

254 Eaton & Gasson (2001) ao analisarem isolados de *Enterococcus* de origem alimentar,
255 clínica e isolados utilizados como culturas *starter*, estabeleceram o gene *agg* somente em
256 linhagens de *E. faecalis* o que corrobora com o presente estudo. Cariolatto (2008) analisou
257 produtos lácteos e encontrou uma incidência de 75% de gene *ace* entre os isolados, sendo este
258 gene somente isolado de *E. faecalis*, neste estudo este gene estava presente em 3 dos 29 *E.*
259 *faecium* analisados. Entre os isolados provenientes de alimentos brasileiros, Gomes *et al.*
260 (2008) também encontraram uma alta prevalência do gene *ace*, cerca de 97%, o que corrobora
261 com o presente estudo, onde pode-se observar a prevalência do gene *ace* entre os isolados de
262 *E. faecalis* em 96% dos casos.

263 Dworniczek e colaboradores (2012) salientam que não há relação clara entre a
264 expressão de *gelE* e produção de biofilme, contudo, neste estudo foi possível observar que os
265 isolados que apresetaram maior incidência do gene *gelE* também apresentaram maior
266 frequência de moderados e fortes formadores de biofilme, como demonstrado na Tabela 2.
267 Outros estudos salientam, também, que a expressão do gene *agg* tem um efeito importante
268 sobre a formação de biofilme, uma vez que este genótipo promove a acumulação de
269 microrganismos aderentes a uma superfície (Schlievert *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2010). O
270 presente estudo mostrou que *agg* foi mais freqüente em cepas produtoras de biofilme, o que
271 pode ter influenciado a ocorrência do fenótipo.

272 Detecção da produção de enzima gelatinase

273 A gelatinase é a expressão do gene *gelE* que é fenotipicamente detectada *in vitro* por
274 liquefacção de um meio de cultura com gelatina (Wang *et al.*, 2011; Tsikrikonis *et al.*, 2012).
275 A presença de gelatinase em *Enterococcus* oriundos de produtos lácteos pode ser explicada
276 pelo fato de que produtos como o queijo são ricos em proteínas, e a produção de gelatinase
277 pode ser um mecanismo de seleção para o crescimento em queijos por permitir que os
278 microrganismos utilizem as proteínas do queijo como fonte de aminoácidos (Franz *et al.*,
279 2001).

280 Todos os 79 isolados foram testado quanto a presença da atividade gelatinolítica,
281 contudo a produção de gelatinase foi encontrada somente entre os isolados *E. faecalis* na
282 frequência de 56% (28/50), como é possível verificar na Tabela 2. A tabela abaixo mostra a
283 relação entre a presença do gene *gelE* e a atividade gelatinolítica entre os isolados deste
284 estudo. De acordo com o estudo de Marra e colaboradores (2007), a presença de *gelE* não
285 está necessariamente correlacionada com o fenótipo de gelatinase

286 **TABELA 3.** Relação entre a presença do gene *gelE* e atividade gelatinolítica dos enterococos
287 isolados de leite de búfalas.

Espécies	gelE-/gelatinase -	gelE+/gelatinase -	gelE+/gelatinase +
<i>E. faecalis</i>	14% (7/50)	30% (15/50)	56% (28/50)
<i>E. faecium</i>	82,76% (24/29)	17,24% (5/29)	0%

288 (-): resultado negativo e (+): resultado positivo

289 A atividade da gelatinase não foi detectada em 30% (15/50) dos *E. faecalis* positivos
290 para o gene *gelE* e em 17,24% (5/29) do *E. faecium*. Isso pode ser justificado por quatro

291 fatores: a) a perda de atividade gelatinolítica em condições de laboratórios (Cariolatto *et al.*,
292 2008; Lopes *et al.*, 2006); b) presença de genes silenciosos que podem tornar-se ativos por
293 condições temporais, como as condições estabelecidas no trato gastrointestinal, o balanço de
294 microrganismos na flora e pelos efeitos do sinergismo bacteriano, bem como a presença e
295 persistência de um número de células viáveis; c) baixos níveis de *down regulation* da
296 expressão gênica; ou, ainda, d) devido a influência de fatores ambientais na expressão da
297 enzima (Eaton & Gasson, 2001).

