



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

DANIELLE KARINE OHASHI

**FORMAÇÃO DE BIOFILME E GENES RELACIONADOS À  
CONSTITUIÇÃO DOS PILI EM ISOLADOS DE *Enterococcus  
faecalis***

---

Londrina  
2016

DANIELLE KARINE OHASHI

**FORMAÇÃO DE BIOFILME E GENES RELACIONADOS À  
CONSTITUIÇÃO DOS PILI EM ISOLADOS DE *Enterococcus  
faecalis***

Dissertação de Mestrado apresentado ao  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia  
da Universidade Estadual de Londrina.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Cristina Furlaneto

Co-orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Furlaneto -  
Maia

Londrina  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Ohashi, Danielle Karine.

FORMAÇÃO DE BIOFILME E GENES RELACIONADOS À CONSTITUIÇÃO DO PILI EM ISOLADOS DE *Enterococcus faecalis* / Danielle Karine Ohashi. - Londrina, 2016.  
53 f. : il.

Orientador: Márcia Cristina Furlaneto.

Coorientador: Luciana Furlaneto - Maia.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2016.

Inclui bibliografia.

1. enterococos - Teses. 2. biofilme - Teses. 3. pili - Teses. I. Furlaneto, Márcia Cristina . II. Furlaneto - Maia, Luciana . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IV. Título.

DANIELLE KARINE OHASHI

**FORMAÇÃO DE BIOFILME E GENES RELACIONADOS À  
CONSTITUIÇÃO DOS PILI EM ISOLADOS DE *Enterococcus  
faecalis***

Dissertação de Mestrado apresentado ao  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia  
da Universidade Estadual de Londrina.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Cristina Furlaneto  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alane Tatiana Pereira Moralez  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná –  
UTFPR

---

Prof. Dr. Sérgio Paulo Dejato da Rocha  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 28 de abril de 2016.

Dedico este trabalho a Deus meus pais e familiares que estimularam minha capacidade de progredir, tornando possível que completasse mais uma etapa da minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, que sempre esteve ao meu lado, não permitindo que desanimasse desta batalha, me dando paz e mostrando sempre qual o melhor caminho a seguir.

Antes de qualquer outro agradecimento, preciso agradecer as minhas professoras orientadoras Márcia Cristina Furlaneto e Luciana Furlaneto-Maia, por todo carinho, paciência e dedicação.

A todos os meus familiares e amigos, por todo carinho, paciência e compreensão dedicados a mim nesta longa jornada.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação de Microbiologia.

Aos amigos de laboratório Alane, Aline, Osvaldo, Hugo, Mariana, Giovana, Alisson. Especialmente a Mayara e Kátia os meus mais sinceros agradecimentos por todo ensinamento, paciência e disposição prestados.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para elaboração deste trabalho.

"O insucesso é apenas uma oportunidade para recomeçar de novo com mais inteligência."

Henry Ford

OHASHI, Danielle Karine. **Formação de biofilme e genes relacionados à constituição do pili em isolados de *Enterococcus faecalis***. 52 f. 2016. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

## RESUMO

*Enterococcus* sp. são bactérias amplamente disseminados na natureza e nos seres humanos, sendo que nestes podem ser encontrados como parte da microbiota do trato gastrointestinal. Embora sejam considerados microrganismos comensais podem atuar como patógenos oportunistas causando surtos de infecções. Ainda, são potencialmente formadores de biofilme, o que lhe permite maior facilidade de colonização em superfícies bióticas e abióticas, contribuindo para ineficiência de muitos agentes antimicrobianos e maior adaptabilidade das bactérias em ambientes hospitalares. Esta capacidade de formar biofilme esta relacionada à expressão de vários fatores de virulência, entre eles o operon *ebp*, responsável pela expressão dos pili, na qual desempenham um papel importante na formação do biofilme e adesão das células a superfície do hospedeiro. Os objetivos do presente estudo foram avaliar a frequência dos genes pertencente ao operon *ebp* e sortase C em isolados clínicos de não-clínicos em *E. faecalis*, bem como verificar sua capacidade de formar biofilme em superfície de poliestireno e elastômero de silicone. Entre os genes pertencente ao operon *ebp* o que apresentou maior frequência foi *ebpB* 84%, seguido pelo *ebpA* 58%. Sendo que os isolados de origem não-clínico prevaleceu o perfil genotípico para os genes *ebpAB* e sortase C 31%, já os de origem clínico houve uma prevalência para *ebpBC* e sortase 37,5%. Também foram pesquisados outros genes relacionados à virulência e formação de biofilme na qual *ace*, *asa1* e *geE* apresentaram uma frequência maior que 70% para cada um. Foi testada a capacidade destes isolados em formarem biofilme em superfície de poliestireno, sendo que 95% dos isolados conseguiram formar biofilme. Também averiguou, se a capacidade de formar biofilme poderia ser influenciada usada glicose e íons ferro, na qual ocorreu um aumento e redução respectivamente ( $p < 0,05$ ) da formação de biofilme em superfície de poliestireno. No presente trabalho relatou-se pela primeira vez a formação de biofilme em superfície de elastômero de silicone em isolados de enterococos, sendo este um dos principais constituintes dos dispositivos médicos; na qual maioria dos isolados foram capazes de formar biofilme e quando suplementados com glicose e íons ferro também aumentou e reduziu respectivamente sua formação de biofilme. Utilizou-se a microscopia eletrônica de varredura (M.E.V) para verificar a morfologia e distribuição das células na formação de biofilme nas superfícies de poliestireno e elastômero de silicone. Os dados mostraram que independe da origem dos isolados estes apresentaram uma frequência variada para os genes do operon *ebp* e que a sua presença não prediz que ocorrerá a formação biofilme.

**Palavras-chave:** enterococos; biofilme; pili; fatores de virulência; operon.

OHASHI, Karine Danielle. **Biofilm formation and genes related to the creation of pili in *Enterococcus faecalis***. 52 p. 2016. Dissertation (MSc in Microbiology) - State University of Londrina, Londrina, 2016.

## ABSTRACT

*Enterococcus* spp. are widespread in nature, and they constitute part of the microbiota of the gastrointestinal tract of humans. Despite their commensal nature, they are increasingly considered as opportunistic pathogens responsible for infections. This has been attributed to their ability to form biofilms, which enable them to colonize inert and biological surfaces, adapt to different environments and increase their resistance to antimicrobials. Formation of biofilms among *Enterococcus* spp. is related to a variety of virulence factors; between them the *ebp* operon responsible for expression of pili, which play an important role in biofilm formation and adherence of cells to the surface of the host. Therefore, the objective of this study were to evaluate the frequency of genes belonging to the *ebp* operon and sortase C in non-clinical and clinical isolates of *E. faecalis* and verify their ability to form biofilm on polystyrene surface and silicone elastomer. Among the genes belonging to the *ebp* operon it presented the highest frequency was *ebpB* was 84%, followed by *ebpA* 58%. Being that the isolates in non-clinical origin prevailed the genotypic profile for *ebpAB* genes and sortase C was 31%, already the isolates clinical origin prevailed *ebpBC* and sortase 37.5%. It was also studied other genes related to virulence and biofilm formation in which *ace*, *asa1* and *geiE* showed a higher frequency than 70% for each. It was tested ability of these isolates to form biofilms on polystyrene surface, and 95% of the isolates were able to form biofilms. Also examined, the ability to form biofilm could be influenced used glucose and iron ions in which there was an increase and reduction respectively ( $p < 0.05$ ) of the biofilm formation in microtiter surface. In the present study it was reported for the first time the biofilm formation of silicone elastomer surface enterococci isolates, this being a major constituent of medical devices; in which most of the isolates were able to form biofilms and when supplemented with glucose and iron ions also respectively increased and reduced its biofilm formation. We used the scanning electron microscopy (S.E.M) to determine the morphology and distribution of the cells in biofilm formation on the polystyrene surfaces and elastomer silicone. The data showed that independent of the origin of these isolates showed mixed frequency for genes operon *ebp* and that their presence does not predict that occur biofilm formation.

**Key words:** enterococos; biofilm; pili; virulence fator; operon.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Revisão de Literatura

- Figura 1** – Visão geral de diferentes fatores de virulência em *E. faecalis* .....17
- Figura 2** – Distribuição dos genes do operon *ebp* e *bee* em *E. faecalis*.....18
- Figura 3** – (A) O substrato da sortase é reconhecido devido .....19
- Figura 4** – Esquema representativo da formação de biofilme. ....21

### Artigo

- Figura 1** – Produtos de PCR em gel de agarose 1% para determinação dos genes presentes do operon *ebp* e sortase dos isolados de *E. faecalis*.....35
- Figura 2** – (A) Ilustração da distribuição dos genes *ebp* e *srtC* no operon de *E. faecalis*.....36
- Figura 3** – Percentual relativo da frequência de formação de biofilme dos isolados de *E. faecalis*.....41
- Figura 4** – Análise comparativa da capacidade de formação de biofilme.....42
- Figura 5** – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....44
- Figura 6** – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos isolados 24A e 25A.....46

## LISTA DE TABELAS

### Artigo

<b>Tabela 1</b> – Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para detecção dos genes.....	31
---	----

## SUMÁRIO

1.	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
2.	<b>OBJETIVOS</b> .....	13
3	<b>REVISÃO BIBLIOGRAFICA</b> .....	14
3.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DO GÊNERO <i>ENTEROCOCCUS</i> .....	14
3.2	FATORES DE VIRULÊNCIA EM <i>ENTEROCOCCUS</i> SPP.....	15
3.3	FORMAÇÃO DE BIOFILME.....	20
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	24
<b>FORMAÇÃO DE BIOFILME E DETECÇÃO DOS GENES <i>ebp</i> EM ISOLADOS DE <i>Enterococcus faecalis</i></b>		
1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	28
2.	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	29
3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	33
	<b>CONCLUSÃO</b> .....	47
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	48

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Enterococcus* constitui uma grande proporção das bactérias da microbiota do trato gastrointestinal da maioria dos mamíferos, aves, répteis e insetos. São ubiqüitários e podem ser encontrados amplamente distribuídos no meio ambiente, em solos, na água, em plantas e alimentos, devido à sua robustez biológica, sendo resistentes à dessecação, ao aquecimento, aos agentes sanitizantes e ainda pode competir eficientemente por nutrientes e espaço físico nas mais diferentes situações.

Uma das importâncias dada a este gênero é devido à sua capacidade em causar uma ampla variedade de infecções, sendo as espécies *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* os principais agentes causadores de graves infecções humanas tais como bacteremia, endocardite, infecções do trato urinário, infecções de sítio cirúrgico, abscessos intra-abdominais e intra-pélvicos.

Este gênero tem capacidade para a formação de biofilmes, o que lhe permite uma maior facilidade de colonização de superfícies inertes e biológicas, podendo colonizar cateteres venosos, arteriais e urinários, dispositivos intrauterinos, lentes de contato e próteses contribuindo para inúmeras infecções hospitalares. O biofilme é constituído por uma população de células bacterianas ligadas entre si e a uma superfície, circundada por uma matriz extracelular, favorecendo a sobrevivência bacteriana, contribuindo para ineficiência de muitos agentes antimicrobianos e maior adaptabilidade das bactérias em ambientes hospitalares.

Recentes pesquisas demonstraram que presença dos pili em *E. faecalis* desempenha papel importante na formação do biofilme contribuindo para infecção principalmente no âmbito hospitalar. A formação dos pili em *E. faecalis* é devido à expressão dos genes que compõem o operon *ebp* (*endocarditis and biofilm associated pili*).

Devido ao impacto causado pela formação de biofilme em espécies de enterococos, tanto na resistência quanto na propagação de infecção, e sua correlação com a presença dos pili, este estudo objetivou verificar a presença do operon *ebp* e a formação de biofilme em isolados de *Enterococcus* de origem clínica e não-clínica.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Analisar a frequência dos genes envolvidos na virulência e formação de biofilme em *Enterococcus faecalis*, e sua capacidade em formar biofilme.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a presença dos genes *asa1*, *gelE*, *ace*, *ebpA*, *ebpB*, *ebpC* e *srtC*;
- Observar a formação de biofilme em poliestireno e elastômero de silicone;
- Verificar a influência de íons ferro e glicose na formação de biofilme.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

#### 3.1 Características gerais do gênero *Enterococcus*.

Genericamente, os microrganismos pertencentes ao gênero *Enterococcus* apresentam-se como cocos Gram-positivos, isolados, aos pares ou em pequenas cadeias, podendo apresentar formas ovóides ou cocobacilares, dependendo do meio em que crescem. Algumas espécies podem ser móveis, apresentando poucos flagelos. São anaeróbios facultativos com necessidades nutricionais complexas e um metabolismo fermentativo que resulta em ácido láctico como principal produto da fermentação da glicose, sem produção de gás, sendo consideradas bactérias ácido lácticas (BAL) (HARDIE; WHILEY, 1997). Apresentam capacidade de crescimento entre 10 °C a 45 °C sendo que a temperatura ótima é 37 °C; também conseguem crescer em meios hipersalínicos (6,5% NaCl) (PARADELLA; KOGA-ITO; JORGE, 2007). São considerados quimiorganotróficos, catalase negativa e apresentam usualmente a capacidade de provocar a beta ( $\beta$ ) hemólise de eritrócitos humanos em ágar sangue (CARLOS et al., 2010).

Os enterococos se encontram amplamente disseminados na natureza, podendo ser encontrados na água, solo, alimentos, plantas e animais (RIBOLDI et al., 2009). Em seres humanos podem ser encontrados na microbiota do trato gastrointestinal e geniturinário (TAVARES, 2000). Embora sejam considerados microrganismos comensais, podem atuar como patógenos oportunistas causando surtos de infecções hospitalares de difícil controle, tais como endocardite, bacteremia, sepse neonatal, infecções intra-abdominais, urinárias e colonizando ou causando infecções em feridas superficiais de pacientes hospitalizados tanto no ambiente hospitalar quanto na comunidade (TITZE-DE-ALMEIDA et al., 2006; FISHER; PHILLIPS, 2009).

Atualmente, são conhecidas mais de 53 espécies pertencentes ao gênero *Enterococcus* (EUZÉBY, 2015), sendo as espécies que apresentam maior relevância ao nível sanitário e hospitalar são *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*. (PARADELLA; KOGA-ITO; JORGE, 2007; FISHER; PHILLIPS, 2009).

Em contrapartida os enterococos são considerados importantes na indústria alimentícia devido à sua capacidade para produzir ácido láctico, lipases, proteases e os compostos voláteis que asseguram características organolépticas desejáveis em alguns tipos específicos de alimentos, além de serem usados como probióticos humanos, uma vez que conseguem sobreviver e competir no trato gastrointestinal promovendo o equilíbrio da microbiota. Apesar da sua importância na tecnologia de alimentos, certos recursos, como a capacidade de crescimento em uma ampla faixa de temperatura, salinidade e pH fazem com que estes microrganismos sejam capazes de se multiplicar em vários alimentos (FONSECA, 2010; CAMARGO, 2014).

### **3.2 Fatores de virulência em *Enterococcus* spp.**

Os enterococos apresentam diversos fatores de virulência sendo que os mais conhecidos são a citolisina e enzimas proteolíticas (gelatinase e serina protease), que atacam a célula do hospedeiro; adesinas enterocócicas, tais como substância de agregação, proteína de superfície enterocócica (Esp), adesina ao colágeno de *E. faecalis* (Ace), adesina de colágeno de *E. faecium* (Acm e Scm), antígeno A de *E. faecalis* (EfaAfs) e *E. faecium* (EfaAfm), contribuem com a agregação bacteriana e aderência ao tecido do hospedeiro (FOULQUIÉ MORENO et al., 2006; HENDRICKY, 2009; FISHER; PHILLIPS, 2009). Há também os polissacarídeos capsulares e de parede celular, que contribuem para evasão do sistema imune do hospedeiro (HUFNAGEL et al., 2004).

Ainda, alguns desses fatores de virulência mencionados acima estão relacionados com a capacidade dos enterococos em formar biofilme, como a produção de gelatinase, proteína de superfície enterocócica e presença do pili em *E. faecalis*. Contudo há poucos estudos sobre a presença do pili em *E. faecium* (Fig. 1) (HENDRICKY, 2009; FISHER; PHILLIPS, 2009).

#### **3.2.1 Substância de agregação**

A substância de agregação é uma adesina induzida por ferormônio que medeia à formação de agregados durante a conjugação, auxiliando assim na transferência de plasmídeos (DUPRÉ et al., 2003; PARADELLA; KOGA-ITO; JORGE, 2007; FISHER, PHILIPS, 2009). Existem vários genes que codificam

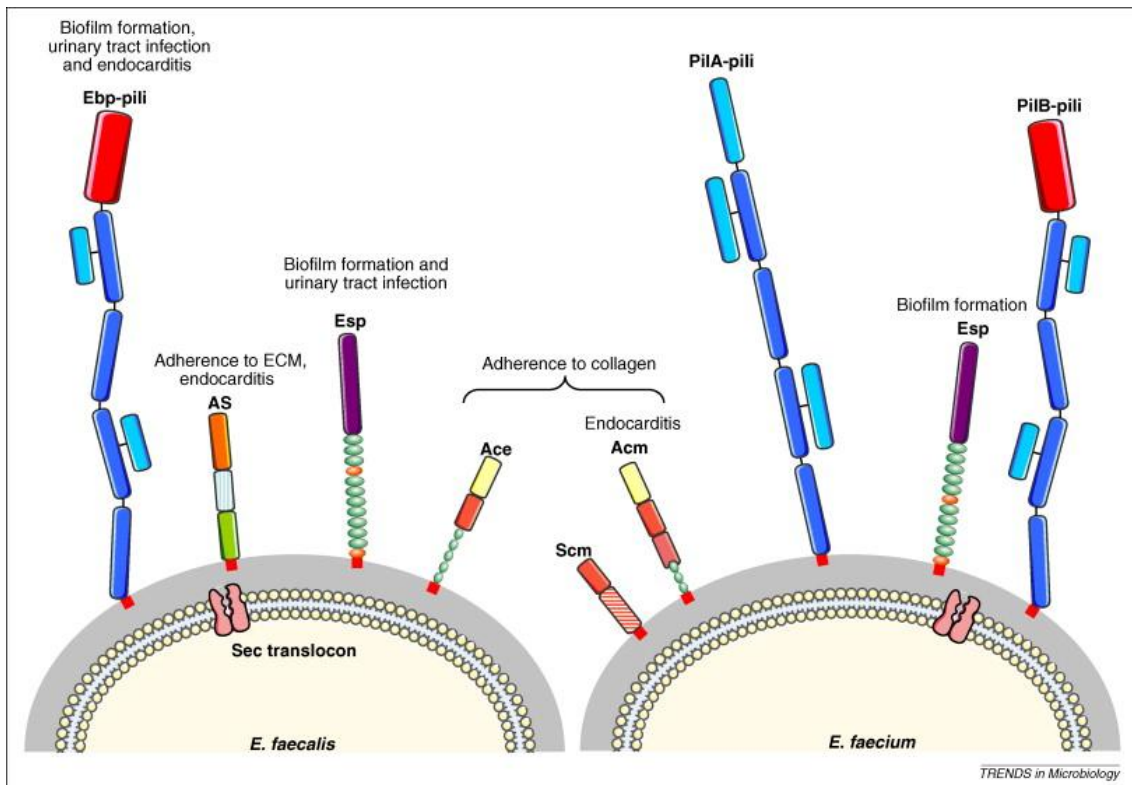
substância de agregação na qual se destaca o *asa1*, responsável pela agregação de bactérias na superfície dos tecidos do hospedeiro, sendo capaz de formar biofilme para proteger contra fatores ambientais desfavoráveis (GOLIŃSKA et al., 2013).

### **3.2.2 Proteína de adesão ao colágeno**

Adesina de colágeno (Ace) é uma proteína de superfície celular específica de *E. faecalis*, e tem sido demonstrada por mediar a ligação da bactéria as proteínas da matriz extracelular, colágenos tipo I e IV podendo desempenhar um papel na patogênese de endocardites (NALLAPAREDY et al., 2000; KOCH et al., 2004). A expressão de Ace é induzida significativamente por altas temperaturas (culturas em 46 °C) e *in vivo* pela presença de soro ou componentes da matriz extracelular, indicando a existência de diferentes mecanismos de regulação durante a infecção (LEBRETON et al., 2009).

### **3.2.3 Gelatinase**

A enzima gelatinase é uma metaloprotease codificada pelo gene *ge/E*, tem capacidade de hidrolisar gelatina, colágeno, caseína, hemoglobina e outros peptídeos de pequenas dimensões e biologicamente ativos, fornecendo nutrientes para as bactérias a partir da degradação do tecido do hospedeiro, além de contribuir para formação do biofilme (KOCH et al., 2004; FISHER; PHILIPS, 2009). Estudos observaram que a presença da gelatinase não ocorre somente em amostras de origem clínica, mas também em amostras alimentares (LOPES et al., 2006; ABRIOUEL et al., 2008; ROCHA, 2012).



**Figura 1** - Visão geral de diferentes fatores de virulência em *E. faecalis* e *E. faecium*.  
**Fonte:** (HENDRICKY, 2009).

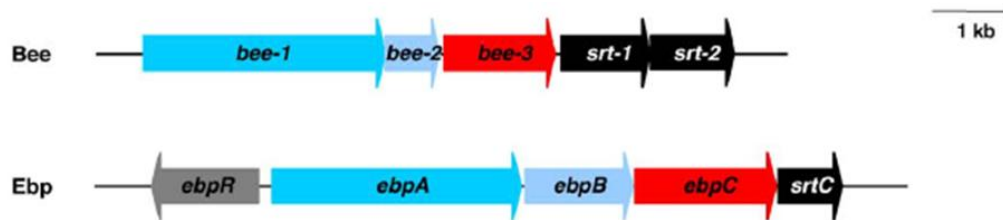
### 3.2.4 Pili

Pili em bactérias Gram-positivas foram descritos pela primeira vez em *Corynebacterium renale* e posteriormente foi observado em muitos microrganismos Gram-positivos potencialmente patogênicos tais como, *C. diphtheriae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *E. faecalis*, e *Actinomyces naeslundii*, entre outros (DANNE; DRAMSI, 2012).

Assim como em bactérias patogênicas Gram-negativas, os pili das bactérias Gram-positivas parecem desempenhar um papel importante na adesão da célula à superfície do hospedeiro (BUDZIK; SHNEEWIND, 2006).

*E. faecalis* possui dois *locus* relacionados à formação dos pili: *ebp* (*endocarditis and biofilm associated pili*) que faz parte do cromossomo e é altamente conservada em uma grande coleção de cepas; e *bee* (*biofilm enhancer in Enterococcus*) presentes em cerca de 1% das cepas, sendo localizado em plasmídeo (Fig. 2) (DANNE; DRAMSI, 2012). O operon *ebp* é constituído pelos

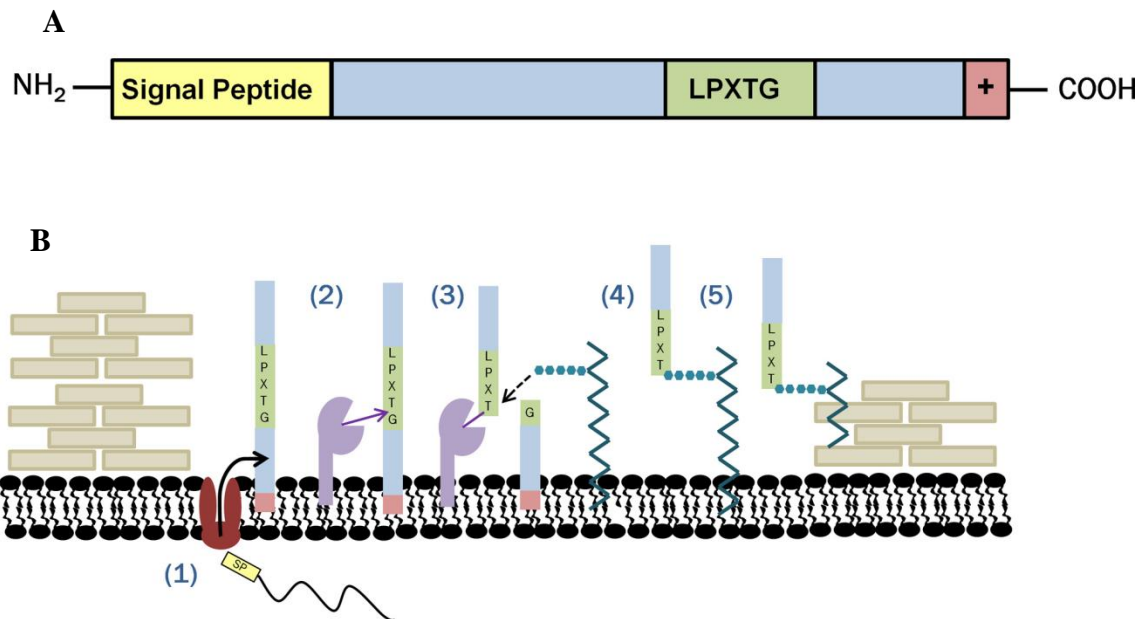
genes *ebpA*, *ebpB* e *ebpC* e uma *srtC* associada (que codifica sortase C) (NALLAPAREDDY et al., 2006).



**Figura 2** – Distribuição dos genes do operon *ebp* e *bee* e suas respectivas sortases (*srt*) em *E. faecalis*; **Fonte:** Hendricky, (2009).

Os pili são formados por três subunidades uma maior e duas subunidades menores na qual *ebpC* corresponde eixo principal, *ebpA* e *ebpB* codificam as subunidades menores, na qual estão localizadas na base e a outra na ponta da fibra respectivamente, podendo facilitar a interação com a ancoragem na parede celular através da sortase C e com as proteínas do hospedeiro (NALLAPAREDDY et al. 2006; NIELSEN et al., 2013).

Uma característica da formação dos pili nas bactérias Gram-positivas é que uma sortase específica é dedicada à sua montagem, sendo construído por reticulação de várias classes de proteínas precursoras, ligando covalentemente as proteínas ancoradas com um terminal C, motivo LPxTG ao peptidoglicano (Fig. 3). *E. faecalis* contém duas classes de sortase: sortase A, que liga as proteínas com um terminal C motivo com o peptidoglicano da parede celular, enquanto que a sortase C liga as subunidades da pilina (FISHER; PHILLIPS, 2009).



**Figura 3** – (A) O substrato da sortase é reconhecido devido à presença de um peptídeo de sinal N-terminal e um motivo LPxTG conservado (leucina (L), prolina (P), X (representando qualquer substituição de aminoácido), treonina (T), e glicina(G), com um C terminal, seguido por uma série de domínio hidrofóbicos e uma cauda carregada positivamente. (B) Através do sistema Sec ocorre o reconhecimento do peptídeo sinal N-terminal, exportando-o para o exterior da célula. O substrato permanece incorporado na membrana, devido à presença de uma região hidrofóbica terminada por uma cauda carregada positivamente. Uma vez que o substrato e a sortase estão na proximidade, a sortase cliva o alvo entre a glicina e treonina através de uma reação de transpeptidase formando um intermediário acil-enzima com a sortase, esta enzima então reconhece lipídio II como o segundo substrato. Devido à afinidade nucleofílica por lipídio II, ocorre à dissociação da sortase, formando um lipídio intermediário II através da interação com a ponte cruzada com penta peptídeo, a reação termina quando o polímero é incorporado na parede celular através do lipídio intermediário II como parte da construção da parede celular.

**Fonte:** (SWIERCYNYSKI; TON-THAT, 2006; CALL; KLAENHMMER, 2013).

Os pili têm capacidade de mediar à adesão as plaquetas, colágeno e fibrinogênio, sendo estes os principais componentes de vegetação da válvula cardíaca que são colonizados durante endocardite infecciosa. Assim, os pili são considerados um importante fator que contribui para virulência dos enterococos, no desenvolvimento da endocardite, e também desempenha um papel importante na formação do biofilme (DANNE; DRAMSI, 2012).

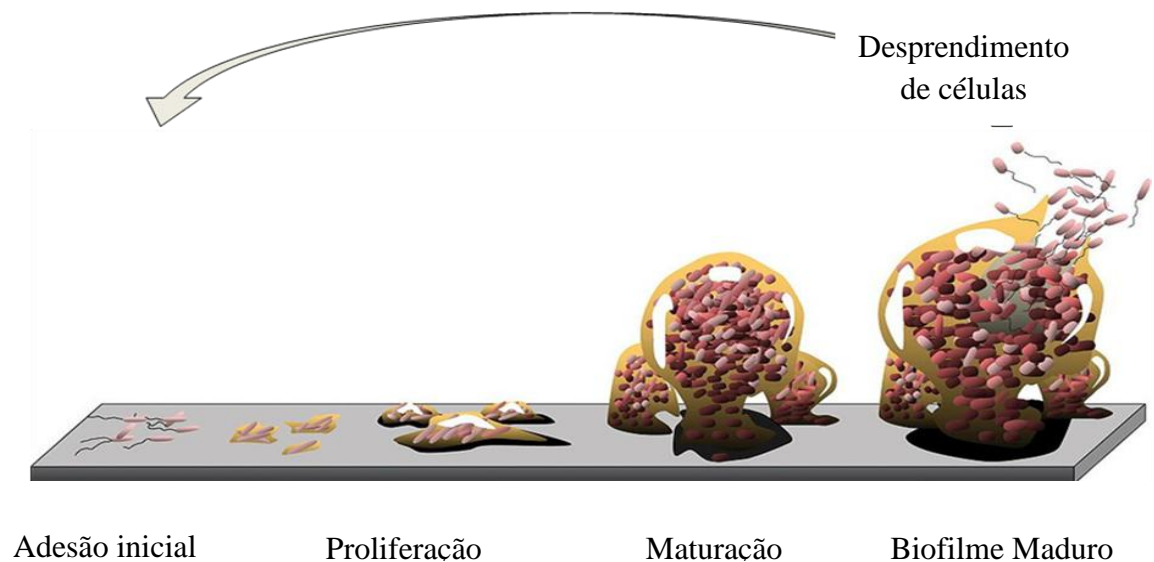
Molinos et al., (2008) demonstraram que os três genes pertencentes ao operon estão presentes na maior parte dos isolados clínicos quando comparados com amostras não clínicas. Alguns trabalhos demonstraram que uma mutação em um dos genes do operon *ebp* (*endocarditis and biofilm associated pili*) envolvido na

expressão dos pili em *E.faecalis* alterou sua capacidade de formação de biofilme em *in vitro* (SINGH; NALLAPAREDDY; MURRAY, 2007).

### 3.3 Formação de Biofilme

Um biofilme é uma população de células ligadas irreversivelmente a uma superfície biótica ou abiótica e circundado por uma matriz extrapolissacarídica contendo ácidos nucléicos, proteínas e outras substâncias (MOHAMED; HUANG, 2007).

A formação de biofilme envolve diversas etapas (Fig.4); inicialmente os microrganismos recebem estímulos que podem provocar a transição da vida livre (planctônica) para uma vida aderida a uma superfície (STOODLEY et al., 2002). O microrganismo aproxima-se da superfície, de forma aleatória (por exemplo, através da corrente sanguínea que passe nas proximidades da superfície) ou diretamente via motilidade e quimiotaxia. Quando o microrganismo alcança uma proximidade crítica com a superfície à adesão inicial depende da geração de forças atração ou repulsão entre as duas superfícies, celular e do substrato de adesão. Forças de repulsão podem ser superadas através de ligações mediadas por moléculas específicas como as adesinas localizadas na superfície celular. Neste ponto microrganismos frouxamente aderidos consolidam o processo de adesão produzindo exopolissacarídeo (EPS) que complementa a ação de ligantes como fímbrias ou pili. Ao final desse processo a adesão torna-se irreversível na ausência de intervenções químicas e/ou físicas, o microrganismo liga-se firmemente a superfície. Durante essa etapa, microrganismos planctônicos podem fixar-se uns aos outros ou a diferentes microrganismos, formando agregados (DUNNE JUNIOR, 2002).



**Figura 4** - Esquema representativo da formação de biofilme em modelo bacteriano.

**Fonte:** adaptado de Monroe, (2007).

Um importante evento fisiológico ocorre durante o período de desenvolvimento do biofilme, que é o aumento da produção de polissacarídeo extracelular. Esta substância envolve as células no interior do biofilme, fortalece a adesão entre as células, promove o suporte estrutural do biofilme e pode agir como receptor para novas interações. O EPS é composto principalmente de proteínas, polissacarídeos e ácidos nucléicos (STOODLEY et al., 2002).

Uma vez que as bactérias estejam ligadas irreversivelmente a uma superfície, o processo de maturação do biofilme inicia-se. A densidade e complexidade do biofilme aumentam à medida que os organismos aderidos iniciam sua replicação e os componentes extracelulares gerados por esses organismos interagem com moléculas orgânicas e inorgânicas do ambiente circundante para formar a matriz. Outros fatores que controlam este amadurecimento são pH, perfusão de oxigênio, fonte de carbono e osmolaridade. Em determinado momento, o biofilme alcança uma massa crítica e um equilíbrio dinâmico é criado de forma que as camadas mais externas do biofilme começam a gerar células planctônicas, ou seja, inicia-se a liberação de células da estrutura formada, sendo capazes de colonizar outras superfícies (DUNNE JUNIOR, 2002).

A formação de biofilmes é considerada uma problemática com relação à área ambiental, industrial e da saúde, devido essas comunidades expressarem

propriedades específicas, tais como o aumento da resistência a antibióticos, a luz UV, a produtos químicos como os biocidas; aumento das taxas de troca de material genético, alteração na biodegradabilidade e aumento na produção de metabólitos secundário (PRAKASH; VEEREGOWDA; KRISHNAPPA, 2003).

### 3.3.1 Biofilme em enterococos

Estudos realizados sugerem que *E. faecalis* produz biofilme com mais frequência do que *E. faecium* e que a formação de biofilme, é um fator importante na patogênese das infecções enterocócicas (MOHAMED; HUANG, 2007). Estas bactérias por conseguirem colonizar vários tipos de superfície, principalmente os dispositivos médicos como cateteres venosos, arteriais e urinários; dispositivos intrauterinos; lentes de contato; e próteses são considerados uma fonte de muitas infecções crônicas como endocardites, otites, prostatites, periodontites, conjuntivites, vaginites e infecções relacionadas à fibrose cística, de acordo com “National Institutes of Health” o biofilme está associados a aproximadamente 80% de todas as infecções médicas no mundo (MOHAMED; HUANG, 2007; HOIBY et al., 2011). O uso de biomateriais tem aumentado significativamente nos últimos anos, e apesar dos grandes avanços que têm sido feitos nesta área, uma grande parte dos dispositivos médicos ainda são colonizados por microrganismos, sendo o elastômero de silicone um dos principais constituintes deste material (LEAL, 2011).

A capacidade de formação de biofilme por enterococos está relacionada com a presença de inúmeros fatores de virulência tais como os genes *esp*, *gelE*, *fsrB*, além toda uma gama de novos genes que acreditam estarem envolvidos na formação destas estruturas como os operons *bee* e *ebp* (SINGH; NALLAPAREDDY; MURRAY, 2007; FONSECA, 2010).

A habilidade destas bactérias em multiplicar e se desenvolver em biofilme pode ser influenciada por vários fatores como temperatura, pH, concentração de carboidrato e disponibilidade do ferro e do CO<sub>2</sub> (MOHAMED; HUANG, 2007). De acordo com Marques (2004), os íons ferro reduzem significativamente a adesão das células bacterianas na formação do biofilme, devido alteração tanto da superfície microbiana quanto do substrato onde o biofilme foi formado.

O metabolismo de carboidratos regula a produção de biofilme entre muitas bactérias. Na presença de glicose várias espécies de enterobactérias tem a

formação de biofilme inibida. Estudos vêm mostrando que em *E. faecalis*, a suplementação de glicose aumenta a formação de biofilme (PILLAI et al., 2004). Baldassarri et al., (2001) demonstrou que o meio Caldo Triptona de Soja (TSB) suplementado com 1% de glicose aumentou a produção de biofilme em *E. faecalis*, comparado com TSB sem glicose.

Devido ao impacto causado pela formação de biofilme e resistência aos antimicrobianos que resulta na causa de inúmeras infecções crônicas, há necessidade de elucidar o mecanismo de formação de biofilme em enterococos.

## REFERÊNCIAS

- ABRIOUEL, H. et al. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. **International Journal of Food Microbiology**, v.123, p. 38-49, 2008.
- BALDASSARRI, L.; CECCHINI, R.; BERTUCCINI, L. *Enterococcus* spp. produces slime and survives in rat peritoneal macrophages. **Medicine Microbiology Immunity**, v.190, p.113-120, 2001.
- BUDZIK, J.M.; SCHNEEWIND, O. Pili prove pertinent to enterococcal endocarditis. **Journal Clinical Investigation**, v.116, p.2582–2584, 2006.
- CALL, E. K.; KLAENHMMER, T. R. Relevance and application of sortase and sortase-dependent proteins in lactic acid bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v.4, p.73, 2013.
- CAMARGO, C. H. et al. Prevalence and phenotypic characterization of *Enterococcus* spp. isolated from food in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.45, p.111-115, 2014.
- CARLOS, A. R. et al. Transcriptional analysis of virulence-related genes in enterococci from distinct origins. **Journal of Applied Microbiology**, v.108, p.1563–1575, 2010.
- DANNE, C.; DRAMSI, S. Pili of Gram-positive bacteria: roles in host colonization. **Microbiology Reviews**, v.163, p.645–658, 2012.
- DUNNE JUNIOR, W. M. Bacterial adhesion: see any good biofilm lately? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p.155-166, 2002.
- DUPRÈ, S. et al. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). **Journal of Medicine Microbiology**, v. 52, p. 491-498, 2003.
- EUZÉBY, J.P. **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature – Genus *Enterococcus***. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/enterococcus.html>> Acesso em: 3 janeiro 2015.
- FISHER, K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, v.155, p.1749-1757, 2009.
- FONSECA, J. F. S. G. **Avaliação da capacidade de adesão e produção de biofilme em enterococos clínicos e alimentares**. 2010. Dissertação (Mestrado Microbiologia Aplicada) Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Lisboa, Portugal.
- FOULQUIÉ-MORENO, M. R. et al. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, p. 1-24, 2006.

GOLIŃSKA, E. et al. Virulence factors of *Enterococcus* strains isolated from patients with inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, p. 3562 – 3572, 2013.

HARDIE, J.; WHILEY, R. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. **Journal of Applied Microbiology**, v.83, p.1S-11S, 1997.

HENDRICKY, A. P. et al. LPxTG surface proteins of enterococci. **Trends in Microbiology**, v.17, p.423–430, 2009.

HOIBY, N. et al. The clinical impact of bacterial biofilms. **International Journal of Oral Sciences**, v.3, p.55-65, 2011.

HUFNAGEL, M. et al. Serological and genetic diversity of capsular polysaccharides in *Enterococcus faecalis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 2548–2557, 2004.

KOCH, S. et al. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. **Vaccine**, v. 22, p. 822-830, 2004.

LEAL, O.D.N. **O uso de surfactantes na prevenção da adesão microbiana a próteses**. 2011.66f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Clínica) Pós-graduação em Engenharia Biológica. Universidade do Minho, Braga.

LEBRETON, Y. et al. Maltose utilization in *Enterococcus faecalis*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 806-813, 2009.

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.

MARQUES, E. B. **Estudo da formação de biofilme em superfícies abiótica: Influência de cátions divalentes e a ocorrência de determinantes de virulência em amostras clínicas de *Enterococcus faecalis***. 2004. 167f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Pós-graduação em Microbiologia, UEL, Londrina.

MOHAMED, J. A.; HUANG, D.B. Biofilm formation by enterococci. **Journal of medical microbiology**, v.12, p.1581-8, 2007.

MOLINOS, C. et al. Detection of *ebp* (endocarditis-and biofilm-associated pilus) genes in enterococcal isolates from clinical and non-clinical origin. **International Journal of Food Microbiology**, v.126, p.123-126, 2008.

MONROE, D. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms, **PLoS Biology**, v. 5, p. 2458-2461, 2007.

NALLAPAREDDY, S. R. et al. Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*. **Journal Clinical Investigation**, v.116, p. 2799–2807, 2006.

NALLAPAREDY, S.R. et al. *Enterococcus faecalis* adhesion, Ace, attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. **Infection Immunity**, v. 9, p. 5218-5224, 2000.

NIELSEN, H.V. et al. Pilin and sortase residues critical for endocarditis- and biofilm-associated pilus biogenesis in *Enterococcus faecalis*, **Journal Bacteriology**, v. 195, p. 4484 –4495, 2013.

PARADELLA, T.C; KOGA-ITO, C.Y; JORGE A.O.C. *Enterococcus faecalis*: considerações clínicas e microbiológicas. **Revista de Odontologia da UNESP**, v.36, p.163-6, 2007.

PILLAI, S.K. et al. Effects of glucose on fsr-mediated biofilm formation in *Enterococcus faecalis*, **Journal of Infection Disease**, v.190, p. 967–970, 2004.

PRAKASH, B.; VEEREGOWDA, B. M.; KRISHNAPPA, G. Biofilms: a survival strategy of bacteria, **Current Science**, v. 85, p.1299.-1306, 2003.

RIBOLDI, G.P. et al. Antimicrobial resistance profile of *Enterococcus* spp. isolated from food in Southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 125-128, 2009.

ROCHA, K. R. **Análise genotípica e fenotípica de *Enterococcus* spp. provenientes de amostras clínicas e de alimento** .2012.70 f..Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Pós-graduação em Microbiologia, UEL, Londrina.

SINGH, K.V.;NALLAPAREDDY, S.R.; MURRAY, B. E. Importance of the *ebp* (endocarditis and biofilm-associated pilus) locus in the pathogenesis of *Enterococcus faecalis* ascending urinary tract infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v.195, p.691-169, 2007.

STOODLEY, P. et al. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, p. 187-209, 2002.

SWIERCZYNSKI, A.; TON-THAT, H. Type III pilus of corynebacteria: pilus length is determined by the level of its major pilin subunit, **Journal of Bacteriology**, v. 188, p. 6318–6325, 2006.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 33, p. 281-301, 2000.

TITZE-DE-ALMEIDA, R. et al. Multilocus sequence typing of hospital-associated *Enterococcus faecium* from Brazil reveals their unique evolutionary history. **Microbial Drug Resistance**, v. 12, p. 121, 2006.

## ARTIGO

### FORMAÇÃO DE BIOFILME E DETECÇÃO DOS GENES *ebp* EM ISOLADOS DE *Enterococcus faecalis*

#### RESUMO

*E. faecalis* é um patógeno oportunista de grande importância clínica e está entre as principais causas de infecções associadas ao biofilme. Estudos demonstram que a presença do operon *ebp*, responsável pela expressão dos pili, desempenham um papel importante na formação do biofilme e adesão das células a superfícies do hospedeiro. Os objetivos do presente estudo foram avaliar a frequência dos genes pertencente ao operon *ebp* e sortase C em isolados clínicos e não-clínicos em *E. faecalis*, bem como verificar sua capacidade de formar biofilme em superfície de poliestireno e elastômero de silicone. Dos genes pertencente ao operon *ebp* o que apresentou maior frequência foi *ebpB* 84%, seguido pelo *ebpA* 58%. Sendo que os isolados de origem não-clínicas prevaleceu os genes *ebpAB* e sortase C 31%, já clínicos houve a prevalência para *ebpBC* e sortase 37,5%. Também foram pesquisados outros genes relacionados a virulência e formação de biofilme na qual *ace*, *asa1* e *ge/E* apresentaram uma frequência maior que 70% para cada um. Foi testado a capacidade destes isolados em formarem biofilme em superfície de poliestireno, sendo que 95% dos isolados conseguiram formar biofilme. Também verificou-se a capacidade de formação de biofilme poderia ser influenciada usada glicose e cloreto de ferro, na qual se constatou um aumento e redução respectivamente ( $p < 0,05$ ) da formação de biofilme em superfície de poliestireno. O presente trabalho relatou pela primeira vez a formação de biofilme em superfície de elastômero de silicone em isolados de enterococos, sendo este um dos principais constituintes dos dispositivos médicos. Na qual maioria dos isolados foram capaz de formar biofilme e quando suplementados com glicose e cloreto de ferro também aumentou e reduziu respectivamente sua formação de biofilme. Utilizou-se a microscopia eletrônica de varredura (M.E.V) para verificar a morfologia e distribuição das células na formação de biofilme nas superfícies de poliestireno e elastômero de silicone. Observou-se que independe da origem dos isolados estes apresentaram uma frequência variada para genes do operon *ebp* e que sua presença não prediz que ocorrerá a formação biofilme.

## 1 INTRODUÇÃO

Muitas espécies de *Enterococcus* sp. são consideradas microrganismos comensais, porém algumas são importantes como patógenos nosocomiais, responsáveis por várias infecções (MIKULSKA et al., 2010). No Brasil *Enterococcus faecalis* é a espécie mais prevalente, sendo responsável por mais de 90% das infecções enterocócicas. (BRASIL, 2008). A bacteremia causada por esta bactéria é muito significativa para a saúde pública, uma vez que está relacionada com um aumento subsequente de endocardite, uma das manifestações clínicas mais graves de infecção por enterococos com taxas de mortalidade que variam de 15 a 20% (THURLOW et al., 2010).

Vários fatores de virulência têm sido descritos em *E. faecalis*, sendo os mais proeminentes a substância de agregação (*asa1*), adesinas de colágeno (*ace*), adesinas de superfície (*efaA*), hialuronidase (*hyl*), proteína de superfície (*esp*) e gelatinase (*geIE*) (FISHER;PHILIPS, 2009; OZDEN et al., 2013). As proteínas Esp (responsáveis pela colonização) e geIE (zinco metaloprotease) também tem sido indicadas no processo da formação de biofilme (FISHER;PHILIPS, 2009; DIANI et al., 2014). Além desses fatores, mais recentemente, tem-se sugerido a presença dos pili como um fator importante na formação de biofilme (BUDZIK; SHNEEWIND, 2006; DANNE; DRAMSI, 2012).

O impacto clínico de *E. faecalis* pode ser aumentado pela formação de biofilme em diversos dispositivos médicos, tais como cateteres venosos, arteriais, urinários, dispositivos intrauterinos, lentes de contato e próteses, contribuindo e intensificando para inúmeras infecções hospitalares (KAYAOGLU; ØRSTAVIK, 2004; HOIBY et al., 2011). Diversos estudos demonstraram a capacidade de aderência de enterococos aos materiais que compõem estes dispositivos, a exemplo o silicone, poliestireno e acrílico (KOBAYAKAWA; JETT; GILMORE, 2005; MOHAMED; HUANG, 2007). A formação de biofilme por *E. faecalis* têm estado sob intensa investigação, pois a sua presença pode aumentar a resistência ao antibiótico em até 1.000 vezes (TENDOLKAR et al., 2004; MOHAMED; HUANG, 2007), além da resistência à luz UV, à produtos químicos biocidas e aumento das taxas de troca de material genético (PRAKASH; VEEREGOWDA; KRISHNAPPA, 2003).

Assim como em bactérias patogênicas Gram-negativas, os pili das Gram-positivas desempenhar um papel importante na adesão à superfície do hospedeiro e

resistência de macrófagos (MAISEY et al., 2008), sendo um importante fator para virulência dos enterococos (BUDZIK; SHNEEWIND, 2006; DANNE; DRAMSI, 2012). Alguns estudos demonstraram que isolados clínicos de *Enterococcus* sp. codificam os pili, como determinantes de virulência, quando comparados a isolados ambientais (RICE et al., 2003; HEDRICKX et al., 2007).

Os pili são constituídos por múltiplos protéicos ligados covalentemente à parede celular bacteriana, e funciona como uma organela de superfície (MARRAFFINI & SCHNEEWIND, 2006). *E. faecalis* possui dois *locus* de genes relacionados à formação dos pili: o operon *ebp* (*endocarditis and biofilm associated pili*) e o operon *bee* (*biofilm enhancer in Enterococcus*) (DANNE; DRAMSI, 2012). O operon *ebp* é constituído pelos genes *ebpA*, *ebpB*, *ebpC* e um gene *srtC* que codifica a sortase-C dependente (NALLAPAREDDY et al., 2006).

Embora tenha relatos na literatura, os artigos ainda são conflitantes em relação à presença dos pili e fatores de virulência na formação de biofilme (HEIKENS et al., 2007; FISHER; PHILIPS, 2009). Além disso, ainda são escassos os dados disponíveis sobre frequência dos genes *ebp* em *E. faecalis*.

Sabendo que a presença dos pili tem sido proposto como importante etapa na adesão e conseqüentemente formação de biofilme, o objetivo do presente estudo foi avaliar a incidência de genes do operon *ebp* e sortase C em isolados clínicos e não-clínicos de *E. faecalis*, bem como verificar a capacidade de formar biofilme por estes isolados em diferentes superfícies.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Isolados bacterianos**

Os testes foram realizados com 43 isolados de *E. faecalis*, sendo 8 amostras clínicas e 35 não-clínicas (alimentos) selecionados da coleção do Laboratório de Microbiologia Básica e Aplicada (Universidade Tecnológica Federal do Paraná-Brasil).

## 2.2 Extração de DNA total

O DNA genômico foi extraído através do método de fervura de acordo com protocolo de Marques; Suzart (2004) com modificações. Os isolados foram cultivados em caldo Brain Heart Infusion (BHI), incubadas a 37 °C sob agitação constante (180 rpm) por 18 horas. Após este período a cultura bacteriana foi submetida à centrifugação por 10 minutos a 10.600 x *g* e o sedimento foi ressuspensionado por 300 µL de água ultrapura estéril. A suspensão de células foi submetida ao aquecimento a 100 °C por 30 minutos. Em seguida foi novamente centrifugada, nas mesmas condições citadas acima, e 150 µL do sobrenadante contendo DNA foi retirado e mantido em freezer a -20 °C.

## 2.3 Determinação da presença dos genes de virulência e formação de biofilme

A amplificação dos genes que compõe o operon *ebp* e a sortase *srtC*, foram realizados pela técnica de PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos (Tabela 1). A reação de PCR foi realizada em volume final de 20 µL contendo 1 µL de DNA bacteriano, 20 pmol/µL de cada oligonucleotídeo iniciador, 2,5 mM de dNTP, 1U de *Taq*DNA Polimerase, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e tampão de reação (10X) (Invitrogen™ byLife Technologies). A amplificação dos fragmentos foram obtidos em termociclador (Swift™ Max Pro Thermal Cyclor, Esco Technologies Inc., EUA), sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, temperatura de anelamento (Tabela 1) por 30 segundos (oligonucleotídeo *ebpA*, *ebpB* e *srtC* ) e 1 min (oligonucleotídeo *ebpC*, *asa1* ,*ace*, *ge/E*), e extensão a 72°C por 30 segundos, com extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos da amplificação da PCR foram visualizados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e observados através de luz ultravioleta (UV). Tamanho do produto amplificado foi comparado com o marcador de tamanho molecular de 1kb plus (Invitrogen™ byLife Technologies).

**Tabela 1.** Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para detecção dos genes relacionados a virulência e formação de biofilme.

Gene	Sequência ('5- 3')	T.A (°C)	Tamanho (pb)	Referências
<i>ebpA</i>	CCGCTCGAGA ACTAACAAAAATGATTCGGCTCCAG CCGCTCGAGCCATCTCACGCATTTTATCTTCAACT	68	1064	a
<i>ebpB</i>	CCGCTCGAGCTGAAGGAAAAACGGTCCAA CCGCTCGAGCTTTTGCGTCGTCAGTGTGT	70	530	a
<i>ebpC</i>	CCGGAATTCTGATAAATATCAAGGACTGGCAGA CGGGGTACCTAAGCATACTCTCCAGAAGTCACG	65	963	a
<i>srtC</i>	AATGTCCGTTTACCAATTTTTGAT GGTGTGCAAGTTAATAAAGTGACG	60	370	b
<i>asa1</i>	GCACGCTATTACGAACTATGA TAAGAAAGAACATCACCACGA	56	375	c
<i>gelE</i>	AGTTCATGTCTATTTTCTTCAC CTTCATTATTTACACGTTTG	56	402	d
<i>ace</i>	AAAGTAGAATTAGATCCACAC TCTATCACATTTCGGTTGCG	56	320	d

T.A - Temperatura de anelamento; a - Nallapareddy et al., 2006; b - Barnett; Patel ; Scott ,2004; c - Vankerckhoven et al., 2004; d - Mannu et al. 2003

## 2.4 Formação de biofilme em microplacas de poliestireno e elastômero de silicone

Os ensaios de biofilme foram realizados como previamente descritos por Stepanovic et al., (2007), com modificações. A formação de biofilme *in vitro* foi determinada em superfície de microplaca de fundo plano de poliestireno com 96 poços. Para tanto, os isolados foram cultivados a 37 °C durante 24 h em ágar BHI. Após este período, as células foram suspensas em caldo BHI até atingirem a turbidez 0,5 da escala de McFarland ( $10^8$  UFC/mL). Uma alíquota de 200 µL de cada cultura líquida foi depositada nos poços das microplacas de poliestireno e incubadas por 24 h a 37 °C. Controle negativo foi realizado depositando o meio de cultura BHI sem bactéria.

Para teste de formação de biofilme em elastômero de silicone foi utilizado uma folha de silicone de 1 mm de espessura (SILIMED). Cortes com diâmetro de 5

mm foram obtidos e esterilizados conforme descrito por Silva et al (2010). Os fragmentos de elastômero de silicone foram depositados em microplaca de poliestireno de 96 poços, e o inóculo bacteriano seguiu como descrito acima. Controle negativo foi realizado depositando o meio de cultura BHI sem bactéria.

Após o período de incubação, para ambos os testes, o meio de cultura foi aspirado e os poços lavados com solução salina (0,85%). A bactéria aderida foi fixada com metanol por 15 minutos, o excesso de metanol foi removido e as placas submetidas à secagem à temperatura ambiente e então coradas com 200 µL de solução aquosa de cristal de violeta (0,5%) por 5 minutos. O excesso de corante foi removido dos poços, seguido de lavagem com solução salina (0,85%) e adicionado de 200 µL de ácido acético a 33%. A densidade ótica (DO) do biofilme bacteriano foi mensurada em comprimento de onda de 540nm em espectrofotômetro de microplacas (ELx808 TM Absorbance Microplate Reader-BioTek).

Para obtenção do ponto de corte (*cut-off*) multiplicou-se o desvio padrão do controle negativo por três e adicionou ao valor médio das absorbâncias do controle negativo. Cada teste foi realizado em triplicata em duas repetições, e a formação do biofilme foi classificada de acordo com os critérios descritos por Stepanovic (2007), sendo:

$DO_A \leq DO_C$  Considerada não formadora de biofilme (NF);

$DO_C < DO_A \leq 2x DO_C$  Fracamente formadora de biofilme (FFB);

$2x DO_C < DO_A \leq 4x DO_C$  Moderadamente formadora de biofilme (MFB);

$4x DO_C \leq DO_A$  Fortemente formadora de biofilme (FB)

DO<sub>C</sub> =densidade ótica do controle.

DO<sub>A</sub> = densidade ótica da amostra.

## **2.5 Formação de biofilme na presença de íons ferro e glicose.**

Para este ensaio, procedeu-se como descrito anteriormente, porém em um experimento foi acrescentado ao meio de cultura uma solução de cloreto férrico (FeCl<sub>3</sub>) na concentração final de 5 mM (MARQUES, 2004), e em outro o caldo BHI foi suplementado com 0,75% de glicose (CASSENEGO et al.,2013). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

## 2.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Realizou-se os ensaios para formação de biofilme como descrito anteriormente. Após a retirada do excesso de meio de cultura e lavagem com solução salina, os fragmentos de elastômero e poliestireno foram fixados com solução de glutaraldeído 3,0% em tampão fosfato 0,1 M, a 4 °C, por aproximadamente 24 h. Posteriormente, foram realizados 3 banhos em 1,0 mL de tampão fosfato 0,1M durante 15 minutos cada, e pós-fixados com 1,0 mL de tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) por 1 hora. O OsO<sub>4</sub> foi removido e repetiram-se os 3 banhos de 15 minutos com tampão fosfato 0,1 M; posteriormente os fragmentos foram desidratados em soluções de concentrações crescente de etanol (70%, 80%,90% e 100%). Após a desidratação completa, as amostras foram submetidas ao ponto crítico de secagem (Bal-Tec CPD 030 Critical Point Dryer). Os fragmentos foram montados em stubs e foram cobertos com uma camada de ouro em pulverizador catódico (Bal-Tec SCD 050 Sputter Coater) e observados em microscópio eletrônico de varredura (MEV, FEI Quanta 200).

## 2.7 Análises estatísticas

Os resultados foram analisados aplicando os testes de análise de variância (ANOVA) e teste *t* para comparações entre a formação de biofilme na presença de glicose e íons ferro. O nível de significância foi fixado em 5%. Os testes foram realizados pelo programa BIOESTAT 5.0 (AYRES et al. 2007).

# 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

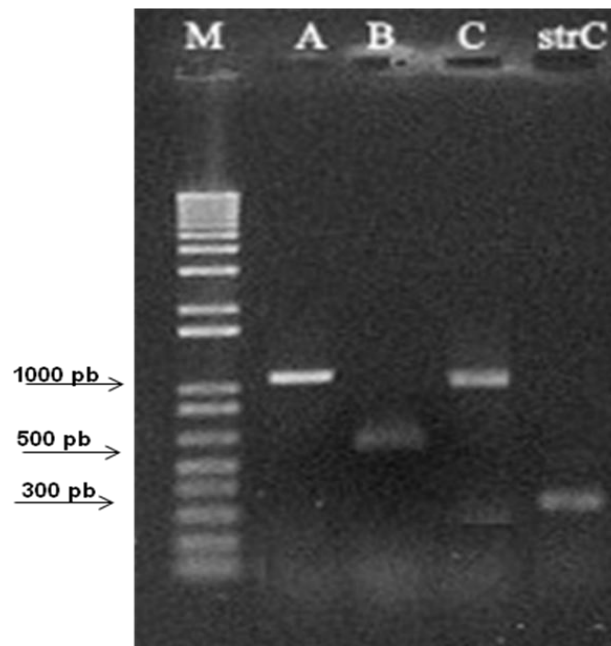
## 3.1 Detecção do operon *ebp* e outros genes relacionados à virulência e formação de biofilme

O tamanho do amplicon obtido com oligonucleotídeos específicos para cada gene do operon estão representados na figura 1. A confirmação da presença dos genes pertencentes ao operon *ebp* e a sortase, estão apresentados na figura 2-A. A

presença dos genes do operon foram encontrados em nossos isolados nas seguintes freqüências: 58% de *ebpA*, 84% de *ebpB*, 44% *ebpC* e 84% *srtC*. Além dos genes responsáveis pela formação dos pili, também avaliou-se a presença de outros genes relacionados com a virulência e formação de biofilme, na qual 86% dos isolados albergaram o gene *asa1*, 76% *geIE* e 90% *ace*.

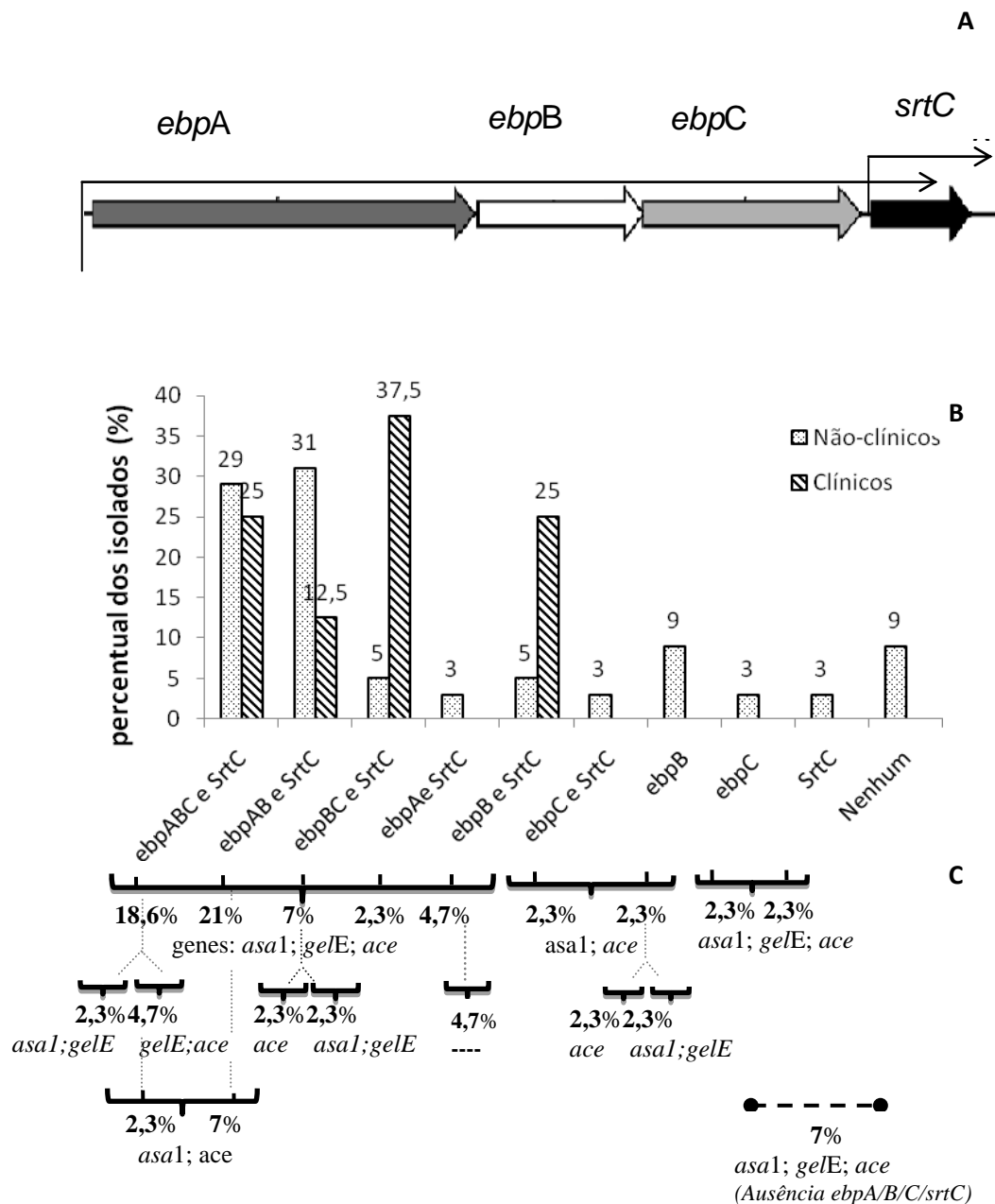
Como resultado, observamos que nos isolados não-clínicos, houve uma prevalência para os genes *ebpAB*, pertencentes ao operon *ebp*, e sortase (31,0%), seguido pelo operon completo e sortase (29,0%); os perfis restantes tiveram uma freqüência menor ou igual a 9,0%; para os demais genes pesquisados, estes apresentaram uma freqüência equivalente entre si, com mais de 80% para cada gene. Para os genes do operon *ebp* por sua vez os, isolados clínicos apresentaram prevalência para *ebpBC* e sortase (37,5%), seguido pelo o operon completo e a sortase (25,0%), os demais perfis foram igual ou menor que 25% (Figura 2-B); com relação aos outros genes testados houve um predomínio para *geIE* com 18%. Ainda, 9% dos isolados de *E. faecalis* de origem não-clínicos não apresentaram os genes relacionados à formação dos pili, em contrapartida, todos os isolados clínicos apresentaram pelo menos um dos genes do operon *ebp* (Figura 2-B).

Não pudemos estabelecer uma relação entre a freqüência do operon com as origens dos isolados, uma vez que os genes do operon completo e *ebpAB/srtC* prevaleceram nos isolados não-clínicos em contrapartida, houve prevalência dos genes *ebpBC/srtC* nos isolados clínicos.



**Figura 1** – Produtos de PCR em gel de agarose 1% para determinação dos genes presentes no operon *ebp* e sortase dos isolados de *E. faecalis*. Marcador molecular 1kp plus (M); *ebpA*, 1064pb (A); *ebp B*, 530pb (B); *ebpC*,963pb (C); sortase C, 370 b (strC).

A ocorrência dos principais perfis genotípicos relativos à presença simultânea de genes de virulência e biofilme, pesquisados no presente trabalho em isolados de *E. faecalis* está apresentada na Figura 2-C. Nos quais 53,6% dos isolados que apresentaram o operon completo com a sortase ou os genes *ebpA*, B ou C com a sortase apresentaram também os genes *asa1*, *ge/E* e *ace*. Somente 18,6% dos isolados albergaram todos os genes pesquisados neste estudo, na qual houve uma prevalência para perfil genotípico *asa1*, *ge/E*, *ace* juntamente com *ebpAB* e sortase 21%, e os demais apresentaram uma frequência menor ou igual 7% (Figura 2-C). Apenas 7% dos isolados não-clínicos não apresentaram os genes do operon *ebp* nem sortase, porém apresentaram os outros três genes de virulência testados. Os demais isolados apresentaram uma distribuição não uniforme dos três genes de virulência independente do gene relacionado com a formação dos pili.



**Figura 2**(A) Ilustração da distribuição dos genes *ebp* e *srtC* no operon de *E. faecalis* (Hendricky, 2009). (B) distribuição dos genes nos isolados não-clínicos e clínicos. (C) frequência dos perfis genotípicos relacionados aos genes de virulência.

Os pili de bactérias Gram-positivas são formados por uma reticulação ordenada de proteínas precursoras (operon *ebp*) ligadas a uma sortase, que são transaminases responsáveis por ancorar as proteínas dos pili ao peptidoglicano (BAROCCHI et al. 2006). Os pili são constituídos por três subunidades, na qual a proteína expressa pelo gene *ebpC* corresponde ao eixo principal, e *ebpA* e *ebpB* as subunidades menores (NALLAPAREDDY et al., 2006; NIELSEN et al, 2013;

MONTEALEGRE et al., 2015). Estes três genes estão localizados *upstream* do gene que codifica a sortase C, sendo este controlado por uma região promotora independente (Figura 2-A) (SILLANPÄÄ et al., 2013). Os genes do operon *ebp* são importantes para a adesão de *E. faecalis* às proteínas da matriz extracelular (ECM), incluindo fibrinogênio, colágeno (MONTEALEGRE et al. 2015) e plaquetas humanas (SILLANPÄÄ et al., 2013), sendo considerada uma etapa inicial crucial no processo da infecção.

De todos os isolados do presente estudo houve uma prevalência para associação dos genes *ebpA/B*, corroborando com os resultados obtidos por Jarzembowski et al. (2009) que analisaram isolados de enterococos provenientes de fezes e amostras clínicas. Contudo, os resultados relatados por estes mesmos autores e Molinos et al. (2008) diferiram do presente trabalho em relação a origem dos isolados, uma vez que eles observaram a prevalência desses genes em isolados clínicos, enquanto que no presente trabalho obteve-se maior presença do gene *ebpA* nos isolados não-clínicos.

Diversos autores também reportaram maior presença dos genes *ebpA* e *ebpB* em isolados de *E. faecalis* provenientes de pacientes com endocardite (TSIGRELIS et al. 2007) e outros isolados clínicos (TABELI et al., 2015). Em contrapartida, Fonseca (2010) encontrou todos os genes para o operon *ebp* tanto em isolados de origem clínicos e não-clínicos.

Os dados da literatura são conflitantes, instigando assim que a distribuição desses genes em isolados de enterococos é heterogênea, onde a diversidade genômica substancial pode produzir resultados diferentes. Em nossos resultados observamos que 42% de todos os isolados analisados não apresentaram o gene *ebpA*, sendo este considerado o principal gene do operon segundo relatos por Sillanpää et al (2013). Ainda Nallapareddy et al. (2006), Gao et al. (2010), Nielsen (2013) e Sillanpää et al. (2013) demonstraram que após mutação no gene *ebpA* houve redução significativa na formação de biofilme pelos isolados de *Enterococcus*.

Além da formação de biofilme e adesão, os pili de *Enterococcus* apresentam outras funções na patogenicidade, pois estudos revelaram a elevada titulação de anticorpos contra as proteínas dos pili em soro de pacientes infectados por esta bactéria (SILLANPÄÄ et al., 2004; NALLAPAREDDY et al., 2006).

Porém, o objetivo do presente estudo foi avaliar a frequência dos genes pertencentes ao operon *ebp* nos isolados não-clínicos e clínicos, bem como a presença do gene para sortase. São poucos os estudos que analisaram concomitantemente a presença completa do operon *ebp* e sortase, sendo que os resultados do presente trabalho são um dos poucos descritos na literatura, comparando os isolados do não-clínicos e clínicos. Tabeli et al., (2015) foi um dos autores que avaliaram a presença do operon *ebp* completo, juntamente com a sortase. Porém seus resultados diferem dos nossos na frequência da presença desses genes. Esses autores relataram uma frequência de 81% e 78% contra 29 e 25% (do presente trabalho), desses genes nos isolados clínicos e ambientais, respectivamente.

Na seqüência, nós também analisamos a presença de genes de virulência relacionados com a formação de biofilme, na qual houve prevalência para os isolados de origem não-clínicos, nossos dados diferem dos encontrados por outros autores na qual os genes para substância de agregação e adesina foram equivalentes em isolados clínico e alimentar; e o gene para gelatinase prevaleceu em isolados clínicos (MOHAMED et al., 2004; DUPONT et al., 2008; ABRIQUELI et al., 2008; CARIOLATO et al., 2008). Contudo, não conseguimos estabelecer uma correlação entre a presença dos genes de virulência com a presença do operon *ebp*. Fonseca (2010) verificou o predomínio dos genes relacionados com formação de biofilme *ebpABC* com os genes de virulência *efaA*, *gelE* e *esp* em isolados de *Enterococcus sp.* Mohamed et al. (2004) e Kristich et al. (2004) relataram que mutações nos genes *esp* e *gelE* reduzem a formação de biofilme em isolados de *E. faecalis*.

Alguns trabalhos relatam que a presença de genes de virulência nem sempre estão associados ao aumento na capacidade de formação de biofilme, uma vez que mutantes dos genes *esp* e *gelE* não reduziram a formação de biofilme (ALMOHAMAD et al., 2014; NALLAPAREDY, et al., 2008). Jahan e Holley (2014) também relataram que a presença destes genes não foram necessários para a formação de biofilme em enterococos.

### 3.2 Formação de biofilme e correlação com a presença do operon *ebp* e sortase e outros genes de virulência

A capacidade de formação de biofilme em superfície abiótica pelos isolados de *E. faecalis* foi mensurado pela quantificação da biomassa total em placas de poliestireno e elastômero de silicone a 37 °C de incubação.

Em nossos estudos 95% de todos os isolados formaram biofilme em superfície de poliestireno contendo meio BHI caldo sem suplementação (Figura 3-A), segundo a classificação estabelecida por Stepanovic et al. (2007). Na tentativa de correlacionar a presença do operon *ebp* com a formação de biofilme, obteve-se que 100% dos isolados que apresentaram o operon completo juntamente com a sortase, foram formadores de biofilme, independente de sua classificação. Por outro lado, 96% dos isolados que apresentaram um ou dois dos genes *ebp* pesquisados foram capazes de formar biofilme e 4% (correspondente a um isolado) não formou biofilme.

Ainda, em poliestireno, avaliou a influência destes componentes utilizando glicose e íons ferro, respectivamente. Obtivemos que a presença de glicose aumentou, e a presença de íons ferro diminuiu significativamente a formação de biofilme (Figura 3-A e 4-A), quando comparados com o biofilme formado em meio BHI sem suplemento. Na presença de glicose a maioria dos isolados 56,0% apresentaram capacidade de formar biofilme moderadamente, enquanto que 98,0% foram fracamente formadores de biofilme, quando o meio foi suplementado com cloreto de ferro.

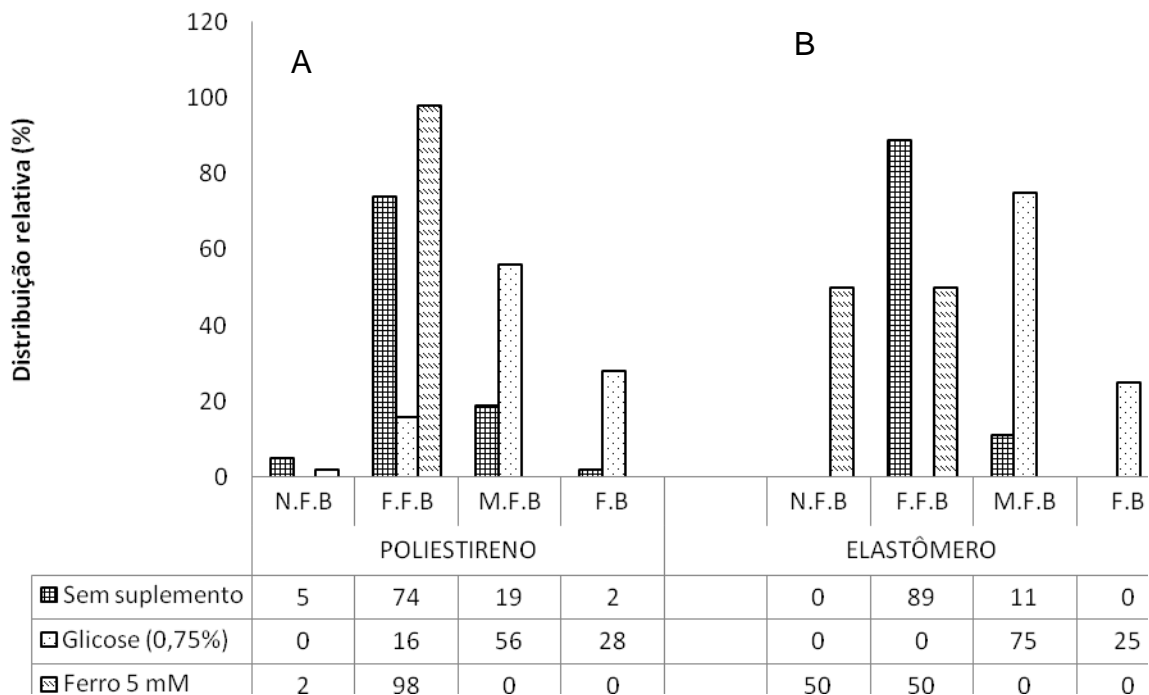
Além do operon *ebp* também analisamos a presença de 3 genes de virulência relacionados com a formação de biofilme. Como resultados obtivemos que 79,0%, 72,0% e 86,0% dos isolados que apresentaram os genes *asa1*, *gelE* e *ace*, respectivamente, foram formadores de biofilme, embora a maioria tenham sido classificados como fracamente formadores de biofilme. Apenas 2 isolados que possuíam um desses genes não foram formadores de biofilme.

Além da formação de biofilme em placa de poliestireno, verificou-se a capacidade de formar biofilme em superfície de elastômero de silicone, por se tratar de um material muito utilizado na constituição de dispositivos médicos. Para a realização do experimento foi selecionado 9 isolados de *E. faecalis*, de acordo com seu perfil genotípico, na qual quatro apresentam todos genes pesquisados no presente trabalho (isolado 4,11,30 e 56), dois apresentaram os genes *asa1*, *ace*,

*ebpAB* e *sortase* (24A e 25A); um isolado que apresentou os genes *asa1*, *ace* e *ebpB*; um isolado que apresentou somente os genes *asa1*, *ace* e *gelE*; e um isolado que apresentou os seguintes genes *gelE*, *ace*, *ebpABC* e *sortase* (802).

Ao tentar relacionar a capacidade de formar biofilme entre as duas superfícies testadas, poliestireno e elastômero de silicone, verificamos que não houve diferença significativa ( $p=0,6435$ ) (Figura 4-C), sendo 89% dos isolados foram fracamente formadores de biofilme e 11% moderadamente formadora de biofilme em superfície de elastômero (Figura 3-B). A observação da disposição das células e da sua morfologia durante a formação de biofilme nas superfícies de poliestireno e elastômero foi avaliada pelo emprego da microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Figura 5).

Também foi avaliado a capacidade de aumento e redução de biofilme em superfície de elastômero de silicone na qual se utilizou glicose e íons ferro, respectivamente; para estes testes utilizou-se quatro isolados de *E. faecalis* (4, 24A, 25A e 802). Assim como em placa de poliestireno houve uma diferença significativa entre os tratamentos ( $p<0,001$ ) quando comparados ao meio BHI sem suplemento (Figura 4-B). Na presença de glicose 75% dos isolados foram moderadamente formadores de biofilme, em contrapartida quando suplementado com cloreto de ferro o 50% não formou biofilme ou foi considerado fracamente formador de biofilme (Figura 3-B). Utilizou-se microscopia eletrônica de varredura para verificar a formação de biofilme e a distribuição da célula bem como sua morfologia quando suplementos com glicose e cloreto de ferro (Figura 6).

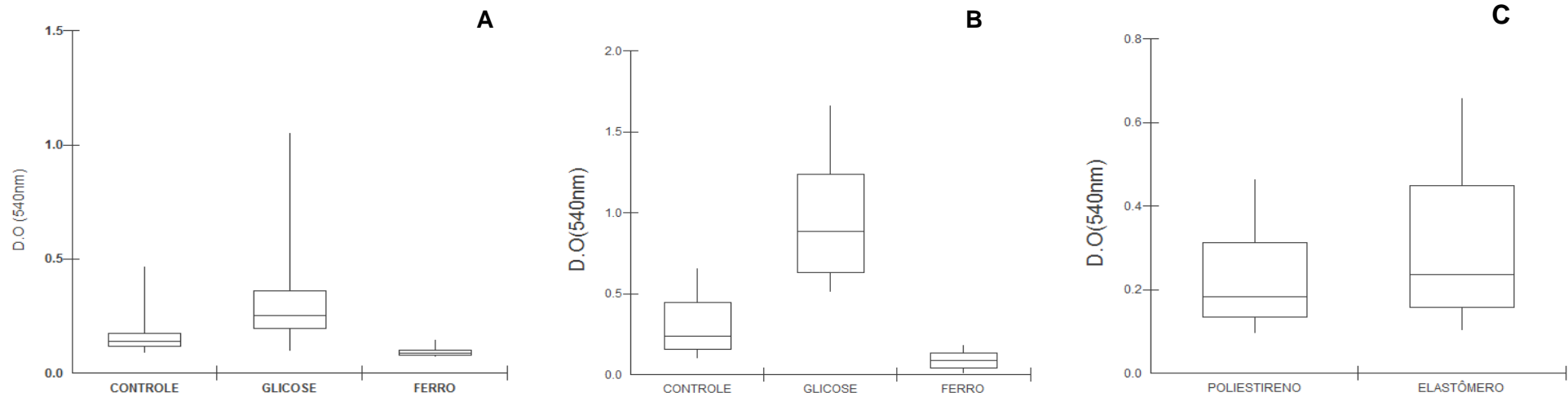


N.F.B=Não formador de biofilme; F.F.B=Fracamente formador de biofilme; M.F.B=Moderadamente formador de biofilme;F.B=Fortemente formador de biofilme.

**Figura 3** – Percentual relativo da freqüência de formação de biofilme dos isolados de *E. faecalis*, em BHI caldo, BHI suplementado com glicose e BHI suplementado com cloreto férrico.(A) ensaio realizado em superfície de poliestireno; (B) ensaio realizado superfície de elastômero de silicone.

Os resultados observados para presença dos genes relacionados à virulência e formação de biofilme corroboraram com os resultados obtidos por Ramadhan e Hegedus, (2005), Di Rosa, et al., (2006) e Tsikrikonis, et al. (2012) que concluíram que a presença de genes de virulência relacionados com adesão não são essenciais para formação de biofilme. Ainda, Tabeli et al. (2015), relataram que todos os isolados de enterococos que apresentaram os três genes do operon *ebp* e da sortase, tiveram alta prevalência para forma biofilme, enquanto que isolados que possuíam um ou outro desses genes não foram capazes de formar biofilme.

Em contrapartida, Hendricky, (2009) e Fisher; Phillips (2009) analisaram isolados que não possuíam genes *ebp* e sortase, porém foram formadores de biofilme, relacionando a formação de biofilme à presenças outros fatores de virulência.



**Figura 4** – Análise comparativa da capacidade de formação de biofilme. (A) Diferentes suplementos utilizados no meio de cultivo BHI em placa de poliestireno. (B) Diferentes suplementos utilizados no meio de cultivo BHI em elastômero de silicone. (C) Comparativo da capacidade de formar biofilme em superfície de poliestireno e elastômero de silicone. Valores correspondem às médias de dois experimentos independentes testados em triplicatas dados através da D.O (densidade óptica) obtidos pela técnica de coloração da biomassa por cristal de violeta realizado nos isolados de *E. faecalis*.

Novamente a literatura traz divergência entre os resultados, mostrando que a formação de biofilme em enterococos, bem como genes envolvidos, ainda não é conclusivo.

Nossos dados corroboram com a pesquisa realizada por Cassenego (2014), na qual utilizou-se isolados clínicos e alimentares, mostrou que o caldo BHI suplementado com 0,75% de glicose aumenta a produção de biofilme quando comparado ao meio de cultura sem suplemento. A influência da concentração de glicose na formação de biofilme não está claramente elucidada, alguns pesquisadores acreditam que ela esteja relacionada a um regulador transcricional dependente de glicose (PILLAI et al., 2004; KRISTICH et al., 2004).

A redução na formação de biofilme na presença de íons ferro foi demonstrada por Marques (2004). A presença de cátions divalentes podem conferir mudança na carga elétrica da superfície microbiana, interferindo no processo de aproximação e adesão à superfícies, com consequência influencia na formação de biofilme (BRIANDET et al., 2001; MARQUES, 2004).

Ainda, há relatos que alguns antibióticos podem aumentar a expressão de alguns genes relacionados á formação de biofilme, a exemplo a ampicilina e ceftizoxime que aumentaram a expressão em 83 e 20% do gene *ebpA*, respectivamente (KAFIL et al., 2015).

Com relação a formação de biofilme em superfície de elastômero de silicone por *E.faecalis* não há relatos na literatura, uma vez que o presente trabalho é considerado pioneiro ao utilizar silicone como substrato de adesão para formação de biofilme para enterococos.

Pode-se observar na microscopia eletrônica que o elastômero de silicone apresenta uma superfície rugosa diferente do encontrado por poliestireno que possui uma superfície liso. Alguns autores relatam que as bactérias aderem mais às superfícies rugosas em comparação com as lisas, em parte, devido ao aumento da área de superfície. Estes dados diferem dos encontrados no presente trabalho onde não houve diferença de formação de biofilme em ambas as superfícies (MERRITT et al. 2000; COUTINHO, 2007). Para Belangero et al (2006) o acabamento superficial dos polímeros utilizados em biomateriais deve ser uniforme e não possuir irregularidades maiores que o tamanho dos microrganismos, que provavelmente facilitam sua a aderência.

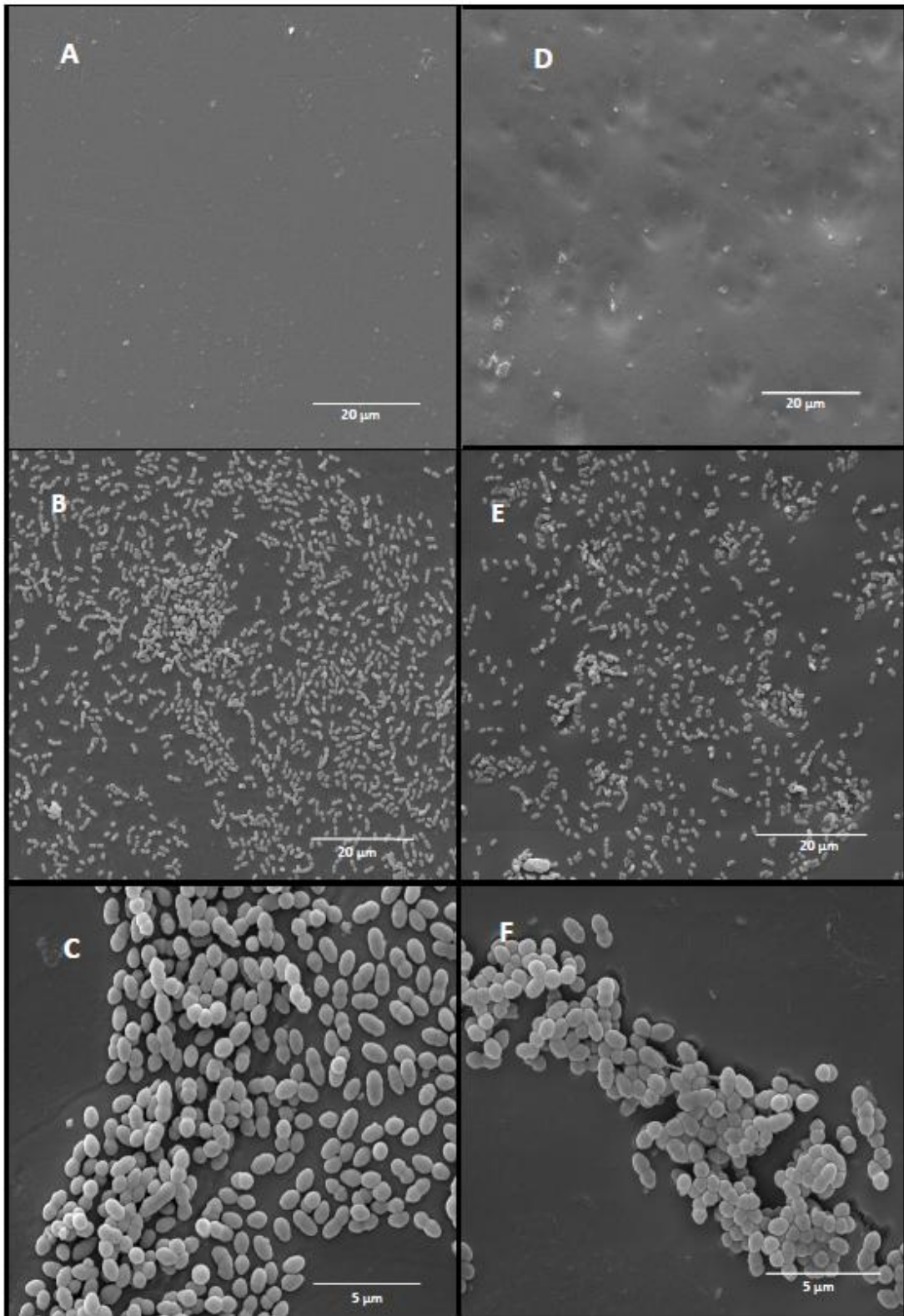


Figura 5 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV). A e D representa estrutura das superfícies de poliestireno e elastômero de silicone respectivamente em aumento de 3000 X. B e C formação de biofilme pelo isolado 25 A em superfície de poliestireno e elastômero respectivamente em aumento de 3000x . E e F formação de biofilme pelo isolado 25 A em superfície de elastômero de silicone em aumento de 12000X respectivamente.

A figura 5 em superfície de elastômero apresenta as células mais aglomerados em quando que em poliestireno estas apresentam uma distribuição homogenia e com poucos aglomerados celulares.

Em pesquisa realizada por Joyanes et. al.(1999), relataram a adesão por *E. faecalis* em superfície de silicone e demais tipos de biomateriais; porém não observaram diferença de adesão entre estes. Locatelli et al. (2004) também verificou a capacidade de aderência bacteriana, *in vitro*, sobre lentes intra-oculares de silicone e de polimetilmetacrilato utilizando cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e verificou que não houve diferença estatisticamente significativa na aderência de *S. aureus* e *S. epidermidis*.

Assim como ocorreu em superfície de poliestireno, em superfície de elastômero ocorreu um aumento para formação de biofilme com a suplementação de glicose, em contrapartida, quando suplementado com cloreto de ferro houve um comprometimento em sua formação Estes dados vão de encontro com Marques (2004) que também utilizou dois substratos diferentes para formação de biofilme e não observou diferença significativa entre as duas superfícies.

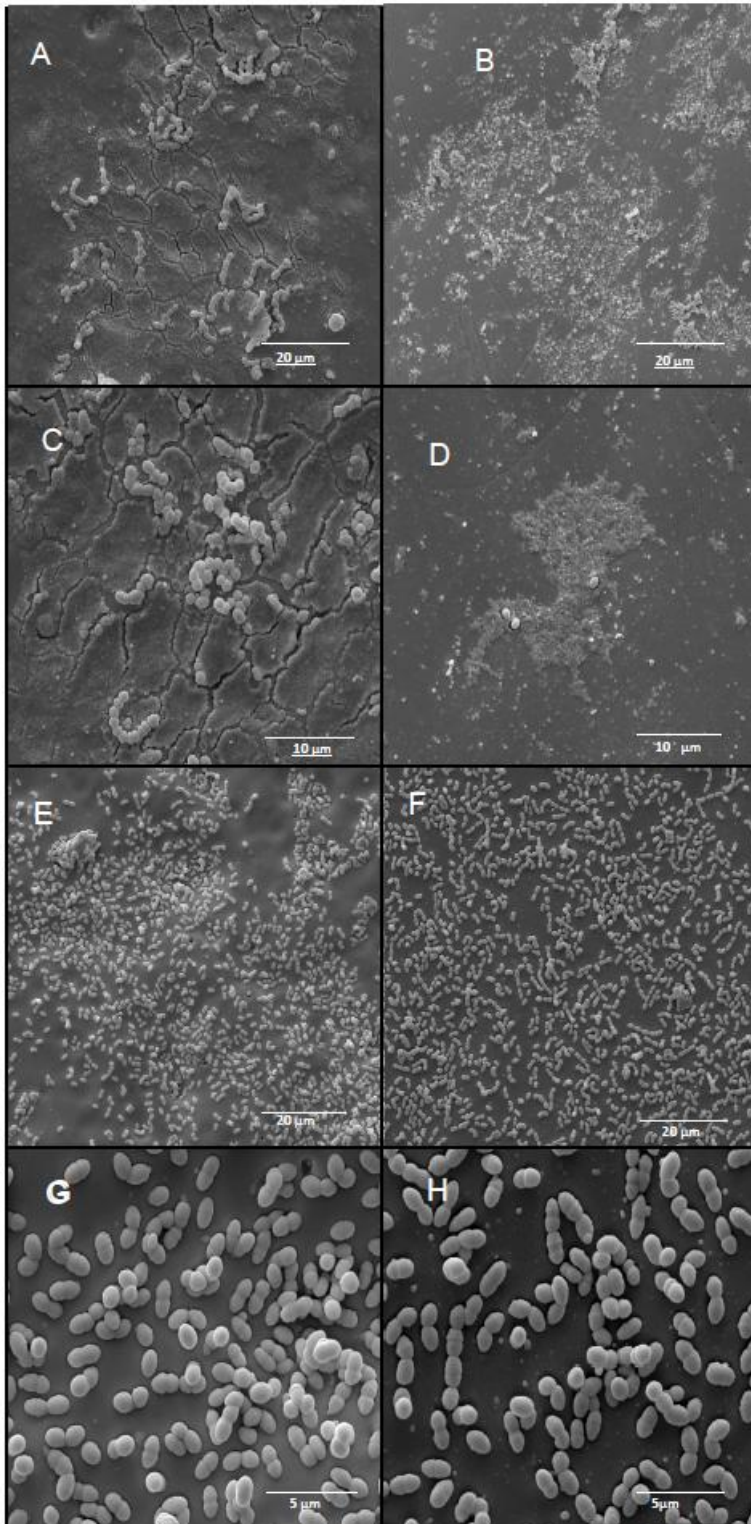


Figura 6 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos isolados 24A e 25A em diferentes suplementos e substratos de adesão. A e B apresenta a formação de biofilme do isolado 24A na presença cloreto de ferro em superfície de elastômero de silicone e poliestireno respectivamente (aumento de 3000 X). C e D formação do biofilme pelo isolado 25 A e na presença cloreto de ferro em elastômero de silicone e poliestireno respectivamente (aumento de 6000 X). E e F formação de biofilme pelo isolado 24 A em presença de glicose (0,75%) em superfície de elastômero de silicone e poliestireno respectivamente (3000x). G e F formação de biofilme pelo isolado 25 A em presença de glicose em elastômero de silicone e poliestireno respectivamente (12000x).

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que, independentemente da origem, os isolados de enterococos possuíam frequências variadas dos genes do operon *ebp* bem como o gene da sortase. Para demais genes de virulência houve um predomínio para isolados de origem alimentar. Os isolados provenientes de alimentos apresentaram mais combinações dos genes do operon *ebp* quando comparados com os isolados clínicos. Ainda, não houve uma correlação da presença desses genes com demais genes de virulência avaliados. Quase a totalidade dos isolados foram formadores de biofilme, embora é possível sugerir que os isolados que apresentaram os genes *ebp* foram melhores formadores. Ainda, a formação de biofilme foi influenciada pela presença de glicose e íons ferro. Como há muita divergência na literatura, ficou claro que devido a heterogeneidade genética entre os isolados de uma mesma espécie de *Enterococcus* há interferência nos resultados, e que a mera presença de genes *ebp* e de virulência não prediz a ocorrência de formação de biofilme em *E. faecalis*.

## REFERÊNCIAS

- ABRIOUEL, H O. N. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. **International Journal of Food Microbiology**, v.123, p. 38-49. 2008.
- ALMOHAMAD, S. et al. Influence of isolate origin and presence of various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecium*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 353,p.151 -156, 2014.
- AYRES, M et al. **Bioestat**: aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biomédicas. Versão 5.0.Belém, Pará: Sociedade Civil Mamirauá, MCT-CNPq, 2007. 324 p
- BARNETT, T. C.; PATEL, A. R.; SCOTT, J. R. A. Novel Sortase, SrtC2, from *Streptococcus pyogenes* