

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

GISELE SCHMIDT

ANÁLISE FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *Enterococcus* sp. ISOLADOS DE
FRANGO APÓS SUBCULTURA NO LABORATÓRIO

Porto Alegre
2009

GISELE SCHMIDT

ANÁLISE FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *Enterococcus* sp. ISOLADOS DE
FRANGO APÓS SUBCULTURA NO LABORATÓRIO

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Jeverson Frazzon
Co-orientador: Prof. Dr. Plinho Hertz

Porto Alegre
2009

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Jeverson Frazzon, orientador desta dissertação, e a Prof^a. Dr^a. Ana Paula Guedes Frazzon, por todo empenho, disponibilidade, sabedoria, compreensão e ensinamentos.

A todos os professores do PPGCTA, a Prof^a. Dr^a. Sueli Van Der Sand e ao Prof. Dr. Pedro D´Azevedo pela cooperação.

Aos colegas de mestrado da turma de 2007 pela cooperação e pela amizade.

Aos colegas do laboratório 209N (Cbiot) e 164 (ICBS) pela receptividade, amizade, companheirismo e colaboração; em especial a Rebeca e a Chris pela amizade, dedicação e ajuda na realização dos experimentos.

Aos professores membros da banca examinadora pelas importantes contribuições neste trabalho.

A minha família e ao Ricardo pela compreensão, amor e força para enfrentar mais este desafio.

As minhas amigas que sempre estiveram presentes me aconselhando e incentivando com carinho e dedicação.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução dessa dissertação de Mestrado.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 <i>ENTEROCOCCUS</i> sp.....	14
2.2 ENTEROCOCOS EM ALIMENTOS.....	15
2.2.1 Probióticos	16
2.2.2 Bacteriocinas.....	16
2.2.3 Culturas Iniciadoras (<i>starters</i>)	17
2.3 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA.....	18
2.3.1 Mecanismos de resistência antimicrobiana	18
2.3.1.1 <i>Resistência a β-lactâmicos</i>	20
2.3.1.2 <i>Resistência a aminoglicosídeos</i>	20
2.3.1.3 <i>Resistência a glicopeptídeos</i>	21
2.3.1.4 <i>Resistência à tetraciclina</i>	21
2.3.1.5 <i>Resistência a cloranfenicol</i>	22
2.3.1.6 <i>Resistência a macrolídeos</i>	22
2.3.1.7 <i>Resistência a quinolonas</i>	22
2.3.2 Resistência a desinfetantes e antisépticos	22
2.3.2.1 <i>Resistência a clorexidina</i>	23
2.3.2.2 <i>Resistência ao formaldeído</i>	24
2.3.2.3 <i>Resistência ao triclosan</i>	24
2.3.2.4 <i>Resistência ao hipoclorito de sódio (HS)</i>	24
2.3.2.5 <i>Resistência ao alquilbenzeno linear sulfonado (LAS)</i>	25
2.4 FATORES DE VIRULÊNCIA	25
2.4.1 Gelatinase	26
2.4.1.1 <i>Locus <i>fsr</i></i>	27
2.4.1.2 <i>Ferormônio Ativador da Biossíntese da Gelatinase (GBAP)</i>	28
2.4.2 Proteína de superfície (<i>esp</i>)	29
2.5 <i>ENTEROCOCCUS</i> sp. FORMADORES DE BIOFILME	29
3 OBJETIVOS.....	31
3.1 OBJETIVO GERAL.....	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1 ARTIGO CIENTÍFICO	33
5 CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS	69

LISTA DE ABREVIATÖES

CHX - Clorexidina

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

Esp - proteína de superfície

GBAP - Gelatinase Biosynthesis-activating Pheromone

HS - hipoclorito de sódio

LAB - Bactérias ácido-lácticas

LAS - alquilbenzeno linear sulfonado

pb - pares de base

PBP's - Proteínas de ligação a penicilinas

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

ufc/g - Unidades formadoras de colônia/grama

VRE - Enterococos resistentes a vancomicina

µL - microlitro

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01: Representação esquemática dos genes relacionados com a regulação da gelatinase (*gelE*) e serina-protease (*sprE*), reguladores *fsrA*, *fsrB* e *fsrC* indicando as direções da transcrição. Pa, promotor *fsrA*; Pb, promotor *fsrB*; Pe, promotor *gelE*. 27
- Figura 02: Estrutura de 11 peptídeos da “Gelatinase Biosynthesis-Activating Pheromone” (GBAP). 28
- Figura 03: Diagrama esquemático representativo da ativação do *fsr* e seu efeito na síntese de gelatinase e serina protease. 28

RESUMO

Enterococos são bactérias que exercem um papel muito importante na produção de vários alimentos fermentados e também podem ser usadas como probióticos. A presença e o crescimento de enterococos em alimentos fermentados como queijos e lingüiças conferem a esses produtos características organolépticas únicas. Em contrapartida, sua presença nos alimentos também está associada com falta de higiene durante a manipulação. Estes microrganismos também estão relacionados com o desenvolvimento de algumas doenças, como endocardites, septicemia, infecções do trato geniturinário, entre outras. A presença de características de virulência aumenta o potencial de infecção do microrganismo e a severidade da doença a ele relacionada. Com o objetivo de avaliar possíveis modificações fenotípicas e genotípicas de amostras de enterococos isoladas de frango, durante a subcultura destas cepas no laboratório, várias análises foram realizadas como: a presença dos fatores de virulência; proteína de superfície (*esp*) e gelatinase (*gelE*), do operon *fsr*-regulador do *gelE*, a expressão fenotípica do *gelE*, a capacidade de formação de biofilme e a resistência a antimicrobianos, desinfetantes e antisépticos. Quarenta isolados de *Enterococcus* sp. foram avaliados quanto a presença dos genes *gelE*, *esp*, operon-*fsr*, *sprE* por PCR, a atividade gelatinolítica por testes bioquímicos convencionais, resistência a antimicrobianos, antisépticos e desinfetantes por antibiograma e formação de biofilme pelo método cristal violeta. Todos os testes foram realizados na 1^o geração e na 12^o geração das cepas. 85% dos isolados produziram gelatinase e em 92,5% dos isolados o gene *gelE* estava presente na 1^o geração. A análise do *fsr*-operon destes isolados do primeiro cultivo demonstrou que o gene *fsrA* estava presente em 35 isolados e o *fsrC* em 37 isolados e a presença destes genes pareceu não ter correlação com a atividade gelatinolítica. O gene *fsrB* estava presente em todos os isolados (35) que apresentaram atividade gelatinolítica sugerindo que a presença deste gene é importante na expressão desta enzima. Após o subcultivo, apenas um isolado perdeu a atividade gelatinolítica e 15 perderam o gene *gelE*. Doze isolados perderam pelo menos um gene do *fsr*-operon durante a subcultura, porém nenhum destes perdeu a capacidade de expressar a enzima gelatinase talvez devido à presença do gene *fsrB*. O gene *sprE* foi detectado em 34 isolados na primeira geração e na 12^o geração em apenas 20 isolados. O gene da proteína de superfície de Enterococcus (*Esp*), não foi encontrado em nenhum dos isolados. O antibiograma dos isolados no primeiro cultivo demonstrou que 100% dos isolados foram sensíveis a ampicilina e a gentamicina, 95% sensíveis a vancomicina, 85% a ciprofloxacina, 5% a tetraciclina, 65% a eritromicina e 52,5% a cloranfenicol tanto na 1^o quanto na 12^o geração. Após a subcultura a susceptibilidade dos isolados aumentou a eritromicina (67,5%) e ao cloranfenicol (80%). Quanto ao perfil de resistência aos detergentes e anti-sépticos de uso comercial, todos os isolados apresentaram fenótipo de resistentes ao linear

alquilbenzeno sulfonato (LAS) e ao triclosan durante a subcultura. Todos isolados foram suscetíveis ao formaldeído, mas se tornaram resistentes ao 8,5% hipoclorito de sódio e a clorexidina durante a subcultura. Em geral, todos os isolados foram formadores de biofilme e a produção de gelatinase parece ser necessária para esta formação. O perfil genético não pareceu ter relação com a formação de biofilme. Tanto o perfil genotípico quanto o fenotípico pode sofrer alterações durante a subcultura das cepas no laboratório.

Palavras chave: enterococos, gelatinase, *esp*, biofilme, resistência antimicrobiana.

ABSTRACT

Enterococci are bacteria that have a very important role in the production of various fermented foods and can also be used as probiotics. The presence and growth of enterococci in fermented foods like cheese and sausages bring to these products unique organoleptic characteristics. However, their presence in foods is also associated with lack of hygiene during handling. These microorganisms are also related to the development of some diseases such as endocarditis, septicemia, genitourinary infections, among others. The presence of virulence characteristics increases the potential infection of the organism and severity of disease related to it. The aim of the present study is analyze the possible changes of phenotypic and genotypic of enterococci isolated from chicken, during the subculture of the strains in the laboratory, the presence of virulence factors: enterococcal surface protein (*esp*) and gelatinase (*gelE*), operon-*fsr* *gelE* regulator, *gelE* phenotypic expression, the ability of biofilm formation and antibiotic, disinfectant and antiseptic resistance were determined in samples of enterococci isolated from chicken. The presence of *gelE*, *esp* operon-*fsr* and *sprE* genes were evaluated by PCR, gelatinase activity were observed by conventional biochemical tests, antibiotics resistance, antiseptics and disinfectants resistance were analyzed by standard disk diffusion method and biofilm formation were detected following the crystal violet staining method in forty enterococci isolates from chicken. All tests were performed in the 1st generation and 12th generation. 85% of the isolates produced gelatinase and in 92.5% of the isolated the *gelE* gene was present in the 1st generation. The analysis of operon-*fsr* in the 1st generation of these isolates showed that the *fsrA* gene was present in 35 isolates and *fsrC* gene was present in 37 isolates and the presence of these genes seemed to have no correlation with the gelatinase activity. The *fsrB* gene was present in all isolates (35) with gelatinase activity suggesting that the presence of this gene is important in the expression of this enzyme. After subculture, only one isolate lost the gelatinase activity and 15 isolates lost the *gelE* gene. Twelve isolates lost at least one gene of the operon-*fsr* during laboratory subculture, but none of these isolates lost the ability to express the enzyme gelatinase probably due the presence of the *fsrB* gene. The *sprE* gene was detected in 34 isolates in the 1st generation and in 12th generation only 20 isolates maintained this gene. The protein surface of enterococci gene (Esp), was not found in any isolate. The antibiogram of the isolates showed that 100% of the isolates were susceptible to ampicillin and gentamicin, 95% susceptible to vancomycin, 85% to ciprofloxacin, tetracycline 5%, 65% to erythromycin and 52.5% to chloramphenicol in the 1st generation. After subculture the susceptibility of isolates to erythromycin (67.5%) and chloramphenicol (80%) increased. As the profile of resistance to detergents and antiseptics for commercial use, all isolates showed resistance phenotype of the linear alkylbenzene sulfonate (LAS) and triclosan during subculture. All isolates were susceptible to formaldehyde, but became resistant to 8.5% sodium hypochlorite and chlorhexidine during the subculture. In general, all

isolates were biofilm formers. Gelatinase production appears to be required for biofilm formation. The genetic profile did not appear to have relation with the formation of biofilms. Genotypic and the phenotypic profile may change during the subculture of the strains in the laboratory.

Keywords: enterococci, gelatinase, *esp*, biofilm, antimicrobial resistance.

1 INTRODUÇÃO

Os *Enterococcus* sp. são cocos Gram-positivos comumente encontrados no trato gastrointestinal de seres humanos e de animais, no solo, na água e nos alimentos. Os enterococos correspondem a um grupo de microrganismos conhecidos como bactérias ácido-láticas (LAB) dispostas em cocos, em pares ou em cadeias curtas capazes de crescer sob temperaturas de 10 a 45°C e sobreviver em ambientes com altas concentrações salinas e amplo pH (MURRAY et al., 1998; FACKLAN, SAHM, TEIXEIRA, 1999).

Nos alimentos, os *Enterococcus* sp. podem ser encontrados em carnes, legumes, leite e produtos fermentados como os queijos nos quais, desenvolvem um importante papel no processo de maturação e enriquecimento do sabor. Algumas espécies de enterococos são utilizadas na manufatura de alimentos, porém a falta de conhecimento sobre seus fatores de virulência gera insegurança na utilização de cepas deste gênero como culturas fermentadoras e probióticas (GIRAFFA, 2003; FOULQUIÉ-MORENO et al., 2006).

A sanitização inadequada das superfícies que entram em contato com o alimento como os equipamentos e ambientes de processamento do alimento tem contribuído como fator em surtos alimentares envolvendo *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* e *Enterococcus* sp. A limpeza inapropriada de superfícies promove o crescimento bacteriano e a presença de água contribui para o desenvolvimento de biofilmes bacterianos os quais podem conter microrganismos patogênicos. A contaminação cruzada ocorre principalmente quando o alimento entra em contato com superfícies contaminadas. Um ponto importante ocorre quando as superfícies contaminadas possuem defeitos que impedem a remoção das bactérias, resultando na sobrevivência e formação de biofilmes bacteriano (HOLAH, THORNE, 1990; MAFU et al., 1990; BOWER,; BOULANGE-PETERMAN, BARROUX, BELLON-FONTAINE, 1993; MCGUIRE, DAESCHEL, 1996).

Nos últimos anos os enterococos têm sido associados ao aumento do número e da severidade das infecções nosocomiais e na comunidade incluindo infecções no trato urinário, endocardites e infecções sanguíneas. A resistência intrínseca aos agentes antimicrobianos e alguns fatores de virulência como a agregação de substância, citolisina, proteínas de superfície e enzimas hidrolíticas já foram descritos, porém a resistência dos enterococos permanece pouco esclarecida

(QIN et al., 2000; EATON, GASSON, 2001; GILMORE, PILAR, 2003; POETA et al., 2006).

Dentre estas enzimas hidrolíticas está a gelatinase, uma metaloprotease extracelular que segundo estudos contribui potencialmente como fator de virulência dos *Enterococcus* sp. em modelos animais e em humanos. A gelatinase, codificada pelo gene *gelE*, tem capacidade de hidrolisar colágeno, gelatina e pequenos peptídeos e é aparentemente regulada pela cascata de genes do operon *fsr*, que é composto pelos genes *fsrA*, *fsrB* e *fsrC*, homólogos aos genes *agrA*, *agrB* e *agrC*, respectivamente, do locus *agr* do *Staphylococcus aureus*. Segundo Nakayama et al. (2001), o operon *fsr* é mediado por um peptídeo cíclico denominado Ferormônio Ativador da Biossíntese da Gelatinase (Gelatinase Biosynthesis-activating Pheromone - GBAP) secretado pelos microrganismos e quando ocorre o acúmulo de GBAP no meio extracelular a expressão da gelatinase é desencadeada (QIN et al., 2000; GILMORE, PILAR, 2003; POETA et al., 2006; POETA et al., 2007).

Estudos demonstram que a presença do gene *gelE* não está necessariamente relacionada com fenótipos positivos das cepas de enterococos. Segundo Eaton e Gasson (2001) e Lopes et al. (2006) a atividade gelatinolítica é perdida durante a subcultura do estoque original concordando com Nakayama et al. (2002) que sugere que após 6 gerações as amostras perderiam a capacidade de produção de gelatinase devido a diferentes fatores: i) uma deleção cromossomal de 23,9 kb da região codificadora dos genes *fsr*; ii) ou a mutação dos genes *gelE*, *fsrA*, *fsrB* ou *fsrC*; iii) a uma possível seqüência de terminação rho-independente na região intergênica entre *fsrC* e *gelE*; iv) a presença de duas regiões semelhantes de 7 pares de base (pb) separados por 14 pb nas regiões promotoras do *fsrB* (QIN et al., 2000; EATON, GASSON, 2001; NAKAYAMA et al, 2001; SEMEDO et al., 2003; CRETI et al., 2004; LOPES et al., 2006). Alguns estudos como o de Hancock e Perego (2004) e Arciola et al. (2008) sugerem que a presença do gene *gelE* e a produção de gelatinase estão diretamente relacionados com a capacidade da cepa formar biofilme, porém alguns autores indicam que a capacidade de formação de biofilme dos enterococos é devida a presença de outro fator de virulência dos enterococos, a proteína de superfície de *Enterococcus* (*Esp*). A proteína codificada pelo gene *esp* se liga a superfície da parede celular e cujas variações na estrutura podem contribuir para a capacidade dos enterococos não serem detectados pelo

sistema imunológico em um hospedeiro e permanecer nos sítios de infecção (SHANKAR et al., 1999).

Bactérias capazes de formar biofilme, além de serem mais resistentes a antimicrobianos são mais resistentes a desinfetantes. Existem evidências diretas que os patógenos presentes no biofilme são capazes de disseminar doenças através dos alimentos. Desinfetantes e anti-sépticos são substâncias utilizadas extensivamente na medicina, na agricultura, na produção e sanitização de alimentos para controle de microrganismos. Um fato preocupante é que estas substâncias químicas acabam sendo distribuídas no meio ambiente principalmente através da água utilizada para retirar o excesso destes produtos (BOULANGE-PETERMAN, BARROUX, BELLON-FONTAINE, 1993; BOWER, MCGUIRE, DAESCHEL, 1996). Segundo Beier et al. (2005) a resistência aos desinfetantes pode estar correlacionada à resistência aos antimicrobianos

Com o objetivo de analisar possíveis modificações genotípicas e fenotípicas dos enterococos durante a subcultura das cepas no laboratório, foi observada a presença dos genes *esp* e *gelE* dos genes do operon-*fsr*, a expressão da gelatinase, a capacidade de formação de biofilme e a resistência a antimicrobianos, desinfetantes e antisépticos de amostras de enterococos isoladas de frango.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *ENTEROCOCCUS* sp.

Os enterococos são bactérias anaeróbias facultativas catalase-negativas com temperatura ótima de crescimento de 35°C capazes de crescer em meio contendo 6,5% de NaCl e toleram 40% sais biliares. O gênero *Enterococcus* sp. foi considerado por longo período pertencente ao gênero *Streptococcus* possuidor do antígeno D de Lancefield, inicialmente descritos como “estreptococos de origem fecal”. Após vários estudos sorológicos e técnicas moleculares modernas, o gênero *Streptococcus spp* foi desdobrado em outros três, nomeadamente, *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Streptococcus* devido à grande distância genética existente entre estes grupos. Dessa forma, além da separação do gênero patogênico *Streptococcus* do não patogênico e industrialmente importante *Lactococcus* criou-se o gênero *Enterococcus* o qual incluía inicialmente apenas as espécies *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* (DEVRIESE et al., 1994; MURRAY et al., 1998; FORTINA et al., 2004; INNINGS et al., 2005).

Existem atualmente, mais de 37 espécies reconhecidas de enterococos, porém as espécies *E. faecalis* e *E. faecium* são as mais freqüentemente encontradas devido à ampla distribuição no meio ambiente. Os testes fenotípicos podem ser utilizados para distinguir a maioria das espécies de enterococos, porém a identificação das espécies pelos métodos convencionais é lenta levando em determinados testes cerca de 10 dias de incubação. A aplicação de técnicas moleculares para identificação das espécies de enterococos está se expandindo devido à rapidez dos resultados. A amplificação da região 16S rDNA e análise do polimorfismo do fragmento podem ser utilizadas para a diferenciação de espécies bacterianas como *E. faecalis* e *E. faecium* (DEVRIESE et al., 1994; FACKLAN, 2002; MANERO et al., 2002).

Devido à capacidade desses microrganismos de crescer e sobreviver por longos períodos em condições adversas, existe uma diversidade de nichos onde já foram identificadas cepas de enterococos. Além de ser um microrganismo comensal em humanos, principalmente pela colonização do trato gastrointestinal (TGI) e geniturinário (TGU), os enterococos são encontrados em mamíferos, pássaros, répteis, insetos, bem como disseminados no solo, plantas e água onde normalmente

são considerados contaminantes fecais. Porém, em algumas situações, a relação comensal com o hospedeiro é perturbada podendo causar graves infecções (FACKLAN, 2002).

Na última década, o gênero *Enterococcus* tornou-se um patógeno emergente tanto nas infecções hospitalares como nas adquiridas na comunidade e as principais espécies são *E. faecalis* e *E. faecium*. As infecções por enterococos podem se originar da microbiota normal do paciente, da transferência de microrganismos de paciente para paciente ou da aquisição dos patógenos através do consumo de água ou alimentos contaminados. Segundo Spera e Farber (1994) e Murray et al. (1998) a maioria das infecções por enterococos são de origem endógena o que pode dificultar o tratamento por serem intrinsecamente resistentes a vários antimicrobianos. Os *Enterococcus* sp. tem sido considerado um dos principais agentes causadores de bacteremias (MUNDY, SAHM, GILMORE, 2000; KÜHN, IVERSEN, LAUFS, 2003; MAROTHI, AGNIHOTRI, DUBEY, 2005).

2.2 ENTEROCOCOS EM ALIMENTOS

A distribuição de enterococos na natureza indica seu potencial de adaptação e de crescimento sob diversas condições ambientais bem como em alimentos. Os enterococos são comumente encontrados como contaminantes naturais de alimentos como carnes e legumes. Apesar disso, sua utilização no processamento de alimentos está crescendo devido à contribuição no aumento da vida de prateleira, melhoria da textura e das propriedades organolépticas dos alimentos. Em alguns produtos, principalmente lácteos, os enterococos podem ser utilizados como culturas *starters* e probióticas. Devido à capacidade de algumas cepas de enterococos produzirem bacteriocinas ativas, em alguns tipos de alimentos principalmente por desenvolver um papel no controle de outros microrganismos no setor da indústria alimentar e biomédica estas cepas são introduzidas. Porém, tendo em vista a situação clínica de bacteremias causadas por enterococos à utilização de cepas em alimentos deve ser cautelosa e passar por uma criteriosa avaliação de segurança alimentar (MUNDY, SAHM, GILMORE, 2000; POETA et al., 2006).

Outra fonte de contaminação por enterococos são os animais devido a sua capacidade de formar reservatórios destas bactérias e contribuir assim para a disseminação de cepas resistentes. Os enterococos podem ser adicionados à

alimentação de animais, como probiótico ou promotores de crescimento a fim de reduzir ou controlar o número de bactérias entéricas patogênicas e manter o equilíbrio da microbiota normal e da imunidade dos animais. Enterococos resistentes, já foram isolados de carne de frango expostas ao consumo humano em diversos países (EATON, GASSON, 2001; BECQUET, 2003; GIRAFFA, 2003; MANNU et al., 2003; FOULQUIÉ-MORENO et al., 2006).

2.2.1 Probióticos

Segundo a FAO / WHO (2001) probióticos são microrganismos vivos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro. A sua utilização é uma alternativa para a prevenção ou tratamento de doenças, o que poderia evitar ou, pelo menos, diminuir o uso de drogas antibacterianas comuns (REID et al. 2003).

Algumas características dos microrganismos como aderência aos epitélios e capacidade de formação de biofilme em superfícies mucosas são necessárias para que as bactérias sejam consideradas potencialmente probióticas. Essas características podem desempenhar um papel na prevenção de aderência de bactérias patogênicas (KLEESSEN, BLAUT, 2005) e poderia conferir aos probióticos capacidade de colonizar e se estabelecer no hospedeiro. A atividade antimicrobiana devido à produção de bacteriocinas, ácidos, peróxido de hidrogênio ou outros compostos também é desejável em microrganismos probióticos selecionados para aplicações.

A utilização de bactérias lácticas (LAB) e enterococos como probióticos tem levado a discussão de novos aspectos da segurança, como a natureza do microrganismo e sua capacidade de aquisição e distribuição de genes de resistência. Um fator importante na seleção dos microrganismos para uso probióticos é a investigação da sua capacidade de transferência de genes resistentes (FRAGA et al., 2008).

2.2.2 Bacteriocinas

Nos últimos anos, a utilização de bacteriocinas e probióticos na prevenção ou tratamento de infecções bacterianas está sendo muito discutida. Os enterococos tem a capacidade de produzir bacteriocinas, também chamadas de enterocinas, que

possuem uma expressiva atividade contra bactérias deterioradoras de produtos alimentares ou patogênicas (DE VUYST, FOULQUIÉ-MORENO, REVETS, 2003). Por isso, a aplicação de enterocinas, quer como aditivos alimentares ou por meio da produção *in loco* por um adjuvante da cultura fermentadora durante a fermentação alimentar é promissora (GIRAFFA, OLIVARI, NEVIANI, 2000).

Strompfová e Laukova (2003) demonstraram a capacidade de enterococos isolados de trato gastrointestinal de frangos de produzir bacteriocinas e descreveram algumas propriedades probióticas de cinco isolados de *E. faecium*. Todos os isolados produziram bacteriocinas contra 14 das 20 bactérias isoladas de animais, alimentos ou do meio ambiente. Os *E. faecium* selecionados sobreviveram por mais de 3 h em pH 3.0 e na presença de 1% de bile durante 24 h e foram sensíveis a maioria dos antimicrobianos testados. Entre 1.5% e 9.2% dos isolados testados foram capazes de aderir ao intestino humano e canino. De qualquer forma, a melhor capacidade de adesão foi observada na mucosa canina. Foi realizada a detecção dos genes A e P das enterocinas por PCR em todas as cepas selecionadas. A caracterização das bacteriocinas foi determinada na cepa *E. faecium* EF55. A cepa EF55 produziu bacteriocina (durante a fase logarítmica e fase estacionária) com atividade inibitória frente a maioria das bactérias Gram-positivas (100–51,200 AU/mL) incluindo *Listeria monocytogenes*. O caráter protéico das bacteriocinas foi confirmado (a sua atividade inibitória foi perdida após o tratamento com proteases), e parece ter sido estável após aquecimento (100°C/10 min).

2.2.3 Culturas Iniciadoras (*starters*)

As culturas *starters* são adicionadas aos produtos para assegurar confiabilidade em termos de saúde pública, para que, em um menor tempo de fermentação, obtenha-se um produto final de qualidade e padronizado, com textura, aroma e sabor constantes, e ainda, vida de prateleira prolongada. Os enterococos podem desempenhar esse papel na produção de uma variedade de produtos alimentares fermentados, contribuindo principalmente para o amadurecimento e desenvolvimento de aroma destes produtos. As influências positivas dos enterococos nos alimentos parecem ser o resultado de traços bioquímicos específicos, tais como a atividade proteolítica e lipolítica, a utilização de citrato e a

de produção de compostos orgânicos voláteis aromáticos (DE VUYST, 2000; AMBADOYIANNIS et al., 2004).

Em queijos, os enterococos podem atingir contagens de até 6.8 log ufc/g e desempenhar um importante papel nas características organolépticas durante a maturação (SARANTINOPOULOS, KALANTZOPOULOS, TSAKALIDOU, 2002; PSONI et al., 2006). Porém, sabores de muitos produtos tradicionais são parcialmente derivados de culturas ácido-láticas não-fermentadoras (NSLAB), que não são incluídos na microbiota do fermento, mas desenvolvidas no produto como microbiota secundária particularmente durante o processo de maturação (LEROY, DE VUYST, 2004).

Segundo Yoon, Kim e Hwang (2008) cepas isoladas de Chungkukjang, um alimento fermentado da soja, tradicional da Coreia, possuem propriedades adequadas para sua utilização como culturas *starters*. Além de não apresentarem patogenicidade, as cepas de *E. faecium* testadas demonstraram capacidade de sobrevivência a baixas faixas de pH e tolerância à presença e atividade hidrolítica dos sais biliares.

2.3 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

Devido à ampla distribuição ambiental dos enterococos, estas bactérias podem funcionar como vetores para a propagação de determinantes de resistência antimicrobiana que, através da cadeia alimentar podem ser transferidos para o consumidor. Além disso, estudos demonstram que as bactérias ácidas lácticas são capazes de transferir genes de resistência de patógenos entéricos e de contaminantes alimentares (GEVERS et al., 2003).

2.3.1 Mecanismos de resistência antimicrobiana

As bactérias têm desenvolvido uma variedade de mecanismos para resistir da ação dos antimicrobianos. A resistência dos *Enterococcus* sp. aos antimicrobianos pode ser atribuída à resistência intrínseca das cepas ou a capacidade desse gênero de adquirir resistência a antimicrobianos através de mudanças na permeabilidade da membrana, do aumento das proteínas transportadoras e das enzimas responsáveis pela hidrólise da droga. A combinação sinérgica da penicilina ou a glicopeptídeos

com aminoglicosídeos, mais comumente gentamicina, é o tratamento de escolha de infecções sérias causadas por *E. faecium*. Estudos destacam a resistência de enterococos a aminoglicosídeos, beta-lactâmicos, cloranfenicol, estreptograminas, glicopeptídeos, lincosamidas, monobactâmicos, penicilinas, polimixinas, tetraciclina e vancomicina (DAHLÉN et al., 2000; POETA, ANTUNES, RODRIGUES, 2005).

A resistência intrínseca a alguns antimicrobianos comumente utilizados no tratamento de infecções ocorre devida necessidade do microrganismo de sobreviver e persistir em ambientes altamente competitivos, como o trato gastrointestinal. Os genes responsáveis por este tipo de resistência têm sido identificados em enterococos como parte de elementos genéticos móveis como transposons e plasmídeos capazes de aumentar a transferência genética horizontal. O aumento da frequência de isolamento de *E. faecium* resistentes a gentamicina e vancomicina em hospitais tem sido atribuído a disseminação de elementos genéticos cromossômicos independentes (HANDWERGER, SKOBLE, 1995; MORRISON, WOODFORD, COOKSON, 1997).

Vários relatos indicam que a utilização indiscriminada da avoparcina como promotor de crescimento, aumentou o número de enterococos resistentes à vancomicina, do inglês “vancomycin resistant enterococci” (VRE). Avoparcina é um antibiótico da família dos glicopeptídeos com uma estrutura química análoga à vancomicina. Este antimicrobiano foi muito utilizado na Europa por mais de 50 anos para promover crescimento rápido em criações de frangos e porcos. No entanto ainda não se tem conclusões explícitas sobre a direta relação entre o uso da avoparcina e os VRE. Segundo alguns autores o uso da vancomicina nos hospitais dos Estados Unidos e da avoparcina como promotor de crescimento de animais na Europa são as principais causas dos altos índices de resistência de VRE no mundo (WILLEMS et al., 2001; BONTEN, WILLEMS, WEINSTEIN, 2001).

A crescente importância dos enterococos como patógenos pode ser atribuída, em parte, à sua capacidade natural de adquirir material genético através de plasmídeos e transposons ou por mutação, ou seja, elementos extra cromossômicos que codificam características que permitem a sobrevivência destes microrganismos ou vantagens quanto ao crescimento em ambientes não usuais ou estressantes. Devido a estas características começaram a surgir um grande número de linhagens de enterococos multi-resistentes (MUNDY, SAHM, GILMORE, 2000; TEIXEIRA et al., 2001).

A probabilidade exata com que esta transferência ocorre, bem como as consequências biológicas e econômicas da entrada, fixação e dispersão destas resistências na população humana são atualmente matérias de grande enfoque científico e social, devidamente consideradas por órgãos nacionais e internacionais (EEDE, et al., 2004).

2.3.1.1 Resistência a β -lactâmicos

Dois mecanismos de resistência bacteriana a β -lactâmicos em *E. faecalis* já foram descritos; um é a produção de β -lactamase, enzima capaz de hidrolisar os antimicrobianos β -lactâmicos e o outro é a baixa afinidade de proteínas de ligação a penicilinas (PBPs) com estes agentes antimicrobianos (FONTANA et al., 1996; ONO, MURATANI, MATSUMOTO, 2005). Dentre os β -lactâmicos a resistência a ampicilina e imipenen já foram estudadas. O aumento da resistência a ampicilina em enterococos é atribuído tanto a produção de β -lactamase quanto a alterações na expressão e estrutura das PBP 4 e 5, a produção de β -lactamases tem sido descrita em *E. faecalis* e atribuída na maioria dos casos a aquisição do operon da β -lactamase de *S. aureus*. Porém a produção de β -lactamases ocorre em baixos níveis em enterococos indicando que a resistência aos β -lactâmicos está diretamente relacionada às PBP's.

2.3.1.2 Resistência a aminoglicosídeos

Estudos têm demonstrado altos índices de isolados de *E. faecalis* resistentes a aminoglicosídeos principalmente a gentamicina. Os determinantes genéticos codificadores das enzimas modificadoras de aminoglicosídeos responsáveis pelo alto índice de resistência a gentamicina (MIC > 2,000 μ g/ml) são mediados pela transferência plasmidial. Os aminoglicosídeos exercem seu efeito antimicrobiano interferindo na síntese de proteínas pela ligação a porção 16S rRNA da subunidade ribossomal 30S. A resistência a gentamicina ocorre devido à presença de genes codificadores de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos que podem ser acetiltransferases, fosfotransferases e nucleotidiltransferases. O gene *acc(6')-Ie-aph(2'')-Ia* codifica a enzima bifuncional que possui atividades de acetilação e fosforilação da molécula do antibiótico. Os genes *aph(2'')-Ib* e *aph(2'')-Id* codificam

uma fosfotransferase responsável pelo elevado nível de resistência a gentamicina, tobramicina, canamicina e netilmicina (HERNÁNDEZ, 1998).

2.3.1.3 Resistência a glicopeptídeos

Os glicopeptídeos inibem a síntese da parede celular de bactérias sensíveis através de sua ligação de alta afinidade a extremidade terminal da D-alanil-D-alanina de unidades precursoras da parede celular. A resistência dos enterococos a teicoplanina e vancomicina está relacionada à presença do gene *vanA* que normalmente é adquirido através do transposon Tn1546 ou Tn3 (ARHTUR et al., 1993). A presença do gene *vanB* está relacionado a resistência de vancomicina porém não de teicoplanina estando normalmente localizado no cromossomo bacteriano ou carregado por plasmídeos (REMONATTO et al., 2005). Algumas cepas que possuem o gene *vanA* são capazes de transferir resistência por conjugação a teicoplanina outras não transferem resistência por conjugação porém são resistentes a teicoplanina. A transferência de resistência foi recentemente observada em *E. faecalis* e *E. faecium*.

2.3.1.4 Resistência à tetraciclina

Devido ao emprego de tetraciclina na dieta de animais como promotor de crescimento, a resistência à tetraciclina é a resistência mais prevalente em *Enterococcus* sp. A tetraciclina é um antibiótico bacteriostático que atua inibindo a síntese de proteínas agindo na região 16S RNA ribossomal (RNAr). A resistência a esta droga ocorre devido à limitação do excesso do antimicrobiano ao seu alvo que pode ser através do mecanismo de efluxo presente na membrana celular, por alteração ribossomal que dificulta uma ligação efetiva do antimicrobiano ao alvo ou pela produção de enzimas que inativam a tetraciclina (ZHANEL et al., 2004).

2.3.1.5 Resistência a cloranfenicol

O cloranfenicol atua inibindo a síntese de proteínas nas bactérias através de uma ligação reversível a subunidade ribossômica 50S. Na maioria dos enterococos, a resistência é mediada pela presença do gene *cat*, que pode ser encontrado no cromossomo ou em plasmídeos e codifica uma acetiltransferase, a qual tem função de alterar estrutura do antimicrobiano fazendo com que este perca a capacidade de ligação a porção ribossomal (LAZO et al., 2006).

2.3.1.6 Resistência a macrolídeos

A eritromicina é o principal representante desta classe de antimicrobianos bacteriostáticos que inibem a síntese de proteínas através de sua ligação reversíveis a subunidades ribossômicas 50S. Para os enterococos, o principal mecanismo de resistência aos macrolídeos é a alteração do sitio de ligação conferida pela enzima que metila um resíduo de adenina na porção 23S da subunidade 50S do RNA ribossomal, dificultando a ligação do antimicrobiano ao ribossomo. Este mecanismo é mediado pelo gene *erm(B)* e pelo *erm(A)* (LAZO et al., 2006).

2.3.1.7 Resistência a quinolonas

O alvo destes antimicrobianos (ciprofloxacina, ácido nalidíxico, norfloxacino) é a DNA-girase (Gram-negativas) e topoisomerase IV bacterianas (Gram-positivas). A atividade da ciprofloxacina contra enterococos é moderada e a resistência a estes antimicrobianos é comum. O mecanismo de resistência ocorre basicamente por mutações nas regiões *parC* e *gyrA* do DNA bacteriano (KOLAR et al., 2006).

2.3.2 Resistência a desinfetantes e antisépticos

Antisépticos e desinfetantes são utilizados de forma extensiva como prevenção e controle de infecções, principalmente nosocomiais. Nos últimos anos, um aumento na utilização destes produtos como prevenção de infecções derivadas de alimentos tem sido relatado. A ineficácia na remoção das bactérias das superfícies contaminadas pode causar sérias implicações na transmissão de doenças provenientes de alimentos principalmente por contaminação cruzada que

pode ocorrer pelo contato com mãos, superfícies e outros alimentos contaminados (GORMAN et al., 2002).

Inúmeros agentes ativos ou biocidas são utilizados nestes produtos e muitos deles são utilizados a mais de cem anos. Os biocidas têm um grande espectro de atividade e múltiplos sítios de ação enquanto os antimicrobianos têm normalmente um único sítio. A utilização indiscriminada de produtos antisépticos e desinfetantes tem sido alvo de especulação sobre o desenvolvimento de resistência microbiana em particular resistência cruzada com antimicrobianos. A resistência aos biocidas pode ser intrínseca ou adquirida por mutação ou aquisição de plasmídeos ou transposons.

Nos últimos anos tem sido observada a aquisição da resistência a biocidas pelos enterococos. Devido a sua possível presença como contaminante alimentar, os enterococos podem servir como reservatório de genes de resistência e transferir os genes por conjugação, a bactérias suscetíveis conferindo-as resistência (BLOCK, 1991; MCDONNELL, RUSSEL, 1999).

2.3.2.1 Resistência a clorexidina

A clorexidina (CHX) é o biocida do grupo biguanida muito utilizado em produtos antisépticos devido a sua ação desinfetante e preservativa, principalmente em produtos de uso oral e sabonetes. A CHX é um agente antimicrobiano de amplo espectro que em baixas concentrações afeta a integridade da membrana, causando extravasamento do citoplasma alterando o equilíbrio osmótico da bactéria e em altas concentrações causa precipitação de proteínas e ácidos nucleicos. CHX tem eficácia antibacteriana comparada ao hipoclorito de sódio e tem sido relatado como antiséptico efetivo em terapia endodôntica. Além disso, a CHX tem atividade contra espécies resistentes a hidróxido de cálcio. Segundo Basrani et al. (2003), CHX inibe *in vitro* o crescimento de *E. faecalis*. O mecanismo de resistência a clorexidina em bactérias Gram-positivas está relacionado ao glicocálice e mucoexopolissacarídeo que reduzem a difusão do antiséptico (DELANY et al., 1982; KOLAWOLE, 1984; JEANSONNE, WHITE, 1994).

2.3.2.2 Resistência ao formaldeído

O formol ou formaldeído é um composto líquido claro com várias aplicações, sendo usado normalmente como preservativo, desinfetante e antiséptico. O formaldeído é extremamente reativo quimicamente e seu mecanismo de ação está relacionado à sua capacidade de interação com proteínas, DNA e RNA, porém o mecanismo e o sitio de ação do formaldeído ainda não é completamente conhecido. O possível mecanismo de resistência ao formaldeído é plasmidial que codifica a inativação da enzima formaldeído desidrogenase e/ou alterações nas proteínas da membrana externa da superfície celular (FRAENKEL-CONRAT, OLCOTT, 1946; KAULFERS, KARCH, LAUFS, 1987; KAULFERS, MASQUARDT, 1991; MCDONNELL, RUSSEL, 1999).

2.3.2.3 Resistência ao triclosan

Triclosan exibe atividade antimicrobiana principalmente frente a bactérias Gram-positivas. Alguns estudos têm demonstrado também atividade antiinflamatória. O mecanismo de ação do triclosan ocorre na síntese dos ácidos graxos inibindo a enzima enol redutase (proteína, FabI) agindo como potente inibidor irreversível e esta inibição tem sido descrita como lenta e competitiva. A resistência ao triclosan vem sendo associada à transferência plasmidial e recentemente a alterações no gene *fabI*. Recentemente, isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes a clorexidina e a meticilina (MRSA) vem sendo associados ao aumento dos níveis de resistência ao triclosan sugerindo correlação da resistência entre desinfetantes e antimicrobianos através da transferência de resistência entre as cepas (COOKSON, et al., 1992; BARKVOLL, ROLLA, 1994; AL-DOORI et al., 2003).

2.3.2.4 Resistência ao hipoclorito de sódio (HS)

O hipoclorito de sódio (HS) é amplamente utilizado para a desinfecção de superfícies contaminadas por bactérias, fungos e vírus. O mecanismo de ação do HS ainda não é completamente entendido, mas segundo alguns autores o efeito deletério do HS ocorre no DNA bacteriano envolvendo a formação dos derivados clorados das bases nucleotídicas, assim a atividade celular das proteínas é

diminuída. A resistência bacteriana ao HS ocorre primeiramente devido a transferência limitada do HS para o alvo intracelular devido a mudanças na permeabilidade da membrana celular, acúmulo de exopolímeros na superfície da célula bacteriana e/ou formação de agregados. A presença dos plasmídeos de virulência ColV aumenta a capacidade dos microrganismos de sintetizar polissacarídeos o que além de aumentar o poder de ataque dos microrganismos os protege da ação do HS (DENNIS, OLIVIERI, KRUSE, 1979; BAYLISS, WAITES, KING, 1981; HICKS, et al., 1986; ANDERSON et al., 1990; DYCHDALA, 1991).

2.3.2.5 Resistência ao alquilbenzeno linear sulfonado (LAS)

O alquilbenzeno linear sulfonado (LAS) é um detergente sintético muito utilizado, pois pode sofrer degradação. A degradação molecular deste surfactante aniônico ocorre devida sua estrutura química, grupos de sulfonato hidrofílicos aniônicos e as cadeias hidrofóbicas de alquil. Todavia, a velocidade e o grau com que esse fenômeno ocorre estão relacionados com o meio no qual o tensoativo se encontra e com os microrganismos nele existentes. Esses microrganismos promovem, seqüencialmente, a oxidação da cadeia alquídica, a dissulfonação, oxidação e ruptura do anel aromático. O mecanismo de ação do LAS ocorre pela perturbação da integridade da membrana celular. Segundo estudos, o mecanismo de resistência ao LAS das bactérias ocorre devido à utilização do enxofre da molécula de LAS sob condições limitadas deste elemento o que conseqüentemente modifica a estrutura molecular do principio ativo impedindo a sua ação (SCHWUGER, BARTNIK, 1980; LIE et al., 1996; DENGGER, COOK, 1999; ELSGAARD, PETERSEN, DEBOSZ, 2001; SANZ et al. 2003).

2.4 FATORES DE VIRULÊNCIA

A presença de fatores de virulência permite a adesão das bactérias às superfícies epiteliais, a evasão à resposta imunitária, a aquisição de nutrientes e a disseminação em locais extra-intestinais de infecção conduzindo assim certas estirpes de *Enterococcus* sp. a apresentarem maior capacidade de causar doença. Os fatores que contribuem para a patogenicidade dos *Enterococcus* incluem citolisina, substância de agregação, adesinas e proteases as quais, além de fornecer

nutrientes ao microrganismo, desempenham um importante papel na sistemática da doença nos mamíferos. A gelatinase e a serina-protease são as duas proteases já descritas em linhagens de *Enterococcus* sp. (POETA et al., 2006).

2.4.1 Gelatinase

O gene *gelE* codifica uma metaloendopeptidase extracelular também chamada de gelatinase, que é uma enzima capaz de hidrolisar gelatina, colágeno, caseína, hemoglobina e outros compostos bioativos. O gene *gelE* apresenta homologia a *S. aureus*. A gelatinase tem sido considerada interferente do sistema imune, impedindo a inativação de peptídeos bacterianos LL-37 e ação de defensinas. Recentemente, a gelatinase demonstrou ser relevante para a translocação *in vitro* do *E. faecalis* pelas células T84 humanas (SCHMIDTCHEN et al., 2002; VERGIS et al., 2002; ZENG, TENG, MURRAY, 2005).

Eaton e Gasson (2001) pesquisaram os fatores de virulência gelatinase em três tipos de enterococos incluindo isolados clínicos humanos, enterococos utilizados como cultura *starters* e enterococos utilizados como probióticos em alimentos. Em algumas cepas, tanto isoladas de materiais clínicos e de alimentos, o gene *gelE* estava presente, porém não apresentava atividade gelatinolítica. Segundo os autores, isto se deve ao fato do gene *gelE* necessitar de determinados fatores ambientais para expressar a atividade gelatinolítica como o ambiente do trato gastrointestinal, o equilíbrio da microbiota intestinal e efeitos de sinergismo bacteriano, assim como, a presença e persistência de um grande número de enterococos viáveis (EATON & GASSON, 2001). No entanto, segundo o estudo de Qin et al. (2000), o gene *gelE* de *E. faecalis* possui genes reguladores denominados operon-*fsr* (*fsrA*, *fsrB* e *fsrC*) semelhantes aos genes do sistema *agr* do *S. aureus* e segundo os autores, a presença do gene porém sem expressão se deve a mutações no operon-*fsr*. Qin et al. (2000) também descreve que a conservação de duas seqüências repetidas de 7 pb (ACFRCDRE) separadas por 14 bp nas regiões promotoras dos genes Pb (*fsrB*) e Pe (*gelE*) é necessária para a expressão fenotípica da gelatinase.

2.4.1.1 Locus *fsr*

Os genes *fsrA*, *fsrB*, *fsrC* regulam positivamente a expressão do gene *gelE* e *sprE* (serina protease) e estão localizados “up-stream” ao gene *gelE* (FIGURA 01). A ausência destes genes ou a presença de uma mutação em um ou mais destes três genes, pode comprometer a expressão da gelatinase (QIN et al., 2000).

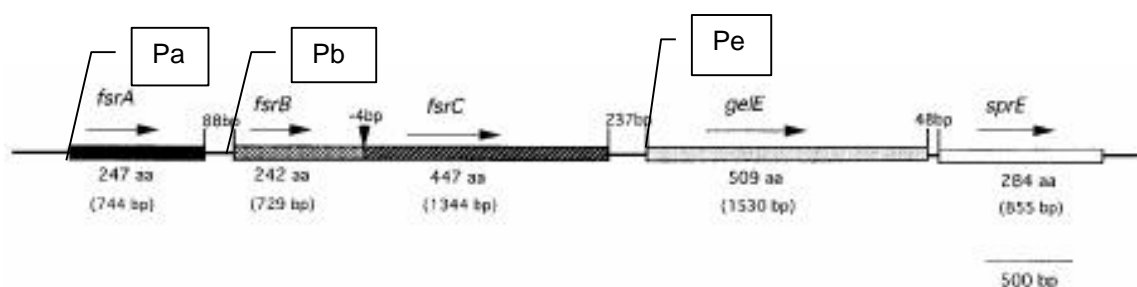


Figura 01: Representação esquemática dos genes relacionados com a regulação da gelatinase (*gelE*) e serina-protease (*sprE*), reguladores *fsrA*, *fsrB* e *fsrC* indicando as direções da transcrição. Pa, promotor *fsrA*; Pb, promotor *fsrB*; Pe, promotor *gelE*.
Fonte: Qin et al. (2000).

A presença do locus *fsr* e da gelatinase aumentam o poder de *E. faecalis* causar infecções em modelos animais, porém eles não são necessários para causar a doença. Em isolados de *E. faecalis*, a presença de mutações no operon-*fsr* e no gene *gelE* atenuaram periodontites em ratos, infecções em modelos como os nemátodos *Caenorhabditis elegans* e plantas *Arabidopsis thaliana*, endoftalmite em coelhos e mais recentemente endocardites humanas (QIN et al., 2000; MYLONAKIS et al., 2002; SIFRI et al., 2002; ENGELBERT et al., 2004; JHA, BAIS, VIVANCO, 2005; SINGH et al., 2005; MAADANI et al., 2007).

Segundo Pillai et al. (2002), o locus *fsr* estava presente em 100% dos 12 *E. faecalis* isolados de endocardites. Nakayama et al. (2002) relataram que uma deleção cromossômica de 23,9 Kb envolvendo o locus *fsr* era comumente encontrada em bactérias isoladas de urina e esta deleção foi encontrada na maioria de amostras gelatinase negativa. Roberts et al. (2004) compararam amostras de *E. faecalis* isoladas de pacientes com endocardites, infecções do trato urinário ou infecções sanguíneas com outras amostras isoladas de fezes de voluntários saudáveis, com relação à presença de *fsr* e produção de gelatinase. A maioria das bactérias gelatinase-negativa continha a deleção de 23,9 Kb descrita e faltavam *fsrA* e *fsrB*. Porém, segundo Roberts et al. (2004) há obrigatoriedade de que os loci dos genes *fsr* e *gelE* sejam intactos para a produção de gelatinase.

2.4.1.2 Ferormônio ativador da biosíntese da gelatinase (GBAP)

Segundo Nakayama et al. (2001), o sistema *FsrABC* é mediado por um peptídeo cíclico denominado ferormônio ativador da biosíntese da gelatinase (GBAP). O GBAP é secretado pelas células e quando a concentração extracelular de GBAP aumenta, a produção das proteases é desencadeada. GBAP é um resíduo de 11-peptídios que contém um anel lactona na carboxila e a região C-terminal está ligada ao grupo hidroxila da serina no terceiro resíduo como representado na Figura 02.

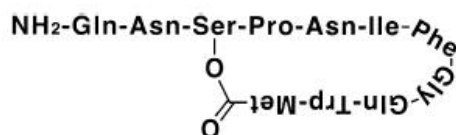


Figura 02: Estrutura de 11 peptídeos da “Gelatinase Biosynthesis-Activating Pheromone” (GBAP).

Fonte: Nakayama et al. (2001).

A sequência aminoacídica do GBAP corresponde à porção C-terminal de 242-resíduos da proteína codificados pelo gene *fsrB*. Isto sugere que o sinal de GBAP é traduzido por dois componentes do sistema regulatório que compreende a proteína histidina-quinase (*fsrC*) e o regulador da resposta (*fsrA*) (NAKAYAMA et al., 2001). A Figura 03 ilustra a ativação do operon-*fsr* e seu efeito na síntese de gelatinase e serina protease.

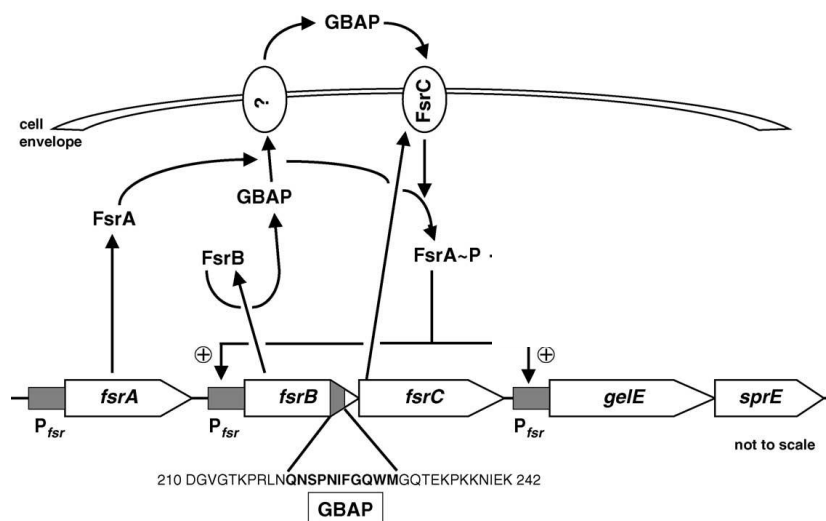


Figura 03 - Diagrama esquemático representativo da ativação do operon-*fsr* e seu efeito na síntese de gelatinase e serina protease.

Fonte: Podbielski & Kreikemeyer, 2004.

O produto do gene *fsrB* de 11 aminoácidos na região C-terminal, denominado GBAP, é secretado e sai da célula utilizando uma membrana de passagem ainda não conhecida. Quando a concentração de GBAP acumulado fora da célula alcança níveis por volta de 1 nM, o GBAP interage com a histidina quinase FsrC que está associada a membrana. A associação do GBAP ao FsrC é responsável pela fosforilação do FsrA. O FsrA fosforilado autoregula a transcrição do operon-*fsrBC* regulando positivamente a expressão tanto da gelatinase como da serina protease (NAKAYAMA et al., 2001; PODBIELSKI & KREIKEMEYER, 2004).

2.4.2 Proteína de superfície de enterococos (Esp)

A proteína de superfície de enterococos (Esp) codificada pelo gene *esp* tem sido encontrada na maioria dos enterococos responsáveis por infecções. Acredita-se que Esp está envolvido na invasão da imunidade, na formação de biofilme e na adesão das células. Estudos recentes têm indicado que a região N-terminal do Esp está envolvida com a formação de biofilme, porém outros estudos demonstram que a formação de biofilme é independente do Esp. A presença do Esp contribui para a colonização e persistência no trato urinário de modelos animais e às infecções em pacientes transplantados. Recentemente demonstrou-se que Esp faz parte da ilha de patogenicidade do *E. faecalis*. A proteína Esp apresenta homologia estrutural e similaridade as proteínas alfa C envolvidas na letalidade e invasão da imunidade, a proteína R28 de *Staphylococcus pyogenes* capaz de clivar células humanas *in vitro* e a proteína Bap associada à formação de biofilme em *Staphylococcus epidermidis* (SHANKAR et al, 1999; STALHAMMAR-CARLEMALM et al., 1999; CUCARELLA et al., 2001; WAAR et al., 2002).

2.5 ENTEROCOCCUS sp. FORMADORES DE BIOFILME

A formação de biofilme está diretamente relacionada a muitas doenças bacterianas incluindo endocardites, osteomelites, cáries dentais e infecções auriculares. O estabelecimento do biofilme é capaz de tolerar altas concentrações de agentes antimicrobianos o que os torna extremamente difíceis de serem erradicados. Os biofilmes relacionados às infecções capazes de responder ao tratamento terapêutico de antibióticos podem levar semanas ou até meses, muitas vezes

necessitando de remoção cirúrgica. A formação de biofilme tem aumentado a resistência a agentes antimicrobianos e estão diretamente relacionadas com infecções envolvendo cateteres em hospitais e, na indústria alimentar a aderência dos enterococos aos equipamentos tem como consequência a contaminação dos alimentos. Estudos recentes sobre a formação de biofilme bacteriano têm relacionado à presença de fatores genéticos a capacidade de formação do biofilme. Em *E. faecalis*, alguns fatores tem sido associados com o desenvolvimento do biofilme como as proteínas BopD, o quorum-sensing locus *fsr*, a heterogenicidade das cargas da superfície e a metaloprotease GeI (STALHAMMAR-CARLEMALM et al., 1999; WILLEMS et al., 2001).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi analisar possíveis modificações genóticas e fenotípicas de *Enterococcus* sp. isolados de frangos durante a subcultura no laboratório.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Análise das linhagens quanto à produção de gelatinase por métodos bioquímicos convencionais;
- Detecção por PCR com “primers” específicos para os genes dos fatores de virulência *esp* e *gelE* e dos genes do operon-*fsr* e *sprE* ;
- Correlação entre a presença do gene *gelE* e do operon-*fsr* com a atividade gelatinolítica;
- Verificar variações genotípica dos genes *gelE*, *esp*, *sprE* e do operon-*fsr* durante a subcultura das cepas em laboratório entre a 1^o e 12^o geração;
- Verificar variações fenotípicas de atividade de gelatinase, perfil de resistência a antibiótico, desinfetante e antisépticos entre a 1^o e 12^o geração;
- Determinar a capacidade de formação de biofilme das cepas de *Enterococcus* sp. isoladas de frango na 1^o e 12^o geração;
- Relacionar a capacidade de formação de biofilme ao perfil genotípico e fenotípico dos isoaldos entre a 1^o e 12^o geração.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A seção de materiais e métodos e a seção de resultados e discussões serão apresentadas a seguir em forma de artigo científico. O artigo científico “Phenotypic and genotypic and analysis after laboratory subculture of *Enterococcus* sp. isolated from chicken” será submetido à publicação no periódico *Food Control*. Este artigo apresenta os procedimentos utilizados para detectar a atividade gelatinolítica, a presença dos genes de virulência *esp* e *gelE* bem como os genes *sprE* e o operon-*fsr* regulador, o perfil de resistência a antimicrobianos, desinfetantes e anti-sépticos e a capacidade de formação de biofilme.

4.1 ARTIGO CIENTÍFICO

Phenotypic and genotypic analysis after laboratory subculture of *Enterococcus* sp. isolated from chicken

Gisele Schmidt¹, Rebeca Inhoque Pereira³, Ana Paula Guedes Frazzon³, Jeverson Frazzon² *

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

²Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos

³Departamento de Microbiologia, UFRGS

* Correspondence and reprints:

Dr. Jeverson Frazzon

jeverson.frazzon@ufrgs.br

Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos - ICTA/Campus do Vale - UFRGS

Bento Gonçalves, 9500 – Prédio 43212 – Lab.205

PO Box: 15005 - Porto Alegre/RS - Brazil

Phone: +55 51 3308 6072

Fax: 55 51 3308 7309

1 ABSTRACT

2 Virulence-related phenotypes (biofilm and gelatinase production), genotypes (*gelE*,
3 *esp*, *fsr*-operon, *sprE*), antibiotic, disinfectant and antiseptic resistance and
4 subculturing effects of 40 enterococci isolated from chicken were studied. Thirty-four
5 of the isolates produced gelatinase even when *gelE* were absent. Yet, *fsrB* gene was
6 present in all gelatinase producing isolates. No isolates carried *esp* gene. All strains
7 produce biofilm and gelatinase appears to be required for biofilm formation. However,
8 neither genes (*gelE*, *esp*), operon-*fsr* nor *sprE* seemed to be correlated with biofilm
9 formation. Gelatinase activity, *gelE*, *sprE*, *fsrA* and *fsrC* genes and disinfectant and
10 antibiotic resistance could be lost during laboratory subculturing.

11 Keywords: enterococci, biofilm, virulence

12 INTRODUCTION

13 Enterococci have a long history of use by the food industry as starter cultures,
14 probiotic and growth promoters (Franz et al., Muscholl-Silberhorn, Yousif,
15 Vancanneyt, Swings & Holzapfel, 2001; Kayser, 2003). However, enterococci have
16 also been involved in food spoilage (Giraffa, 2002), food poisoning (Saavedra,
17 Taranto, Sesma & Valdez, 2003), nosocomial infections (Abriouel, Omar & Molinos,
18 2008) and in the spread of antibiotic resistance through the food chain (McDonnell &
19 Russell, 1999), which raises significant safety concerns. Studies reported that
20 enterococci strains isolated from foods were resistant to antibiotics and presented
21 virulence genes (Saavedra et al., 2003; Jurkovic et al., 2006). Antibiotic resistance is
22 transmissible by plasmids and virulence genes can be easily exchanged between
23 strains through conjugation. The widespread use of antiseptic and disinfectant
24 products has prompted speculation about the development of microbial resistance,
25 particularly cross-resistance to antibiotics. The most significant resistance

26 mechanism is the protective effects of biofilm that allow microorganisms to survive in
27 the presence of an active agent (Eaton & Gasson, 2001; Hancock & Perego, 2004;
28 Semedo, Santos, Lopes, Figueiredo, Barreto & Tenreiro, 2003). Bacterial virulence is
29 one of many adaptive responses generally believed to be controlled through signal
30 transduction mechanisms. The operon-*fsr* is a regulatory locus required for the
31 production of gelatinase and serine protease, and control of *gelE* and *sprE* gene
32 activity that may be involved in, or responsible for, biofilm formation (Christensen et
33 al., 1985). *Fsr*-operon genes seem to be easily lost or deleted during laboratory
34 manipulation. This hypothesis is supported by reports of 23.9-kb chromosomal
35 deletion containing the *fsr*-operon and its correlation with the loss of gelatinase
36 activity, even in the presence of the *gelE* gene (Macovei & Zurek, 2007; Gomes et
37 al., 2008).

38 This study evaluates the potential risks of chicken enterococci isolates. The
39 presence of two virulence factors (*esp* and *gelE*), *fsr*-operon genes, and *sprE* gene
40 were analysed and the phenotypic biofilm and gelatinase profile were determined.
41 Subculturing effects on genotypic and phenotypic expression were investigated in
42 order to ascertain whether this factor could explain the apparent chromosomal
43 deletion containing the *fsr*-operon. This study also determines the frequency of
44 disinfectant, antiseptic and antibiotic resistance.

45 MATERIALS AND METHODS

46 Microorganisms

47 Forty enterococci isolated from chicken (carcass) provided by Instituto de Ciências
48 Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICBS-UFRGS),
49 were used in this study. Isolates were previously identified as *Enterococcus faecalis*
50 (29), *Enterococcus faecium* (3), *Enterococcus gallinarum* (2), *Enterococcus*

51 *casseliflavus* (3), *Enterococcus hirae* (1) and *Enterococcus* sp (2). These 40 isolates
52 were stored in brain heart infusion containing 50% glycerol at 4° C. Cells were
53 subcultivated for 12 gerations in BHI agar plates and then tested. Each culture grew
54 for approximately 18 h at 35°C. In the 1st generation and 12th generation fenotypes
55 (gelatinase activity, biofilm formation, antimicrobial, antiseptic and disinfectant
56 resistance) were determined and genotypes (detection of *gelE*, *sprE*, *fsrA*, *fsrB*, *fsrC*
57 and *esp* genes) was analysed.

58 Gelatinase activity assay

59 The gelatinase activity was performed by inoculatin the isolates in tubes containg
60 agar BHI supplemented with 4% of gelatin substrate. After incubation at 37°C for 48
61 hours, the tubes were placed upright in ice for at least 30 minutes in order to bring the
62 temperature considerably below 28°C (the melting point of gelatin). A positive
63 reaction was indicated by a liquid consistency and the negative result by a solid
64 gelatin. If the results were negative the sample was reincubated for up to 7 days
65 (CLAUS, 1989).

66 Preparation of DNA and PCR

67 Total DNA was extracted from cells according to the boiling method of Hagen,
68 Gauthier, Sprague & Vidal (2002). The *gelE*, *sprE*, *fsrA*, *fsrB*, *fsrC* and *esp* genes
69 (Table 1) were amplified by polymerase chain reaction (PCR). The PCR reaction
70 was performed in a final volume of 25 µl containing 25 ng of template DNA, 0.2 µM of
71 each primer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 10mM Tris-HCl (pH 9,0) and 1U of Taq
72 DNA polymerase. The amplifications of all genes were performed with a thermal
73 cycler (MJ Research, Inc.PTC-100) under the following conditions: 5 min at 94°C, 30
74 cycles of 94°C 1 min, 53°C 2 min, 72°C 3 min, 5 min final extension at 72°C and 4°C
75 until analysis. The sequence of primers used to amplify the genes is presented in

76 Table 1. Visualization of amplicons was done with ethidium bromide ($0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$)
77 under UV transillumination after electrophoresis on 1.5% agarose gels. Image
78 analysis was performed with Kodak Digital Science™ DC120.

79 Antimicrobial susceptibilities

80 Tests for antimicrobial susceptibility were performed through the standard disk
81 diffusion method, according to guidelines of the *Clinical and Laboratory*
82 *Standards Institute* (CLSI). In this study, the following antimicrobials were used:
83 chloramphenicol, ciprofloxacin, erythromycin, gentamicin, tetracycline, ampicillin and
84 vancomycin. The diameters of growth inhibition areas were measured and strains
85 were classified according to the NCCLS (2002) criteria.

86 Disinfectants and antiseptic susceptibility tests

87 All *Enterococcus* sp. strains were subcultured on BHI medium for 18h at 37°C. The
88 concentration of the cultures were adjusted following to 0.5 McFarland scale. Three
89 commercial disinfectants (8.5% sodium hypochlorite, 7.9% formaldehyde, linear
90 alkylbenzene sulphonate) and 2 commercial antiseptics (chlorhexidine digluconate
91 10 mg/mL, 0.3% triclosan) were used. Petri plates containing Miller-Hinton agar
92 medium were swabbed with the bacteria suspension. Paper discs (6 mm diameter)
93 were soaked with 15 μl of each disinfectants or antiseptics tested solution and
94 placed on the plates which were incubated for 18h at 37°C. After incubation, the
95 diameters of growth inhibition areas were determined and classified following
96 JOHNSON and CASE (1995). The tests were repeated three times for all strains.
97 Bactericidal activity tests were carried out following CLSI (2002).

98 Biofilm assay on polystyrene microtiter plates

99 Biofilm formation on polystyrene was quantified with the crystal violet staining
100 method as previously described by Stepanovic, Vukovic, Dakic, Savic and

101 Svabic-Vlahovic (2000). *Staphylococcus epidermidis* strain was used as a positive
102 control. The optical density of each well was measured at 450 nm using an
103 automated Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). All strains were
104 separated into categories using the optical densities of bacterial films, as
105 described previously by Christensen et al. (1985) were the cut-off OD_c, for the
106 microtiter-plate test is defined as OD of negative control three standard deviations
107 above the mean OD. Strains were classified as follows: non-adherent, weakly
108 adherent, moderately adherent or strongly adherent (Figure 2). Differences in the
109 degree of biofilm formation were examined by the Wilcoxon signed ranks test (SPSS
110 for Windows 13.0). P-values of <0.05 were considered significant.

111 Results and Discussion

112 Gelatinase (*gelE*) and enterococcal surface protein (*esp*) are virulence factors in
113 enterococci and are usually associated with clinical isolates. Few studies have found
114 gelatinase producers and the presence of *esp* gene among food enterococci
115 (Semedo et al., 2003; Jurkovic et al., 2006). The results obtained from PCR
116 amplification in this work revealed that nos of the isolates analyzed present the *esp*
117 gene (Table 2). Similarly, the absence of the *esp* gene has been reported among
118 enterococcal isolates from chicken (Gomes et al., 2008) and ready-to-eat food
119 (Macovei & Zurek, 2007). However, Valenzuela et al. (2008) found *esp* gene in
120 strains of *E. faecalis* isolated from pork.

121 Among the 40 enterococci analysed, 34 (85%) of the isolates were gelatinase
122 producers similar results was obtained by Lopes, Simões, Terneiro, Marques and
123 Crespo (2006) who found 33 (90%) of the isolates gelatinase producers. Clinical
124 enterococci strains (Singh, Nallapareddy, Nannini & Murray, 2005) reported
125 equivalent gelatinase production as that found in our study. The incidence of

126 gelatinase production among food enterococci strains in our study seems to be
127 higher than that reported in some food-based studies (Gomes et al., 2008) and
128 clinical strains (Semedo et al., 2003). Some studies suggest that gelatinase
129 expression depends on environmental and culture conditions. The high incidence of
130 gelatinase activity among enterococci in this study may be explained by the fact that
131 all enterococci originated from a protein-rich source. Thus, the production of protease
132 may be a selection mechanism for enterococci growing in meat or dairy derivatives
133 (Franz et al., 2001).

134 All species tested in our study were capable of gelatinase production differing from
135 Gomes et al. (2008) that found no *E. faecium* gelatinase producing strains. The
136 incidence of gelatinase activity of the enterococci in this study was expected to be
137 even higher because 37 (92.5%) isolates carried *gelE* but only 34 (85%) isolates
138 were gelatinase positive. Qin, Singh, Weinstock & Murray (2000) and Nakayama,
139 Kariyama & Kumon (2002) showed that *fsr*-operon genes act as positive regulators of
140 gelatinase expression and that chromosomal deletion in the *fsr* gene cluster region
141 may be responsible for results of negative gelatinase production with isolates that the
142 *gelE* gene is present. Other studies had similar results (Eaton & Gasson, 2001;
143 Creti, Imperi, Bertuccini, Fabretti, Orefici, Di Rosa & Baldassarri, 2004; Jurkovic, et
144 al., 2006; Lopes et al., 2006; Gomes et al., 2008) suggesting that a 23.9-kb
145 chromosomal deletion may contain the *fsr*-operon. The complete *fsr*-operon was
146 present in 35 (87.5%) strains and 34 (97.2%) of them were gelatinase producers
147 (Table 2 and 3). Studies analyzed *fsr*-operon and *gelE* and they suggest that an
148 intact *fsrB* and *gelE* are both necessary for gelatinase production (Qin et al., 2000;
149 Macovei & Zurek, 2007). Our study also suggest that an intact *fsrB* gene is necessary
150 for gelatinase production because, in the 5 isolates that were gelatinase negative the

151 *fsrB* gene was absent. Our study suggest that the presence of the *gelE* gene is not
152 necessary to gelatinase production because one isolate without the *gelE* gene
153 presented all *fsr*-operon genes and produced gelatinase. This result agrees with
154 Pangallo et al. (2008) that found 5 strains capable of producing gelatinase without
155 *gelE*, suggesting that the presence of *gelE* is not sufficient for gelatinase activity.

156 Previous study showed that *fsr* quorum sensing is mediated by a cyclic peptide
157 termed gelatinase biosynthesis-activating pheromone (GBAP) (Nakayama, Kariyama
158 & Kumon, 2002). One strain in our study, *gelE*, *sprE* and all *fsr*-operon genes were
159 present (Figure 3) but was gelatinase negative. Lopes et al. (2006) found 12 strains
160 with these same profile. This case may be explained by the inhibition of GBAP
161 signaling. Lyon & Muir (2003) revealed the presence of key residues, responsible for
162 receptor activation that act as competitive antagonists with GBAP, which may explain
163 the positive genotype profile and the negative phenotype found in this strain.

164 The *Fsr* system plays a significant role in the virulence of *E. faecalis* in disease
165 models and it may provide an attractive target for the development of new
166 antimicrobial agents. Serine protease gene (*sprE*) was detected in 34 (85%) (Table
167 2) isolates, 26 (76.5%) of which were identified as *E. faecalis*. Our results agree with
168 Lopes et al. (2006) that found the presence of *sprE* gene in 58.6% of the dairy
169 enterococci and *E. faecalis* was the prevalent species.

170 Serine protease as gelatinase is related to the pathogenicity of *E. faecalis*, an
171 opportunistic pathogen. In a model testing rabbit endophthalmitis, a mutant strain
172 *gelE*⁻ *sprE*⁺-infected eyes retained better visual function than the eyes infected with
173 *gelE*⁺ *sprE*⁻. But, in our study and in Lopes et al. (2006), the presence/absence of
174 *sprE* gene was not correlated with gelatinase activity (Qin et al., 2000; Garsin et al.,
175 2001; Engelbert, Mylonakis, Ausubel, Calderwood & Gilmore, 2004).

176 During our experiment one isolate lost the ability to produce gelatinase during the
177 subculture. Eaton and Gasson (2001) have also reported that gelatinase activity was
178 lost during subculturing. Nakayama et al. (2002) observed in their experiment that 2
179 of 12 gelatinase producing strains became gelatinase negative after six generations.
180 According to Lopes et al. (2006), the failure of the expression of *gelE* and gelatinase
181 under laboratory conditions was correlated with the loss of one or more *fsr*-operon
182 genes. These observations suggest that this kind of deletion may occur at a high
183 frequency. Pathogenicity islands, partner genetic elements that range in size from 10
184 to 200 kb and contain one or more genes associated with virulence which can be
185 deleted in blocks (Oelschlaeger & Hacker, 2004). Therefore, a subculture experiment
186 was carried out including the detection of *gelE*, operon-*fsr* genes and *sprE* in 12th
187 generation. The genotypic and phenotypic profile of enterococci isolates were
188 variable in the 1st and 12th generation (Table 2). The *gelE* gene was detected in 37
189 (92.5%) isolates in the 1st generation and 22 (55%) maintained the *gelE* gene in 12th
190 generation and, none of these strains lost gelatinase activity. Among 34 (85%)
191 gelatinase producing isolates in the 1st generation, only 1 strain lost gelatinase
192 activity in 12th generation. This finding is similar to studies that show the loss of the
193 gelatinase activity during the manipulation of the strains in the laboratory (Qin et al.,
194 2000; Lopes et al., 2006). The complete *fsr*-operon was present in 35 (87.5%)
195 isolates in the 1st generation while only 23 (57.5%) isolates maintained the complete
196 *fsr*-operon in the 12th generation. All isolates that lost at least one *fsr*-operon gene did
197 not lose the capacity to produce gelatinase. This is most likely due to the fact none of
198 them lost the *fsrB* gene, which seems to be necessary for gelatinase production (Qin
199 et al., 2000).

200 Ten (25%) isolates lost *gelE*, *fsrA* and *sprE* genes in 12th generation. These genes,
201 seems to be the most easily lost. Serine protease gene (*sprE*) was detected in 34
202 (85%) isolates in the 1st generation while in the 12th generation only 20 isolates
203 maintained the presence of *sprE* gene. One isolate lost the gelatinase activity in the
204 12th generation but did not lost either *gelE* or *fsr*-operon. This finding is supported by
205 Lopes et al. (2006), who detected the mRNA of the *gelE*, *fsrA*, *fsrB* and *fsrC* genes in
206 4 subcultures and all cDNA from the genes were detected, including the strain
207 incapable of producing gelatinase. The gelatinase activity as well as the *gelE* gene,
208 were detected in 1st generation in 33 (82.5%) isolates and the complete *fsr*-operon
209 was detected in 35 (57.5%) strains among different enterococcal species. The
210 incomplete *fsr*-operon was found in *E. hirae*, *E. faecium* and *E. faecalis*. In the 12th
211 generation gelatinase activity and *gelE* gene was detected in 18 (45%) enterococcal
212 isolates and the complete *fsr*-operon was detected in 23 (57.5%) isolates from
213 different enterococcal species. The *fsr*-operon in *E. casseliflavus* did not suffer
214 alterations with the subculturing (Table 2). This is the first study with food enterococci
215 that detected all genes involved in gelatinase activity after the 12th generation.
216 All enterococci isolates were susceptible to ampicillin and gentamicin in the 1st and
217 12th generation (Table 3). In both tests, 38 (95%) isolates were susceptible to
218 vancomycin, 34 (85%) were susceptible to ciprofloxacin and just 2 isolates (5%) were
219 susceptible to tetracycline. Our results were similar to Valenzuela et al. (2008), which
220 found 38 enterococci isolated from meat, dairy and vegetable foods susceptible to
221 ampicillin and gentamicin. This study also shows that the strains had high
222 susceptibility to vancomycin (91.3%) and ciprofloxacin (91%) and low susceptibility
223 to tetracycline (13%). A higher incidence of ciprofloxacin resistance was found in
224 enterococci isolates from water (Costa, Vaz-Pires & Bernardo, 2006) and fruits and

225 vegetables (Abriouel et al., 2008). Resistance to vancomycin, ciprofloxacin and
226 tetracycline are all related to the presence of resistant genes found through
227 transposon or plasmids (Arthur, Molinas & Depardieu, 1993).

228 Similar to other studies, 26 (65%) isolates were susceptible to erythromycin in the
229 1st generation (Teuber, 1999; Costa et al., 2006; Abriouel et al., 2008; Valenzuela et
230 al., 2008). Gomes et al. (2008) in their work found which documented 81%
231 enterococci isolates susceptible to erythromycin. All erythromycin-resistant isolates of
232 our study were also resistant to tetracycline, similar to the findings described by
233 Teuber (1999). This may be explained by the fact that erythromycin-resistant
234 plasmids and transposons are commonly found among enterococci and a significant
235 proportion of tetracycline-resistant isolates exhibited co-resistance to erythromycin
236 and/or chloramphenicol, which suggests further selection of multiple resistances. It is
237 also likely that *tet* genes, which carry multiple antimicrobial resistance genes, are
238 associated with transposons. Food safety is another vital factor when addressing the
239 high incidence of tetracycline-resistance, especially when tetracycline is used as
240 growth stimulator in animal production. *Enterococcus* sp. is capable of transferring
241 resistance genes to other microorganisms which create a large pool of resistant
242 organisms that may be passed to humans (Michalova, Novotna & Schlegelova,
243 2004).

244 Twenty-one (52.5%) isolates were susceptible to chloramphenicol in the 1st assay,
245 differing from previous studies that demonstrated higher susceptibility in isolated food
246 samples (Teuber, 1999; Franz et al., 2001; Cariolato, Andrighetto & Lombardi, 2008;
247 Valenzuela et al., 2008). All isolates resistant to chloramphenicol were also resistant
248 to tetracycline, a result that is most likely related to the co-resistance of tetracycline
249 and chloramphenicol and transposons carrying multiple antimicrobial resistance

250 genes. Erythromycin and chloramphenicol had different susceptibility profiles in the
251 1st and 12th generation. Twenty-six (65%) isolates were susceptible to erythromycin
252 in the 1st generation and 27 (67.5%) in 12th generation. Twenty-one (52.5%) isolates
253 were susceptible to chloramphenicol in the 1st assay and 32 (80%) in the 2nd assay.
254 This result can be attributed to spontaneous plasmid loss during subcultures (LAZO,
255 BRUTON, PARKER, 2006).

256 Due to the spontaneous loss of plasmids, of the 40 samples tested, 13 (32.5%)
257 showed a multi-resistance profile and 26 (65%) were resistant to 1 or 2 of the
258 antimicrobials tested in the 1st generation. Yet in the 12th generation, 12 (30%)
259 showed a multi-resistance profile and 25 (62.5%) were resistant to 1 or 2 of the
260 antimicrobials tested. Koluman, Akan & Çakiroglu, (2009) found that 72% of the
261 chicken samples were resistant to at least two antimicrobials. In contrast, multi-drug
262 resistance was uncommon among dairy isolates, occurring in only 13.6% of the
263 strains (Cariolato et al., 2008).

264 According to Pérez-Pulido, Abriouel & Ben Omar (2006) the virulence of
265 enterococci is strongly enhanced by its resistance to antimicrobials. Our results
266 support this conclusion because we found that in all isolates resistant to at least one
267 antimicrobial the virulence factor *gelE* was present. Two (5%) isolates susceptible to
268 tetracycline did not present virulence genes (*gelE* nor *esp*), *operon-fsr* or *sprE*.

269 Long-term exposure of bacteria to antimicrobials creates a level of resistance that the
270 resistant strains can compete with susceptible strains even in absence of
271 antimicrobials (Barbosa & Levy, 2000). Frequent detection of antimicrobial resistance
272 among food enterococci is probably due to the efficient transfer mechanisms of
273 resistance genes, via conjugative plasmids and transposons (Teuber, 1999).

274 A wide divergence in the response to disinfectants and antiseptic agents was
275 observed among the strains (Table 4). Thirty-nine (97.5%) isolates were
276 susceptible to formaldehyde in the 1st generation and 40 (100%) in the 12th
277 generation. Our results agree with Aarestrup & Hasman (2004) study that does not
278 indicate any development of resistance to formaldehyde. The only isolate that was
279 resistant to formaldehyde in the 1st generation lost its resistance in the 12th
280 generation, most likely because it lost the plasmid gene that encodes resistance. This
281 resistance gene has been identified (Kümmerle, Feucht & Kaulfers, 1996) and also
282 found in formaldehyde resistant isolates of *Escherichia coli* isolates and other
283 bacterial species (Wollmann & Kaulfers, 1991).

284 All enterococci isolates were resistant to linear alkylbenzene sulphonate (LAS) in the
285 1st and 12th generations and this result may have occurred due to the resistance
286 mechanisms of linear alkylbenzene sulphonate. According to studies, the bacteria
287 use the sulphur molecule of LAS when this element is limited which causes a
288 modification in the molecular structure of the principle acting agent that in turn
289 impedes its ability to function. Planktonic cultures grown under conditions of nutrient
290 limitation or reduced growth rates have cells with altered sensitivity to disinfectants,
291 probably as a consequence of modifications in their outer membranes (Brown,
292 Collies & Gilbert, 1990).

293 Triclosan resistance was observed in all enterococci isolates in the 1st and 12th
294 generations and this result was most likely due to the presence of resistant
295 plasmids which altered or caused the overproduction of the target site. Our study
296 diverges from Beier, Duke & Ziprin (2008) findings where 46 (92%) vancomycin-
297 resistant *E. faecium* isolates were susceptible to triclosan. However, Beier et al.
298 (2008) used higher concentrations of triclosan than our study. Some studies showed

299 evidences of possible association between triclosan and antimicrobial resistance. The
300 overexpression of *marA*, *soxS* or *acrAB* genes, efflux system regulators, in laboratory
301 or clinical strains of *E. coli* reduces susceptibility to triclosan, ampicillin, tetracyclines
302 and fluoroquinolones (Al-Doori, Morrison & Edwards, 2003; McMurry, Oethinger &
303 Levy, 1999).

304 Fourteen (35%) isolates were susceptible to 8.5% sodium hypochlorite in the 1st
305 generation, which were higher than the results obtained by Sena et al. (2006) that
306 found 5.25% of the microorganisms susceptible to sodium hypochlorite. According to
307 Kayaoglu, Erten & Orstavik (2008), the presence of the *ace* gene, which is
308 responsible for the production of the adhesin Ace, makes *E. faecalis* resistant to
309 common disinfectants like sodium hypochlorite. The *ace* gene may be present in
310 isolates that were resistant to sodium hypochlorite in our study.

311 In the 1st generation, 34 (85%) isolates were susceptible to clorexidine (CHX), in
312 contrast to Aarestrup & Hasman (2004) and Sena et al. (2006) where no resistance
313 to clorexidina was found. However, these studies utilized a concentration of 20
314 mg/mL CHX gluconate whereas our study used 10 mg/mL CHX gluconate of the
315 principle agent. In 12th generation, the clorexidine and sodium hypochlorite
316 susceptibility was lower, one isolate and 2, respectively. Laboratory studies have
317 shown that bacteria can become less susceptible to disinfectants and
318 crossresistance may occur to other disinfectants and antimicrobials. For example, *S.*
319 *aureus* cells produced by repeated subculturing in glycerol-containing media are
320 more resistant to the disinfectants alkyl phenols and benzylpenicillin than are wild-
321 type strains. Subcultures of these cells in routine culture media resulted in reversion
322 to sensitivity (Hugo & Davidson, 1973).

323 In addition, there have been reports of bacteria showing resistance, or
324 decreased susceptibility, to other disinfectants and a number of reports have
325 expressed concern that the use of biocides may contribute to the development of
326 antimicrobial resistance in bacteria. Sub-inhibitory concentrations of antimicrobials
327 and disinfectants like antibacterial hygiene products, might promote growth of
328 resistant bacteria or gene transfer between bacteria in the sewage treatment tanks
329 (Russell, 2001; Lindberg, Jarnheimer, Olsen, Johansson & Tysklind, 2004).

330 We found that all strains were biofilm producers like Arciola et al. (2008). Recently, a
331 relationship between *esp*, *gelE* and gelatinase has been found in the biofilm
332 formation (Di Rosa et al., 2006). In none of our strains the presence of *esp* gene
333 was found disagreeing with some studies that demonstrated the presence of the *esp*
334 gene, highly associated with the capacity to form a biofilm on a polystyrene surface
335 (Toledo-Arana et al., 2001; Mohamed, Huang, Nallapareddy, Teng & Murray, 2004;
336 Tendolkar, Baghdayan, Gilmore & Shankar, 2004). In others studies, however,
337 biofilm development appeared to be independent of *esp* gene (Kristich, Cvitkovitch &
338 Dunny, 2004).

339 The lack of a correlation between gelatinase and biofilm formation has been
340 demonstrated recently (Toledo-Arana et al., 2001). We examined the expression of
341 gelatinase and the presence of its coding gene, *gelE*, and their association with
342 biofilm development. Our results show that 32 (80%) isolates were *gelE* positive and
343 gelatinase positive in the 1st and 12th generations and these isolates were the
344 greatest biofilm producers. In the 1st generation 20 (50%) isolates were
345 moderate biofilm producers and 3 (7.5%) isolates were strong biofilm producers. In
346 the 12th generation 19 (35%) isolates were strong biofilm producers (Figure 4a).
347 These results are in agreement with the result obtained by Mohamed et al. (2004)

348 and Gomes et al. (2008) where they showed that the presence of *gelE* gene is
349 essential for biofilm-production. Eleven (27.5%) isolates in 12th generation did not
350 presented *gelE* genes but were gelatinase producers, 7 (17.5%) were strong biofilm
351 producers and 3 (7.5%) were moderate biofilm producers. Our results suggest that
352 gelatinase production is more important to biofilm production than the presence of
353 *gelE* gene. This supports Toledo-Arana et al. (2001) that indicate that biofilm
354 formation is increased by gelatinase activity but differs from Mohamed et al. (2004)
355 and Gomes et al. (2008) who found no correlation between biofilm formation and
356 gelatinase production.

357 Some studies showed an association between quorum-sensing locus *fsr* and biofilm
358 development. An examination of the biofilm-forming capacity of *fsrA*, *fsrB*, *fsrC*, *gelE*,
359 *sprE* genes mutants on polystyrene revealed that all presented a decreased ability to
360 form a biofilm, except for the strain with a serine protease (*sprE*) mutation (Hancock
361 & Perego, 2004). We correlated the presence of the operon-*fsr* with the capacity of
362 each isolate to produce biofilm. Thirty-five (87.5%) isolates show complete operon-*fsr*
363 in the 1st generation and 20 (57.1%) were moderate biofilm producers. Twenty-two
364 (62.85%) isolates maintained the complete operon-*fsr* in the 12th generation and 17
365 (77.3%) were strong biofilm producers. Despite, in 22 (62.85%) isolates at least one
366 *fsr*-operon gene was absent in the 1st and in 12th generation and in this group 16
367 were strong biofilm producers (Figure 4b). These results show that complete operon
368 *fsr* isn't required for biofilm formation, supporting the findings of Mohamed et al.
369 (2004) and Singh et al. (2005). No isolate from our study lost the *fsrB* gene, in spite
370 of the fact that many studies claim that this gene is responsible for the expression of
371 gelatinase and is directly related to the formation of biofilm. In spite of, our biofilm
372 results seems to be related to the expression of gelatinase but not to the presence of

373 the complete *fsr*-operon. Singh et al. (2005) suggest that the mechanism of
374 gelatinase production and control may present a target for therapeutic intervention in
375 enterococcal infections.

376 Several other factors have been associated with biofilm development in
377 *Enterococcus* sp., like the sugar-binding transcriptional regulator BopD (Creti et al.,
378 2004), heterogeneity in surface charge (van Merode, Pothoven & van der Mei, 2007),
379 the *bee* locus (Tendolkar et al., 2004) and *ebpABC* expression responsible for
380 adherence pilus production (Bourgogne, Singh & Fox, 2007).

381 Our results had proven that enterococci isolates from chicken may serve as a
382 reservoir of resistant bacteria and that the gelatinase virulence factor is
383 disseminated among the genus *Enterococcus*, along with the *gelE* gene. The *fsrB*
384 gene is essential for gelatinase activity. The genus *Enterococcus* is capable of
385 producing biofilm. The *esp* gene and *fsr*-operon do not seem to be necessary for
386 biofilm production while gelatinase seemed to be required. Further studies of how the
387 activation or inactivation of known and unknown genes can influence the biofilm
388 formation and consequently the safety of food should be done.

389 Acknowledgements

390 We thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
391 (CNPq - #306397/2006-4 and #473769/2007-7) of the Brazil government and the
392 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) of the
393 Brazilian government.

394 References

395 Aarestrup, F. M. & Hasman, H. (2004). Susceptibility of different bacterial species
396 isolated from food animals to copper sulphate, zinc chloride and antimicrobial
397 substances used for disinfection. *Veterinary Microbiology*, 100, 83–89.

- 398 Abriouel, H., Omar, B. & Molinos, A. C. (2008). Comparative analysis of genetic
399 diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among
400 enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and
401 clinical samples. *International Journal of Food Microbiology*, 123(1-2), 38-49.
- 402 Al-Doori, Z., Morrison, D. & Edwards, G. (2003). Susceptibility of MRSA to triclosan
403 *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51 (1), 185-185.
- 404 Arciola, C. R., Baldassarri, L., Campoccia, D., Creti, R., Pirini, V., Huebner, J. &
405 Montanaro, L. (2008). Strong biofilm production, antibiotic multi-resistance and high
406 gelE expression in epidemic clones of *Enterococcus faecalis* from orthopaedic
407 implant infections. *Biomaterials*, 29, 580–586.
- 408 Arthur, M., Molinas, C. & Depardieu, F. (1993). Characterization of TN1546, a TN3-
409 related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide
410 peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *Journal of bacteriology*,
411 175(1), 117-127.
- 412 Barbosa, T. M. & Levy, S. B. (2000). The impact of antibiotic use on resistance
413 development and persistence. *Drug resistance updates*, 3(5), 303-311.
- 414 Beier, R. C., Duke, S.E. & Ziprin, R.L. (2008). Antibiotic and disinfectant
415 susceptibility profiles of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE) isolated
416 from community wastewater in texas. *Bulletin of Environmental Contamination and*
417 *Toxicology*, 80(3), 188-194.
- 418 Bourgogne, A., Singh, K. V. & Fox, K. A. (2007). EbpR is important for biofilm
419 formation by activating expression of the endocarditis and biofilm-associated pilus
420 operon (ebpABC) of *Enterococcus faecalis* OG1RF. *Journal of Bacteriology*, 189(17),
421 6490-6493.

- 422 Brown, M. R. W., Collies, P. J. & Gilbert, P. (1990). Influence of growth rate on
423 susceptibility to antimicrobial agents: modification of the cell envelope and batch and
424 continuous culture studies. *Antimicrob. Agents Chemother*, 34, 1623–1628.
- 425 Cariolato, D., Andrighetto, C. & Lombardi, A. (2008). Occurrence of virulence factors
426 and antibiotic resistances in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*
427 collected from dairy and human samples in North Italy. *Food Control*, 19(9), 886-892.
- 428 Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F.,
429 Melton, D. M. & Beachey, E. H. (1985). Adherence of, coagulase-negative
430 staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence
431 of staphylococci medical devices. *J. Clin. Microbiol*, 22, 996–1006.
- 432 Claus, G.W. (1989). Understand microbes: a laboratory text book of microbiology. p.
433 250-252. W.H.Freeman, New York.
- 434 *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for*
435 *Antimicrobial Susceptibility Testing; Twelfth Informational Supplement. CLSI*
436 *document M100-S12. Wayne, PA: CLSI.*
- 437 Costa, P. M., Vaz-Pires, P. & Bernardo, F. (2006). Antimicrobial resistance in
438 *Enterococcus* sp. isolated in inflow, effluent and sludge from municipal sewage water
439 treatment plants. *Water Research*, 40(8), 1735-1740.
- 440 Creti, R., Imperi, M., Bertuccini, L., Fabretti, F., Orefici, G., Di Rosa, R. & Baldassarri,
441 L. (2004). Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated
442 from different sources. *J Med Microbiol*, 53, 13– 20.
- 443 Di Rosa, R., Creti, R., Venditti, M., D'Amelio, R., Arciola, C.R., Montanaro, L. &
444 Baldassarri, L. (2006). Relationship between biofilm formation, the enterococcal
445 surface protein (Esp) and gelatinase in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and
446 *Enterococcus faecium*. *FEMS Microbiol*, 256,145–150.

- 447 Eaton, T. J. & Gasson, M. J. (2001). Molecular screening of *Enterococcus* virulence
448 determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates.
449 *Appl. Environ. Biol.* 67, 1628-1635.
- 450 Engelbert, M., Mylonakis, E., Ausubel, F. M., Calderwood, S. B. & Gilmore, M. S.
451 (2004). Contribution of Gelatinase, Serine Protease, and *fsr* to the Pathogenesis of
452 *Enterococcus faecalis* Endophthalmitis. *Infection and Immunity*, 72(6), 3628–3633.
- 453 Franz, C. M., Muscholl-Silberhorn, A. B., Yousif, N. M., Vancanneyt, M., Swings, J. &
454 Holzapfel, W. H. (2001). Incidence of virulence factors and antibiotic resistance
455 among Enterococci isolated from food. *Applied and Environmental Microbiology*, 67,
456 4385–4389.
- 457 Garsin, D. A., Sifri, C.D., Mylonakis, E., Qin, X., Singh, K.V., Murray, B.E.,
458 Calderwood, S.B. & Ausubel, F.M. (2001). A simple model host for identifying gram-
459 positive virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 98, 10892-10897.
- 460 Giraffa, G. (2002). Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews*, 26, 163–
461 171.
- 462 Gomes, B. C., Esteves, C. T., Palazzo, I. C. V., Darini, A. L. C., Felis, G. E., Sechi, L.
463 A., Franco, B. D. G. M. & De Martinis, E. C. P. (2008). Prevalence and
464 characterization of *Enterococcus* sp. Isolated from Brazilian foods. *Food Microbiology*
465 25, 668– 675.
- 466 Hagen, R. M., Gauthier, Y. P., Sprague, L. D. & Vidal, D. R. (2002). Strategies for
467 PCR based detection of *Burkholderia pseudomallei* DNA in paraffin wax embedded
468 tissues. *Mol. Pathol.*, 55, 398-400.
- 469 Hancock, L. E. & Perego, M. (2004). The *Enterococcus faecalis* *fsr* Two-Component
470 System Controls Biofilm Development through Production of Gelatinase. *Journal of*
471 *Bacteriology*, 186(17), 5629–5639.

- 472 Hugo, W. B. & Davidson, J. R. (1973). Effect of cell lipid depletion in *Staphylococcus*
473 *aureus* upon its resistance to antimicrobial agents. II. A comparison of the response
474 of normal and lipid depleted cells of *S. aureus* to antibacterial drugs. *Microbios*, 8,
475 63–72.
- 476 Johnson, T. & Case, C. (1995). Laboratory Experiments in Microbiology, Brief
477 Edition, 4th ed., Redwood City, CA: Benjamin/Cummings Publishing Co.
- 478 Jurkovic, D., Krizkova, L. & Sojka, M. (2006). Genetic diversity of *Enterococcus*
479 *faecium* isolated from Bryndza cheese. *International Journal of food Microbiology*,
480 116(1), 82-87.
- 481 Kayaoglu, G., Erten, H. & Orstavik, D. (2008). Possible role of the adhesin ace and
482 collagen adherence in conveying resistance to disinfectants on *Enterococcus*
483 *faecalis*. *Oral Microbiol Immunol*, 23, 449–454.
- 484 Kayser, F. H. (2003). Safety aspects of enterococci from the medical point of view.
485 *International Journal of Food Microbiology*, 88, 255–262.
- 486 Kristich, C. J., Li, Y., Cvitkovitch, G. D. & Dunny, G.M. (2004). Esp independent
487 biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 186, 154–163.
- 488 Koluman, A., Akan, L. S. & Çakiroglu, F. P. (2009). Occurrence and antimicrobial
489 resistance of enterococci in retail foods. *Food control*, 20 (3), 281-283.
- 490 Kümmerle, N., Feucht, H. H. & Kaulfers, P. M. (1996). Plasmid mediated
491 formaldehyde resistance in *E. coli*: characterization of resistance gene. *Antimicrob.*
492 *Agents Chemother*, 40, 2276–2279.
- 493 Lazo, J. S., Bruton, L. L., Parker, K. L. Goodman e Gilman as bases farmacológicas
494 da terapêutica. (2006). Rio de Janeiro: McGraw Hill, p. 999-1055.
- 495 Lindberg, R., Jarnheimer, P., Olsen, B., Johansson, M. & Tysklind, M. (2004).
496 Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase

- 497 extraction and liquid chromatography/ mass spectrometry and group analogue
498 internal standards. *Chemosphere*, 57, 1479–1488.
- 499 Lyon, J., & Muir, T. W. (2003). Chemical Signaling among Bacteria Review and Its
500 Inhibition. *Chemistry & Biology*, 10, 1007–1021.
- 501 Lopes, M. F. S., Simões, A. P., Terneiro, R., Marques, J. J. F. & Crespo, M. T. B.
502 (2006). Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci.
503 *International journal of food microbiology*, 112, 208-214.
- 504 Macovei & Zurek, K. (2007). Influx of Enterococci and Associated Antibiotic
505 Resistance and Virulence Genes from Ready-To-Eat Food to the Human Digestive
506 Tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(21), 6740–6747.
- 507 McDonnell, G. & Russell, D. (1999). Antiseptics and disinfectants: activity, action, and
508 resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12, 147-179.
- 509 McMurry, L. M., Oethinger, M. & Levy, S. B. (1999). *marA*, *soxS* or *acrAB* produces
510 resistance in laboratory and clinical strains of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*,
511 166, 305–09.
- 512 Michalova, E., Novotna, P. & Schlegelova, J. (2004). Tetracyclines in veterinary
513 medicine and bacterial resistance to them. *Veterinarni Medicina*, 49(3), 79-100.
- 514 Mohamed, J. A., Huang, W., Nallapareddy, S.R., Teng, F. & Murray, B.E. (2004).
515 Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on
516 biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect. Immun*, 72, 3658–3663.
- 517 Nakayama, J., Kariyama, R. & Kumon, H. (2002). Description of a 23.9-kilobase
518 chromosomal deletion containing a region encoding *fsr* genes which mainly
519 determines the gelatinase-negative phenotype of clinical isolates of *Enterococcus*
520 *faecalis* in urine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 3152–3155.

- 521 Oelschlaeger, T.A. & Hacker, J. (2004). Impact of pathogenicity islands in bacterial
522 diagnostics. *APMIS*, 112(11-12), 930-936.
- 523 Pangallo, D., Drahovska, H., Harichova, J., Karellova, E., Chovanova, K., Ferianc, P.,
524 Turna, J. & Timko, J. (2008). Assessment of environmental enterococci: bacterial
525 antagonism, pathogenic capacity and antibiotic resistance. *Antonie van*
526 *Leeuwenhoek*, 94, 555–562.
- 527 Pérez-Pulido, R., Abriouel, H. & Ben Omar, N. (2006). Safety and potential risks of
528 enterococci isolated from traditional fermented capers. *Food and Chemical*
529 *Toxicology*, 44(12), 2070-2077.
- 530 Qin, X., Singh, K. V., Weinstock, G. M. & Murray, E. (2000). Effects of *Enterococcus*
531 *faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence.
532 *Infect. Immun.*, 68, 2579–2586.
- 533 Russell, A.D. (2001). Mechanisms of bacterial insusceptibility to biocides. *Am. Infect.*
534 *Contr.* 29, 259–261.
- 535 Saavedra, L., Taranto, M. P., Sesma, F. & Valdez, G. F. (2003). Homemade
536 traditional cheeses for the isolation of probiotic *Enterococcus faecium* strains. *Int. J.*
537 *Food Microbiol*, 88, 241–245.
- 538 Semedo, T., Santos, M. A., Lopes, M. F., Figueiredo, M. J. J., Barreto, M. T. &
539 Tenreiro, R. (2003). Virulence factors in food, clinical and reference enterococci: a
540 common trait in the genus? *Syst. Appl Microbiol*, 26,13– 22.
- 541 Sena, N. T., Gomes, B. P. F. A., Vianna, M. E. , Berber, V. B., Zaia, A. A., Ferraz C.
542 C. R. & Souza-Filho, F. J. (2006). In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite
543 and chlorhexidine against selected singlespecies biofilms. *International Endodontic*
544 *Journal*, 39, 878–885.

- 545 Singh, K. V., Nallapareddy, S. R., Nannini, E. C. & Murray, B. E. (2005). Fsr-
546 independent production of protease(s) may explain the lack of attenuation of an
547 *Enterococcus faecalis* *fsr* mutant versus a *gelE-sprE* mutant in induction of
548 endocarditis. *Infect. Immun.* 73, 4888–4894.
- 549 Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B. & Svabic-Vlahovic, M. (2000). A
550 modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation.
551 *Journal of Microbiological Methods*, 40, 175–179.
- 552 Tendolkar, P. M., Baghdayan, A. S., Gilmore, M. S. & Shankar, N. (2004).
553 Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus*
554 *faecalis*. *Infect. Immun.*, 72, 6032–6039.
- 555 Teuber, M. (1999). Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens
556 *Cellular and Molecular Life Sciences*, 56(9-10), 755-763.
- 557 Toledo-Arana, A., Valle, J., Solano, C., Arrizubieta, M. J., Cucarella, C., Lamata, M.,
558 Amorena, B., Leiva, J., Penades, J. R. & Lasa, I. (2001). The enterococcal surface
559 protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl. Environ.*
560 *Microbiol.*, 67, 4538–4545.
- 561 Valenzuela, A. S., Omar, N. B., Abriouel, H., López, R. L., Ortega, E., Cañamero, M.
562 M. & Gálvez, A. (2008). Risk factors in enterococci isolated from foods in Morocco:
563 Determination of antimicrobial resistance and incidence of virulence traits. *Food and*
564 *Chemical Toxicology*, 46, 2648–2652.
- 565 van Merode, A. E. J., Pothoven, D. C. & van der Mei, H. C. (2007). Surface charge
566 influences enterococcal prevalence in mixed-species biofilms. *Journal of Applied*
567 *Microbiology*, 102(5), 1254-1260.

568 Wollmann, A. & Kaulfers, P. M. (1991). Formaldehyde-resistance in
569 Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*: identification of resistance genes
570 by DNA-hybridization. *Zbl. Hyg.*, 191, 449–456.

Vitae

SCHMIDT, G.

1 - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO:

Nome: Gisele Schmidt

Data e local de nascimento: 23/05/1983 Lajeado - RS

Endereço Profissional: Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500; Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA), Prédio 43212 – Lab.205, PO Box: 15005 - Porto Alegre – RS - Brasil

Telefone Profissional: (051) 3008-6072

E-mail: schmidtgisele@yahoo.com.br

2 - ESCOLARIDADE

Farmácia (Universidade de Santa Cruz do Sul, 2002-2006)

3 - ATIVIDADES

Farmácia Escola – UNISC – 03/2006 – 12/2006

- manipulação e atendimento em drogaria

- auxílio orientação curricular da disciplina Estágio em Farmácia I

Farmácia Peterninna – Arroio do Meio – 08/2006 – 12/2006 – 360h

- atendimento em drogaria

Bolsista Projeto: Diversificação de produtos oriundos da Banana. PUIC – UNISC – 04/2005 a 12/2005.

- Pesquisa e realização de experimentos

- Elaboração e apresentação de trabalhos e resumos em Congressos, Jornadas e Simpósios.

Monitora bolsista - Bioquímica III - Universidade de Santa Cruz do Sul – 13/03/2005
a 24/06/2005 – 60hs.

- Preparação e organização de aulas práticas.
- Esclarecimento da matéria e orientação de alunos.

Estágio em Farmácia de Manipulação – Farmácia Bulla – Capão da Canoa –
27/12/2004 a 11/02/2005

- Manipulação de cápsulas

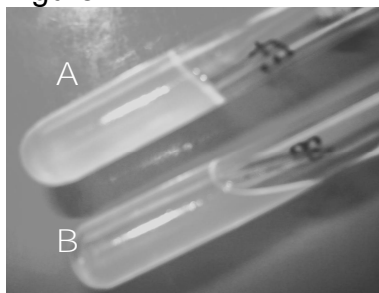
4 - TRABALHOS APRESENTADOS

- *Valor Biológico da proteína de concentrado de soja suplementado com soro de leite em pó.* SCHMIDT, G.; PAGNO, C.H.; de Paula, C.M.D.; VOGT, E. Apresentado: 2º Simpósio de Segurança Alimentar, SBCTA-RS (2008).
- *Atividade antimicrobiana in vitro da lactoferrina e do fluconazol em isolados Candida albicans: estudo comparativo.* SCHMIDT, G.; OLIVEIRA, M.S.R. Apresentado: 2º Simpósio de Segurança Alimentar, SBCTA-RS (2008).
- *Obtenção de Farinha de Banana Verde por Meio de Secagem em Estufa.* SCHMIDT, G.; GOERCK, G.R.; OLIVEIRA, M.S.R.; KLOSTER, C.L.. BACCAR, N.M.; ROHLFES, A.L.B. Apresentado: 6º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos (2005), XI Seminário de Iniciação Científica UNISC (2005) e X Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão UNIVATES (2005).
- *Análise Físico-química de néctar produzido a partir da Banana-Prata.* SCHMIDT, G.; OLIVEIRA, M.S.R.; MARQUARDT, L.; ROHLFES, A.L.B.; BACCAR, N.M. KLOSTER, C.L. Apresentado: IV SIC – Salão de Iniciação Científica UNIVATES. 2005.

- *Composição Centesimal e Análise Físico-química de Néctar produzido a partir de Banana Prata.* Autoria: GOERCK, G.R.; SCHMIDT, G.; OLIVEIRA, M.S.R.; KLOSTER, C.L. Apresentado: 13ª Jornada Nacional de Iniciação Científica realizada na 58ª Reunião Anual da SBPC. 2005.
- *Análise Sensorial de Banana-passa produzida por Desidratação Osmótica.* GOERCK, G.R.; SCHMIDT, G.; OLIVEIRA, M.S.R.; KLOSTER, C.L.; BACCAR, N.M.; ROHLFES, A.L.B. Apresentado: 6º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos. 2005.
- *Epidemiologia do Tabagismo em Gestantes Atendidas pelo Sistema Único de Saúde no Município de Santa Cruz do Sul.* MELO E.C.R.; SCHMIDT, G.; PINTO, S.L.; FRANKEN, D.; SANTOS, S.J.; PEREIRA, L.E.C.; ROOS, P.N. Apresentado: XI Seminário de Iniciação Científica e X Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão. 2005.

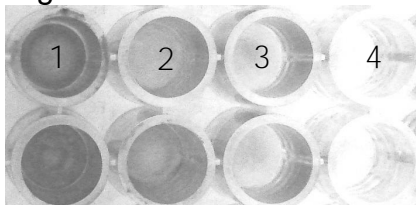
Figures

Figure 1



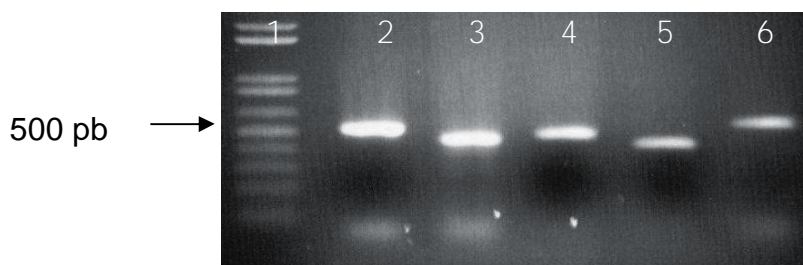
Our study.

Figure 2



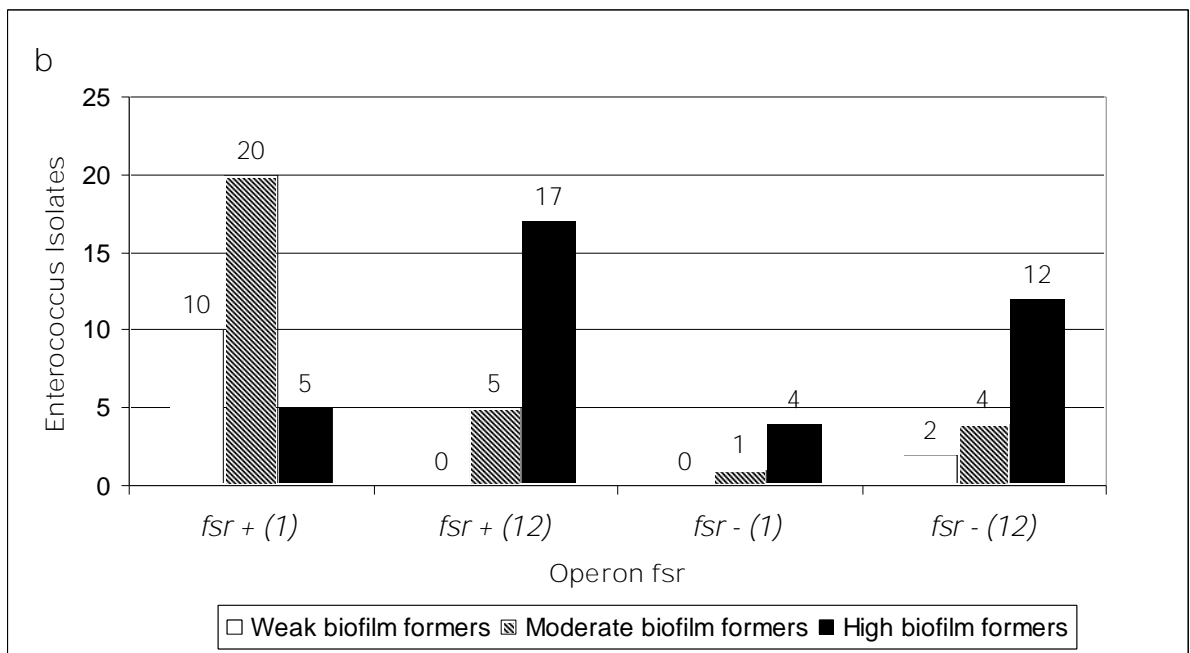
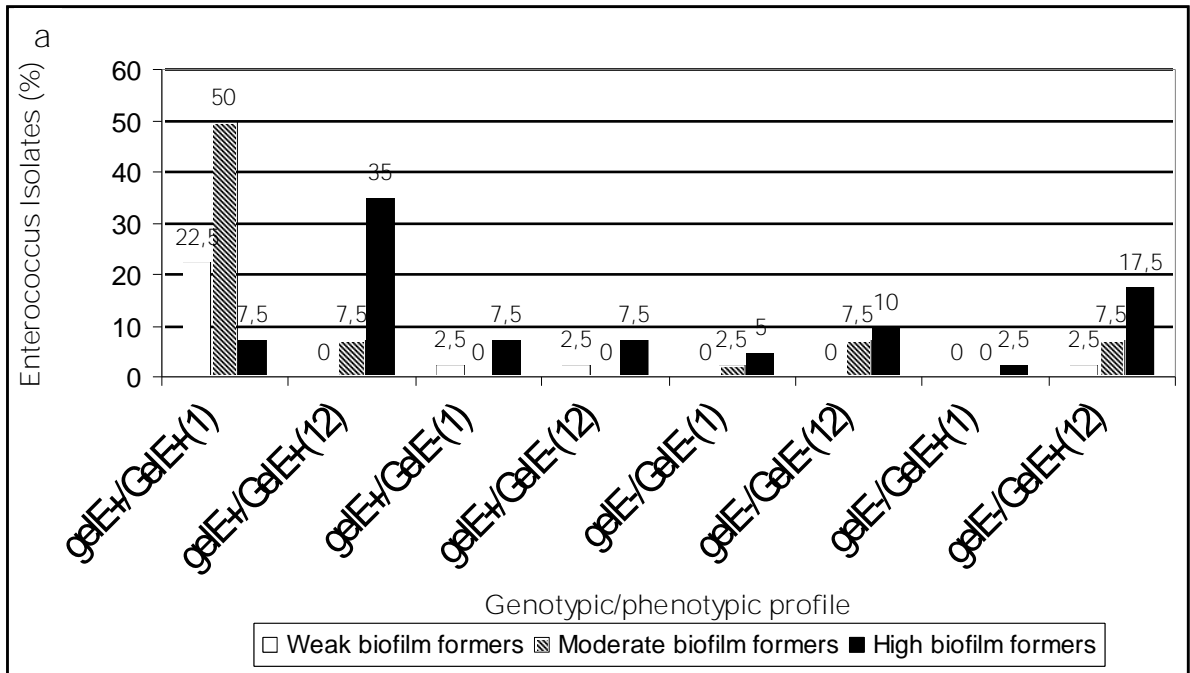
Our study.

Figure 3



Our study.

Figure 4



Our study.

Figure 1 - Gelatinase activity test: positive and negative phenotypes. Phenotype Gelatinase negative (A); Phenotype Gelatinase positive (B)

Figure 2 – Biofilm formation test: categories of biofilm formation. Strong biofilm producer (1), moderate biofilm producer (2), weak biofilm producer (3), negative control (4).

Figure 3 – Amplification of *fsr*-operon in *Enterococcus* sp. Marker 1 Kb Ladder (1) PCR reaction using *fsrA* primer generating a 511 bp product (2); PCR reaction using *fsrB* primer generating 426 bp product (3); PCR reaction using *fsrC* primer generating 455 bp product (4); PCR reaction using *gelE* primer generating 419 bp product (5); PCR reaction using *sprE* primer generating 514 bp (6).

Figure 4 - Subculturing effects on genotypic and phenotypic of *Enterococcus* sp. isolates. (a) Prevalence of gelatinase/*gelE* profiles and biofilm production: presence of gene *gelE* or positive phenotype(+); absent of gene *gelE* or negative phenotype(-), first generation (1); twelfth generation (12). (b) Presence of *fsr*-operon and biofilm production: absent of one or more gene of *fsr*-operon (*fsr* -), presence of all genes of *fsr*-operon (*fsr* +); first generation (1); twelfth generation (12).

Tables

Table 1. Primers used for PCR and expected amplicon sizes

Gene	Primer sequence	Expected amplicon size	Ref.
<i>gelE</i>	F: 5' ACC CCG TAT CAT TGG TTT 3'	419 bp	a
	R: 5' ACG CAT TGC TTT TCC ATC 3'		a
<i>sprE</i>	F: 5' CAC CAA CTA CTT CAA CCT GAT C 3'	514 bp	b
	R: 5' AAG AAG TGG CAG ATA CAA CCG A 3'		b
<i>fsrA</i>	F: 5' TTG AGA CTG GTA CTT CCG TTC 3'	511 bp	b
	R: 5' CAG GAC GCC CAA CTA AAT ATC 3'		b
<i>fsrB</i>	F: 5' AGT TTG TCC CAT CCA TTG TCC 3'	426 bp	b
	R: 5' GCT CTG TCG TCT AGA AAG CAT 3'		b
<i>fsrC</i>	F: 5' CCA ACC GTG CTC TTC TGG ATT 3'	455 bp	b
	R: 5' CGA AGA GCT AGC GAT GTT TCG 3'		b
<i>esp</i>	F: 5' TTA CCA AGA TGG TTC TGT AGG CAC 3'	913 bp	c
	R: 5' CTT TTT TCT TTC CAA GTA TAC TTA G 3'		b

a- Eaton & Gasson (2001); b- Our study; c- Mannu et al. (2003); bp- base pairs.

Table 2. Different gelatinase phenotypes and genotypes found in the enterococcal isolates in 1st and 12th generation.

	1 st generation	12 th generation
Presence of <i>esp</i> gene	0	0
Presence of <i>gelE</i> gene	37	22
Gelatinase activity	34	33
Presence operon <i>fsr</i> *	35	23
Presence <i>sprE</i>	34	20
Presence <i>gelE</i> and gelatinase activity	33	18

* all three *fsr* genes were present

Table 3. *In vitro* antimicrobial susceptibility for the enterococci isolates

Antimicrobial tested	Susceptible isolates/total strains (%)	
	1 st generation	12 st generation
Ampicillin	40/40 (100)	40/40 (100)
Gentamicin	40/40 (100)	40/40 (100)
Chloramphenicol	21/40 (52.5)	32/40 (80)
Tetracycline	2/40 (5)	2/40 (5)
Erythromycin	26/40 (65)	27/40 (67.5)
Vancomycin	38/40 (95)	38/40 (95)
Ciprofloxacin	34/40 (85)	34/40 (85)

*Based on published Clinical Laboratory Standards Institutes (CLSI, 2002).

Table 4. *In vitro* antiseptic and disinfectant susceptibility for the enterococci isolates.

Disinfectants and antiseptic tested	Susceptible isolates/total strains (%)	
	1 st generation	12 th generation
Formaldehyde solution 7,9%	39/40 (97.5)	40/40 (100)
Linear alkylbenzene sulphonate	0/40 (0)	0/40 (0)
Sodium hypochlorite 8,5%	14/40 (35)	2/40 (5)
Triclosan liquid 0.3%	0/40 (0)	0/40 (0)
Chlorhexidine digluconate 10mg/mL	34/40 (85)	1/40 (2.5)

*Based on Johnson & Case (1995) interpretative criteria.

5 CONCLUSÃO

- a. A produção de gelatinase está presente no gênero *Enterococcus*.
- b. A presença dos genes *gelE*, operon-*fsr* e *sprE* foram detectados entre os isolados. Nenhum dos isolados apresentou o gene *esp*.
- c. A presença do gene *gelE* e/ou operon-*fsr* não está relacionada com a atividade gelatinolítica. O gene *fsrB* parece ser essencial para a atividade gelatinolítica.
- d. A ausência dos genes *gelE*, *sprE*, *fsrA* e *fsrC* e da atividade gelatinolítica pode ocorrer durante a subcultura em laboratório.
- e. Houve um aumento de isolados susceptíveis a antimicrobianos e alguns desinfetantes durante a subcultura no laboratório. Entretanto, outros isolados apresentaram resistência a anti-sépticos e desinfetantes após a subcultura.
- f. Todos os *Enterococcus* sp. isolados de frango foram capazes de produzir biofilme na 1^o e na 12^o geração.
- h. Os genes *esp*, *gelE*, *fsrA* e *fsrC* pareceram não ser necessários para a capacidade de formação de biofilme, porém a produção de gelatinase parece ser requerida.

REFERÊNCIAS

- AL-DOORI, Z et al. Susceptibility of MRSA to triclosan *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 51, p. 185-186, 2003.
- AMBADOYIANNIS, G. et al. Probiotic and technological properties of Enterococci isolation from infants and cheese. *Food Biotechnology*, v. 18, p. 307–325, 2004.
- ANDERSON, R. L. et al. Effect of disinfectants on pseudomonads colonized on the interior surface of PVC pipes. *Am. J. Public Health*, v. 80, p. 17–21, 1990.
- ARCIOLA, C. R. et al. Strong biofilm production, antibiotic multi-resistance and high gelE expression in epidemic clones of *Enterococcus faecalis* from orthopaedic implant infections. *Biomaterials*, v. 29, p. 580–586, 2008.
- ARTHUR, M.; MOLINAS, C.; DEPARDIEU, F. Characterization of TN1546, a TN3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *Journal of bacteriology*, v. 175, n. 1, p. 117-127, 1993.
- BARKVOLL, P.; ROLLA G. Triclosan protects the skin against dermatitis caused by sodium lauryl sulphate exposure. *Clin. Periodontol*, v. 21, p. 717–719, 1994.
- BASRANI, B. et al. Efficacy of chlorhexidine- and calcium hydroxide-containing medicaments against *Enterococcus faecalis* in vitro *Oral. Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v. 96, p. 618-24, 2003.
- BAYLISS, C. E.; WAITES, W. M.; KING, N. R. Resistance and structure of spores of *Bacillus subtilis*. *J. Appl. Bacteriol*, v. 50, p. 379–390, 1981.
- BECQUET, P. EU assessment of enterococci as feed additives. *Int J Food Microbiol*, v. 88, p. 247–254, 2003.
- BEIER, R. C. et al. Chlorhexidine susceptibility, virulence factors, and antibiotic resistance of beta-hemolytic *Escherichia coli* isolated from neonatal swine with diarrhea. *Bull Environ Contam Toxicol*, n. 75, p. 835–844, 2005.
- BLOCK, S. S. Historical review, In: _____. (ed.). *Disinfection, sterilization, and preservation*, 4. ed. Lea & Febiger. p. 3-17, 1991.
- BONTEN, M. J. M.; WILLEMS, R.; WEINSTEIN, R. A. Vancomycin-resistant enterococci: why they are here, and where do they come from? *Lancet Infect. Dis.* v. 1, p. 314-325, 2001.
- BOULANGE-PETERMAN, L.; BARROUX, B.; BELLON-FONTAINE, M. N. The influence of metallic wettability on bacterial adhesion. *J Adhesion Sci Technol*, v. 7, n. 3, p. 221-30, 1993.

BOWER, C. K.; MCGUIRE, J.; DAESCHEL, M. A. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food contact surfaces. *Trends Food Sci Technol*, v. 7, p. 152-7, 1996.

COOKSON, B. D. et al. Transferable resistance to triclosan in MRSA. *Lancet*, v. 337, p. 1548–1549, 1992.

CRETI, R. et al. Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. *J Med Microbiol*, v. 53, p. 13– 20, 2004.

CUCARELLA, C. et al. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J. Bacteriol.*, 2001.

DAHLEN, G. et al. Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. *Oral Microbiology and Immunology*, v. 15, p. 309–12, 2000.

DE VUYST, L. Technology aspects related to the application of functional starter cultures. *Food Technology and Biotechnology*, v. 38, p. 105–112, 2000.

DE VUYST, L.; FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; REVETS, H. Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *International Journal of Food Microbiology*, v. 84, p. 299–318, 2003.

DELANY, G. M. et al. The effect of chlorhexidine gluconate irrigation on the root canal flora of freshly extracted necrotic teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, v. 53, p. 518-23, 1982.

DENGER, K.; COOK, A. M. Linear alkylbenzenesulfonate (LAS) bioavailable to anaerobic bacteria as a source of sulfur. *J Appl Microbiol*, v. 86, p. 65–168, 1999.

DENNIS, W. H.; OLIVIERI, V. P.; KRUSE, C. W. The reaction of nucleotides with aqueous hypochlorous acid. *Water Res*, v. 13, p. 357–362, 1979.

DEVRIESE, L. A. et al. Identification and composition of the streptococcal and enterococcal flora of tonsils, intestines and faeces of pigs. *J. Appl. Bacteriol*, v. 77, p. 31–36, 1994.

DYCHDALA, G. R. Chlorine and chlorine compounds. In: BLOCK, S. S. (ed.), *Disinfection, sterilization, and preservation*. 4. ed. Lea & Febiger, Philadelphia, Pa, p. 131–151, 1991.

EATON, T. J.; GASSON, M. J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Biol*, v. 67, p. 1628-1635, 2001.

EEDE, G. et al. The relevance of gene transfer to the safety of food and feed derived from genetically modified (GM) plants. *Food and Chemical Toxicology*, v. 42, p. 1127–1156, 2004.

ELSGAARD, L.; PETERSEN, S. O.; DEBOSZ, K., Effects and risk assessment of linear alkylbenzene sulfonates in agricultural soil 1 Short-term effects soil microbiology. *Environ. Toxicol. Chem.*, v. 20, p. 1656–1663, 2001.

ENGELBERT, M. et al. Contribution of gelatinase, serine protease, and *fsr* to the pathogenesis of *Enterococcus faecalis* endophthalmitis. *Infect. Immun.*, v. 72, p. 3628–3633, 2004.

FACKLAN, R. R.; SAHM, D. F.; TEIXEIRA, L. M. *Enterococcus*. In: MURRAY, P. R. et al. *Manual of Clinical Microbiology*. 7. ed. Washington: ASM PRESS, p. 297-305, 1999.

FACKLAN, R. What happened to streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 15, p. 613–630, 2002.

FAO/WHO. Joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food. 2001. Disponível em: <http://www.fao.org/es/esn/Probio/report.pdf>. Acesso em: 4 out. 2008.

FOULQUIÉ-MORENO M. R. et al. The role and application of enterococci in food and health. *Int J Food Microbiol.*, v. 106, p. 1–24, 2006.

FONTANA, R.; LIGOZZI, M.; PITTALUGA, F.; SATTA, G. Intrinsic penicillin resistance in enterococci. *Microb. Drug Resist.*, v. 2, p. 209–213, 1996.

FORTINA, M. G. et al. Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveals *Enterococcus italicus* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 54, p. 1717–1721, 2004.

FRAENKEL-CONRAT, H.; OLCOTT, H. S. Reaction of formaldehyde with proteins. II. Participation of the guanidyl groups and evidence of cross-linking. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 68, p. 34–37, 1946.

FRAGA, M.; PERELMUTER, K.; DELUCCHI, L.; CIDADE, E.; ZUNINO, P. Vaginal lactic acid bacteria in the mare: evaluation of the probiotic potential of native *Lactobacillus* spp. and *Enterococcus* sp. *Strains Antonie van Leeuwenhoek*, v. 93, p. 71–78, 2008.

GEVERS, D.; HUYS, G.; SWINGS, J. In vitro conjugal transfer of tetracycline resistance from *Lactobacillus* isolates to other Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 225, n. 1, p. 125-130, 2003.

GILMORE, M. S.; PILLAR, C. M. Enterococcal virulence-pathogenicity island of *E. faecalis*. *Front Biosci*, v. 9, p. 2335-2346, 2003.

GIRAFFA, G.; OLIVARI, A. M.; NEVIANI, E. Isolation of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* from Italian cheeses. *Food Microbiology*, v. 17, p. 671–677, 2000.

GIRAFFA, G. Funcionality of enterococci in dairy products. *Int J Food Microbiol*, v. 88, p. 215-222, 2003.

GORMAN, R. et al. A study of crosscontamination of food-borne pathogens in the domestic kitchen in the Republic of Ireland. *Int. J. Food. Microbiol*, v. 76, p. 143–150, 2002.

HANCOCK, L. E; PEREGO, M. The *Enterococcus faecalis* fsr Two-Component System Controls Biofilm Development through Production of Gelatinase. *Journal of Bacteriology*, v. 186, n. 17, p. 5629–5639, 2004.

HANDWERGER, S.; SKOBLE, J. Identification of chromosomal mobile element conferring highlevel vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother*, v. 39, p. 2446-53, 1995.

HERNÁNDEZ, E. B. Aminoglucósidos. *Acta Médica*, v. 8, n. 1, p. 48:53, 1998.

HICKS S. J.; ROWBURYD, R. J. Virulence plasmid-associated adhesion of *Escherichia coli* and its significance for chlorine resistance. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 61, p. 209-218, 1986.

HOLAH, J. T.; THORNE, R. H. Cleanability in relation to bacterial retention on unused and abraded domestic sink materials. *J Appl Bacteriol*, v. 69, p. 599-608, 1990.

INNINGS, A.; KRABBE, M.; ULLBERG, M.; HERRMANN, B. Identification of 43 *Streptococcus* species by pyrosequencing analysis of the *rnpB* gene. *J. Clin. Microbiol*, v. 43, p. 5983–5991, 2005.

JEANSONNE, M. J.; WHITE, R. R. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J Endod*, v. 20, p. 276-8, 1994.

JHA, A. K.; BAIS, H. P.; VIVANCO, J. M. *Enterococcus faecalis* mammalian virulence-related factors exhibit potent pathogenicity in the *Arabidopsis thaliana* plant model. *Infect. Immun.*, v. 73, p. 464–475, 2005.

KAULFERS, P. M.; KARCH, H.; LAUFS, R. Plasmid-mediated formaldehyde resistance in *Serratia marcescens* and *Escherichia coli*: alterations in the cell surface. *Zentbl. Bakteriол. Parasitol. Infektionskr. Hyg. I Abt. Orig. Reihe A*, v. 226, p. 239–248, 1987.

KAULFERS, P. M.; MASQUARDT, A. Demonstration of formaldehyde dehydrogenase activity in formaldehyde-resistant *Enterobacteriaceae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 65, p. 335–338, 1991.

KLEESSEN, B.; BLAUT, M. Modulation of gut mucosal biofilms. *Br J Nutr*. v. 93. p.35–40. 2005.

KOLAR, M. et al. The influence of antibiotic use on the occurrence of vancomycin-resistance enterococci. *Journal of clinical pharmacy & therapeutics*, v. 31, n. 1, p. 67-72, 2006.

KOLAWOLE, D. O. Resistance mechanisms of mucoid-grown *Staphylococcus aureus* to the antibacterial action of some disinfectants and antiseptics. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 25, p. 205–209, 1984.

KUHN, I.; IVERSEN, A.; MFLBY, R. The PhenePlatek system for studies of the diversity of enterococcal populations from the food chain and the environment. *International Journal of Food Microbiology*, v. 88, p. 189–196, 2003.

LAZO, J. S.; BRUNTON, L. L.; PARKER, K. L. Goodman e Gilman as bases farmacológicas da terapêutica. Rio de Janeiro: McGraw Hill, p. 999-1055. 2006.

LEROY, F.; DE VUYST, Luc. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, v. 15, p. 67–78, 2004.

LIE, T. J. et al. Sulfonates: novel electron acceptors in anaerobic respiration. *Arch Microbiol*, v. 166, p. 204–210, 1996.

LOPES, M. F. S. et al. Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci. *International journal of food microbiology*, v. 112, p. 208-214, 2006.

MAADANI, A. et al. *Enterococcus faecalis* Mutations Affecting Virulence in the *Caenorhabditis elegans* Model Host. *Infection and Immunity*, v. 75, n. 5, p. 2634–2637, 2007.

MAFU, A. A. et al. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene and rubber surfaces after short contact time. *J Food Prot*, v. 53, n. 9, p. 742-6, 1990.

MANERO, A. et al. Characterization of sewage waters by biochemical fingerprinting of Enterococci, *Water Res.*, v. 36, p. 2831–2835. 2002.

MANNU, L. et al. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* of animal and clinical origin. *Int J Food Microbiol*, v. 88, p. 291-304, 2003.

MAROTHI, Y. A.; AGNIHOTRI, H.; DUBEY, D. Enterococcal resistance – an overview. *Indian Journal of medical microbiology*, v. 4, n. 23, 214-219, 2005.

MCDONNELL, G.; RUSSELL, D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 12, p. 147-179, 1999.

MORRISON, D.; WOODFORD, N.; COOKSON, B. Enterococci as emerging pathogens of humans. *J Appl Microbiol Symp Suppl*, v. 83, p. 89S–99S, 1997.

MUNDY, L. M.; SAHM, D. F.; GILMORE, M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 13, p. 5130-522, 2000.

MURRAY, B. E. Beta-lactamase-producing enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 36, p. 2355–2359, 1992.

MURRAY, P. R. et al. *Microbiologia Médica. Trad. Patrícia J. Vouex. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1998. 172 p.*

MYLONAKIS, E., M. et al. The *Enterococcus faecalis* *fsrB* gene, a key component of the *fsr* quorum-sensing system, is associated with virulence in the rabbit endophthalmitis model. *Infect. Immun.*, v. 70, p. 4678–4681, 2002.

NAKAYAMA, J. et al. Gelatinase biosynthesis-activating pheromone: a peptide lactone that mediates a quorum sensing in *Enterococcus faecalis*. *Mol. Microbiol.*, v. 41, p. 145–154, 2001.

NAKAYAMA, J.; KARIYAMA, R.; KUMON, H. Description of a 23.9-kilobase chromosomal deletion containing a region encoding *fsr* genes which mainly determines the gelatinase-negative phenotype of clinical isolates of *Enterococcus faecalis* in urine. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 68, p. 3152–3155, 2002.

ONO, S.; MURATANI, T.; MATSUMOTO, T. Mechanisms of Resistance to Imipenem and Ampicillin in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 49, n. 7, p. 2954–2958, 2005.

PILLAI, S. K., G. et al. Prevalence of the *fsr* locus in *Enterococcus faecalis* infections. *J. Clin. Microbiol.*, v. 40, p. 2651-2652, 2002.

PODBIELSKI, A.; KREIKEMEYER, B. Cell density — dependent regulation: basic principles and effects on the virulence of Gram-positive cocci. *International Journal of Infectious Diseases*. v. 8 p.81—95. 2004.

POETA, P.; ANTUNES, T.; RODRIGUES, J. *Enterococcus* sp. resistentes à vancomicina isolados de fezes de frangos, pombos, gamos e ratos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 58, n. 3, p. 412-414, 2005.

POETA, P. et al. Antimicrobial resistance and the mechanisms implicated in faecal enterococci from healthy humans, poultry and pets in Portugal. *Int J Antimicrob Agents*, v. 27, p. 131–137, 2006.

POETA, P. et al. Characterization of *vanA*-Containing *Enterococcus faecium* Isolates Carrying Tn5397-Like and Tn916/Tn1545-Like Transposons in Wild Boars (*Sus Scrofa*). *Microbial Drug Resistance*, v.13, n. 3, p. 151-156, 2007.

PSONI, L. et al. Genotypic and phenotypic heterogeneity in *Enterococcus* isolates from Batzos, a raw goat milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, v. 109, p. 109–120, 2006.

QIN, X. et al. Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. *Infect. Immun.*, v. 68, p. 2579–2586, 2000.

REID, G. E. et al. Oral use of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and L and fermentum RC-14 significantly alters vaginal flora: randomized, placebocontrolled trial in 64 healthy women. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, v. 35, p. 131–134, 2003.

REMONATTO, G. et al. Detecção Molecular da Resistência Bacteriana - Ênfase para *Enterococcus* e *Streptococcus* *NewsLab*, edição 70, 2005.

ROBERTS, J. C. et al. Molecular epidemiology of the *fsr* locus and of gelatinase production among different subsets of *Enterococcus faecalis* isolates. *J Clin Microbiol.*, v. 42, p. 2317–2320, 2004.

SANZ, J. L., et al. Anaerobic biodegradation of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in Upflow anaerobic sludge Blanket (UASB) reactors. *Biodegradation*, v. 14, p. 57–64, 2003.

SARANTINOPOULOS, P.; KALANTZOPOULOS, G.; TSAKALIDOU, E. Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese. *International Journal of Food Microbiology*, v. 76, p. 93-105, 2002.

SCHMIDTCHEN, A. et al. Proteinases of common pathogenic bacteria degradeandin activate the antibacterial peptide LL-37. *Mol. Microbiol.*, v. 46, p. 157–168, 2002.

SCHWUGER, M. J.; BARTNIK, F. G. Interaction of anionic surfactants with proteins, enzymes and membranes. In: GLOXHUBER, C. (Ed.). *Effects of Organic Contaminants in Sewage Sludge on Soil Fertility Plants and Animals*. Marcel Dekker, NY, USA. 1980.

SEMEDO, T. et al. Virulence factors in food, clinical and reference enterococci: a common trait in the genus? *Syst Appl Microbiol*, v. 26, p. 13-22, 2003.

SHANKAR, V. et al. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infect. Immun.*, v. 67, p. 193–200, 1999.

SIFRI, C. D. et al. Virulence effect of *Enterococcus faecalis* protease genes and the quorum-sensing locus *fsr* in *Caenorhabditis elegans* and mice. *Infect. Immun.* V. 70, p. 5647–5650, 2002.

SINGH, K. V. et al. *Fsr*-independent production of protease(s) may explain the lack of attenuation of an *Enterococcus faecalis* *fsr* mutant versus a *gelE-sprE* mutant in induction of endocarditis. *Infect. Immun.*, v. 73, p. 4888–4894, 2005.

SPERA, R. V.; FARBER, B. F. Multidrug-resistant *Enterococcus faecium*: an untreatable nosocomial pathogen. *Drugs*, v. 48, p. 678-88, 1994.

STALHAMMAR-CARLEMALM, M. et al. The R28 protein of *Streptococcus pyogenes* is related to several group B surface proteins, confers protective immunity and promotes binding to human epithelial cells. *Mol. Microbiol.*, v. 33, p. 208-219, 1999.

STROMPFOVÁ, V.; LAUKOVÁ, A.; MUDROJNOVÁ, D., Effect of bacteriocin-like substance produced by *Enterococcus faecium* EF55 on the composition of avian gastrointestinal microflora. *Acta Veterinaria Brno*, v. 72, p. 559–564, 2003.

TEIXEIRA, L. M. et al. *Enterococcus porcinus* sp. nov. and *Enterococcus ratti* sp. nov., associated with enteric disorders in animals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 51, p. 1737–1743, 2001.

VERGIS, E. N. et al. Association between the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin, and enterococcal surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. *Clin Infect Dis.*, v. 35, p. 570–575, 2002.

WAAR, K. et al. Genotyping and incidence of virulence factors of *Enterococcus faecalis* in liver transplant patients differ from blood and fecal isolates. *J. Infect. Dis.*, v. 185, p. 1121-1127, 2002.

WILLEMS, R. J. et al. Variant *esp* gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. *Lancet.*, v. 357, p. 853–5, 2001.

YOON, M. Y.; YOUNG, J. K.; HWANG, H. J. Properties and safety aspects of *Enterococcus faecium* strains isolated from Chungkukjang, a fermented soy product *Lebensmittel - Wissenschaft Technologie*, v. 41, n. 5, p. 925-933, 2008.

ZENG, J.; TENG, F.; MURRAY, B. E. Gelatinase is important for translocation of *Enterococcus faecalis* across polarized human enterocyte-like T84 cells. *Infect. Immun.*, v. 73, p. 1606–1612, 2005.

ZHANEL, G. G. et al. The glycolcyclines: a comparative review with the tetracyclines. *Drugs*, v. 64, p. 63-88, 2004.

APÊNDICE

Apêndice 1 – Comparação das médias da formação de biofilme na 1ª e 12ª geração

Amostra	Geração	n	Média ± DP	Média rank (+)	Soma rank (+)	Sig.
1.	1	6	181,0 ± 10,31	3,50	21,0	0,028
	12	6	808,33 ± 17,46			
2.	1	6	807,66 ± 54,37	3,50	21,0	0,028
	12	6	179,00 ± 52,19			
3.	1	6	139,66 ± 13,80	3,50	21,0	0,028
	12	6	355,66 ± 25,16			
4.	1	6	225,50 ± 98,94	3,50	21,0	0,028
	12	6	104,33 ± 9,62			
5.	1	6	188,50 ± 23,46	4,50	18,00	0,116
	12	6	220,16 ± 21,47			
6.	1	6	123,33 ± 10,57	3,50	21,0	0,028
	12	6	451,16 ± 32,13			
7.	1	6	290,16 ± 62,83	3,50	21,0	0,028
	12	6	110,00 ± 17,16			
8.	1	6	220,66 ± 21,90	3,50	21,0	0,028
	12	6	157,83 ± 19,41			
9.	1	6	123,33 ± 10,57	3,50	21,0	0,028
	12	6	346,66 ± 42,17			
10.	1	6	115,33 ± 9,35	3,50	21,0	0,028
	12	6	288,50 ± 34,37			
11.	1	6	133,00 ± 5,93	3,50	21,0	0,028
	12	6	355,66 ± 25,16			
12.	1	6	165,16 ± 15,23	3,50	21,0	0,028
	12	6	246,83 ± 19,71			
13.	1	6	517,50 ± 20,78	3,50	21,0	0,028
	12	6	346,66 ± 42,17			
14.	1	6	165,16 ± 14,30	3,50	21,0	0,028
	12	6	349,83 ± 48,13			
15.	1	6	174,16 ± 28,13	4,50	18,00	0,116
	12	6	199,00 ± 23,67			
16.	1	6	189,16 ± 93,36	3,50	21,00	0,028
	12	6	451,16 ± 32,13			
17.	1	6	120,16 ± 19,34	3,50	21,00	0,028
	12	6	338,83 ± 25,74			
18.	1	6	202,16 ± 45,22	4,00	20,00	0,046
	12	6	245,66 ± 22,54			
19.	1	6	608,83 ± 225,11	3,25	13,00	0,600
	12	6	658,33 ± 220,07			
20.	1	6	298,16 ± 92,03	3,50	21,00	0,028
	12	6	855,66 ± 174,49			
21.	1	6	292,00 ± 53,68	3,80	19,00	0,075
	12	6	509,16 ± 227,88			
22.	1	6	310,50 ± 67,39	3,50	21,00	0,028

	12	6	441,00 ± 50,83			
	1	6	181,16 ± 62,49			
23.	12	6	658,33 ± 220,07	3,50	21,00	0,028
	1	6	167,00 ± 13,76			
24.	12	6	298,16 ± 92,03	3,50	21,00	0,028
	1	6	130,00 ± 20,98			
25.	12	6	292,00 ± 53,68	3,50	21,00	0,028
	1	6	187,83 ± 44,42			
26.	12	6	441,00 ± 50,83	3,50	21,00	0,028
	1	6	103,50 ± 13,56			
27.	12	6	367,83 ± 86,66	3,50	21,00	0,028
	1	6	125,16 ± 20,82			
28.	12	6	330,66 ± 115,47	3,50	21,00	0,028
	1	6	163,00 ± 27,35			
29.	12	6	2529,83 ± 79,65	3,50	21,00	0,028
	1	6	114,50 ± 22,63			
30.	12	6	281,00 ± 81,20	3,50	21,00	0,027
	1	6	148,66 ± 12,33			
31.	12	6	363,50 ± 79,18	3,50	21,00	0,028
	1	6	124,16 ± 15,34			
32.	12	6	284,83 ± 41,50	3,50	21,00	0,028
	1	6	118,33 ± 21,09			
33.	12	6	302,33 ± 59,60	3,50	21,00	0,028
	1	6	95,83 ± 39,11			
34.	12	6	496,00 ± 26,85	3,50	21,00	0,028
	1	6	102,50 ± 25,30			
35.	12	6	271,33 ± 63,19	3,50	21,00	0,028
	1	6	184,66 ± 23,13			
36.	12	6	219,00 ± 45,93	4,50	18,00	0,116
	1	6	140,16 ± 27,70			
37.	12	6	333,16 ± 3,37	3,50	21,00	0,028
	1	6	154,33 ± 30,71			
38.	12	6	2567,66 ± 40,01	3,50	21,00	0,028
	1	6	147,33 ± 28,08			
39.	12	6	266,50 ± 2,07	3,50	21,00	0,028
	1	6	137,16 ± 15,79			
40.	12	6	342,50 ± 2,50	3,50	21,00	0,028

DP = desvio-padrão

Sig. = Significância