298 Alguns autores observam que a presença da enzima gelatinase pode afetar a virulência
299 e o processo de formação de biofilmes em *Enterococcus* (Dworniczek *et al.*, 2012). Contudo,
300 outros estudos (Kristich *et al.*, 2008 ; Ballering *et al.*, 2009) demonstram que o gene *gelE* não
301 está associado com a formação de biofilme. No entanto, esse estudo sugere que a expressão da
302 gelatinase pode estar influenciando a formação de biofilme, uma vez que, mais da metade dos
303 *E. faecalis* foram gelatinase positiva (56%) e ao mesmo tempo foram o grupo que
304 apresentaram a maior frequência de isolados moderado (64%) e forte formador de biofilme
305 (20%).

306 Com base na análise dos dados deste estudo, a formação de biofilme em *Enterococcus*
307 spp. não poderia estar ligado a um gene específico. Na verdade, este fenótipo é multifatorial e
308 depende de uma série de genes e fatores extrínsecos que atuam juntos. Até o presente
309 momento, vários outros genes, além dos estudados neste trabalho têm sido relatados como
310 importante na formação de biofilme em *Enterococcus*, o que confirma a complexidade e a
311 natureza multifatorial desta característica (Chuang -Smith *et al.*, 2010; Dworniczek *et al.*,
312 2012). Nos resultados aqui apresentados, *E. faecalis* e *E. faecium* isolados de amostras de leite
313 de búfala mostraram, significativamente, diferentes padrões sobre determinantes de
314 virulência, o que reforça dados encontrados por outros autores (Fisher & Phillips, 2009).

315 Dada a importância crescente dos enterococos como patógenos nosocomiais, ao
316 mesmo tempo em que são usados na indústria de alimentos como culturas *starters* e
317 agregadores de sabor. A investigação desses microrganismos em alimentos bem como a sua
318 caracterização e a identificação de seus fatores de virulência faz-se necessária para garantir a
319 segurança alimentar assim como a qualidade do alimento que consumimos.

320 REFERÊNCIAS

- 321 Abriquel H, Omar NB, Molinos AC, López RL, Grande MJ, Viedma PM, Ortega E,
322 Cañamero MM, Galvez A (2008) Comparative analysis of genetic diversity and incidence of
323 virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and
324 vegetable foods, water and soil, and clinical samples. *International Journal of Food*
325 *Microbiology* 123: 38-49.
- 326 Amaral FR, Carvalho LB, Silva N, Brito JRF (2005) Qualidade do leite de búfalas:
327 composição. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 29, 2: 106-110.
- 328 Arciola CR, Baldassari L, Campoccia D, Creti R, Pirini V, Huebner J (2008) Strong biofilm
329 production, antibiotic multi-resistance and high gelE expression in epidemic clones of
330 *Enterococcus faecalis* from orthopaedic implant infections. *Biomaterials* 29: 580-586.
- 331 Ballering KS, Kristich CJ, Grindle SM, Oromendia A, Beattie DT (2009) Functional
332 genomics of *Enterococcus faecalis*: multiple novel genetic determinants for biofilm formation
333 in the core genome. *J Bacteriol* 191: 2806-2814.
- 334 Bender EA, Freitas ALP, Reiter KC, Lutz L, Barth AL (2009) Identification, antimicrobial
335 resistance and genotypic characterization of *Enterococcus* spp. isolated in Porto Alegre,
336 Brasil. *Brazilian Journal of Microbiology* 40: 693-700.
- 337 Buzi KA, Pinto JPAN, Ramos PRR, Biondi GF (2009) Análise microbiológica e
338 caracterização do queijo mussarela elaborado a partir de leite de búfala. *Ciência e Tecnologia*
339 *de Alimentos* 29, 1: 7-11.
- 340 Cariolato D, Andrighetto C, Lombardi A (2008) Occurrence of virulence factors and
341 antibiotic resistances in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* collected from dairy
342 and human samples in North Italy. *Food Control* 19: 886-892.
- 343 Cassenego APV, d' Azevedo PA, Ribeiro AML, Frazzon J, Van der Sand ST, Frazzon APG
344 (2011) Species distribution and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from
345 broilers infected experimentally with *Eimeria* spp. and fed with diets containing different
346 supplements. *Brazilian Journal of Microbiology* 42, 2: 480-488.
- 347 Cheng S, McCleskey FK, Gress MJ, Petroziello JM, Liu R, Namdari H, Beninga K, Salmen
348 A, DelVecchio VG (1997) A PCR assay for identification of *Enterococcus faecium*. *Journal*
349 *of Clinical Microbiology* 35: 1248-1250.

- 350 Chuang ON, Schlievert PM, Wells CL, Manias DA, Tripp TJ (2009) Multiple functional
351 domains of *Enterococcus faecalis* aggregation substance Asc10 contribute to endocarditis
352 virulence. *Infection and Immunity, Minneapolis* 77: 539-548.
- 353 Chuang-Smith ON, Wells CL, Henry-Stanley MJ, Dunny GM (2010) Acceleration of
354 *Enterococcus faecalis* biofilm formation by aggregation substance expression in an ex vivo
355 model of cardiac valve colonization. *Infect Immun* 5: 12.
- 356 d'Azevedo PA, Dias CAG, Teixeira LM (2006) Genetic diversity and antimicrobial resistance
357 of enterococcal isolates from southern region of Brazil. *Revista do Instituto de Medicina*
358 *Tropical de São Paulo* 48: 11-16.
- 359 Depardieu F, Perichon B, Courvalin P (2004) Detection of the van alphabet and identification
360 of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. *Journal of Clinical*
361 *Microbiology*, 42: 5857-5860.
- 362 Dewanti R, Wong ACL (1995) Influence of culture conditions on biofilm formation by
363 *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology* 26: 147-164.
- 364 Donato ST (2007) Comparação de métodos convencionais e semi-automatizados para
365 identificação de *Enterococcus* spp. frente à Biologia Molecular em identificações
366 discrepantes. Fortaleza, Brasil, 86p. (M.Sc. Dissertation. Faculdade de Medicina,
367 Universidade Federal do Ceará).
- 368 Dworniczek E, Piwowarczyk J, Bania J, Kowalska-krochmal B, Walecka E, Seniuk A, Dolna
369 I, Gosciniak G (2012) *Enterococcus* in wound infections: virulence and antimicrobial
370 resistance. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 59, 2: 263-269.
- 371 Eaton TJ, Gasson MJ (2001) Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and
372 potential for genetic exchange between food and medical samples. *Applied and*
373 *Environmental Microbiology* 67, 4: 1628-1635.
- 374 Fisher K, Phillips C (2009) The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*.
375 *Microbiology, Northampton*, 155: 1749-1757.
- 376 Foulquiè-Moreno MRF, Sarantinopouolos P, Tsakalidou E, Vuyst LD (2006) The role and
377 application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*,
378 *Brussels* 106: 1-24.
- 379 Franz CMAP, Stiles ME, Schleifer KH, Holzapfel, WH (2003) Enterococci in foods – a
380 conundrum for food safety. *International Journal of Microbiology* 88: 105-122.
- 381 Franz CMAP, Muscholl-Silberhorn AB, Yousif NMK, Vancanneyt M, Swings J, Holzapfel
382 WH (2001) Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci
383 isolated from food. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 9: 4385-4389.
- 384 Gales AC, Sader HS, Ribeiro J, Zoccoli C, Barth A, Pignatari AC (2009) Antimicrobial
385 susceptibility of Gram-positive bacteria isolated in Brazilian hospitals: participating in the
386 SENTRY program (2005-2008). *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 13, 2: 90-98.
- 387 Galli D, Lottspeich F, Wirth R (1990) Sequence analysis of *Enterococcus faecalis*
388 aggregation substance encoded by the sex pheromone plasmid pAD1. *Mol Microbiol* 4: 895-
389 904.

- 390 Giraffa G (2002) Enterococcus from foods. Federation of European Microbiological
391 Societies, Microbiology Reviews 26: 163-171.
- 392 Giraffa G (2003) Functionality of enterococci in dairy products. International Journal of Food
393 Microbiology 88: 215-222.
- 394 Gomes BC, Esteves CT, Palazzo ICV, Darini ALC, Felis GE, Sechi LA, Franco BDGM,
395 Martinis ECP (2008) Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from
396 Brazilian foods. Food Microbiology 25: 668-675.
- 397 Jahan M, Krause DO, Holley RA (2013) Antimicrobial resistance of Enterococcus species
398 from meat and fermented meat products isolated by a PCR-based rapid screening method.
399 International Journal of Food Microbiology 163: 89-95.
- 400 Kayaoglu G, Orstavik D (2004) Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to
401 endodontic disease. Crit Rev Oral Biol Med 15, 5: 308-320.
- 402 Ke D, Picard FJ, Martineau F, Menard C, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG (1999)
403 Development of a PCR assay for rapid detection of Enterococci. J. Clin. Microbiol 37, 3497-
404 3503.
- 405 Knudtson LM, Hartman PA (1992) Routine procedures for isolation and identification of
406 enterococci and fecal streptococci. Applied and Environmental Microbiology 58, 3027-3031.
- 407 Kristich CJ, Nguyen VT, Le T, Barnes AM, Grindle SM (2008) Development and use of an
408 efficient system for random mariner transposon mutagenesis to identify novel genetic
409 determinants of biofilm formation in the core *Enterococcus faecalis* genome. Appl Environ
410 Microbiol 74: 3377-3386.
- 411 Lin YT, Hsieh KS, Chen YS, Huang IF, Cheng MF (2012) Infective endocarditis in children
412 without underlying heart disease. Journal of Microbiology, Immunology and Infection XX:
413 1-8.
- 414 Lopes MFS, Simões AP, Tenreiro R, Maeques JJF, Crespo MTB (2006) Activity and
415 expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci. International Journal of Food
416 Microbiology 112: 208-214.
- 417 Mannu L, Paba A, Daga E, Comunian R, Zanetti S, Dupré I, Sechi LA (2003) Comparison of
418 the incidence of the virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus*
419 *faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. International Journal of Food Microbiology
420 88: 291-304.
- 421 Marra A, Dib-Hajj F, Lamb L, Kaczmarek F, Shang W, Beckius G, Milici AJ, Medina I,
422 Gootz TD (2007) Enterococcal virulence determinants may be involved in resistance to
423 clinical therapy. Diagnostic Microbiology 58: 59-65.
- 424 McAuley CM, Gobis KS, Britz ML, Craven HM (2012) Heat resistance of thermotolerant
425 enterococci isolated from milk. International Journal of Food Microbiology 154: 162-168.
- 426 Medeiros AW (2011) Avaliação dos fatores de virulência e a capacidade de formação de
427 biofilme *in vitro* em isolados alimentares e clínicos de *Enterococcus* sp. e utilização de PCR-
428 RFLP para identificação de *Enterococcus casseliflavus* e *Enterococcus gallinarum*. Porto
429 Alegre, Brasil, 113p. (M.Sc. Dissertation. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. UFRGS.

- 430 Mohamed JÁ, Huang DB (2007) Biofilm formation by enterococci. Journal of Medical
431 Microbiology 56, 12: 1581-1588.
- 432 Moore DF, Zhouandai MH, Ferguson DM, McGee C, Mott JB, Stewart JC (2006)
433 Comparison of 16S rRNA sequencing with conventional and commercial phenotypic
434 techniques for identification of enterococci from the marine environment. Journal of Applied
435 Microbiology 100: 1272-1281.
- 436 Nachtigall G, Jesus AG, Zvoboda DA, Santestevan NA, Minotto E, Moura TM, d'Azevedo
437 PA, Frazzon J, Van der Sand ST, Frazzon APG (2013) Diversidade e perfil de
438 susceptibilidade antimicrobiana de *Enterococcus* sp. isolados das águas do Arroio Dilúvio –
439 Porto Alegre, RS, Brasil. Revista Brasileira de Biociências 11, 2: 235-241.
- 440 Pangallo D, Harichová J, Karellová E, Drahovská H, Chovanova K, Ferianc P, Turna J,
441 Timko J (2004) Molecular investigation of enterococci isolated from different environmental
442 sources. Biologia 59, 6: 829-83.
- 443 Prichula J, Zvoboda DA, Pereira RI, Santestevan NA, Medeiros AW, MOTTA AS,
444 d'Azevedo PA, Giordani AR, Frazzon APG (2013) Perfil de suscetibilidade aos
445 antimicrobianos e diversidade das espécies de enterococos isolados de leite cru de búfalas no
446 Sul do Brasil. Revista Brasileira de Ciência Veterinária 20: 104-109.
- 447 Riboldi GP, Mattos EP, Frazzon APG, d'Azevedo PA, Frazzon J (2008) Phenotypic and
448 genotypic heterogeneity of *Enterococcus* species isolated from food in Southern. Brazil.
449 Journal Basic Microbiology 48: 31-37.
- 450 Schlievert PM, Chuang-Smith ON, Peterson ML, Cook LC, Dunny GM (2010) *Enterococcus*
451 *faecalis* endocarditis severity in rabbits is reduced by IgG fabs interfering with aggregation
452 substance. PLoS One 5: e13194.
- 453 Singh KV, Nallapareddy SR, Sillanpaa J, Murray BE (2010) Importance of the collagen
454 adhesin *ace* in pathogenesis and protection against *Enterococcus faecalis* experimental
455 endocarditis. PLoS Pathog 6: e1000716.
- 456 Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M (2000) A modified
457 microtiter-plate test for quantificatin os staphylococcal biofilm formation. Journal os
458 Microbiological Methods 40: 175-179.
- 459 Su YA, Sulavik MC, He P, Makinen KK, Makinen PL, Fiedler S, Wirth R, Clewell DB
460 (1991) Nucleotide sequence of the gelatinase gene (*gelE*) from *Enterococcus faecalis* subsp.
461 liquefaciens. Infect Immun 59: 415-420.
- 462 Teixeira LM, Carvalho MG, Shewmaker PL, Facklam RR (2011) *Enterococcus*. In:
463 Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (10th ed).
464 Manual of Clinical Microbiology, Washington, USA, 350-364.
- 465 Tsikrikonis G, Maniatis AN, Labrou M, Ntokou E, Michail G, Daponte A, Stathopoulos C,
466 Tsakris A, Pournaras S (2012) Differences in biofilm formation and virulence factors between
467 clinical and fecal enterococcal isolates of human and animal origin. Microbial Pathogenesis
468 52: 336-343.
- 469 Wang L, Dong M, Zheng J, Song Q, Yin W, Li J, Niu W (2011) Relationship of Biofilm
470 Formation and *gelE* Gene Expression in *Enterococcus faecalis* recovered from Root Canals
471 in Patients Requiring Endodontic Retreatment. J. Endod 37, 5: 631-636.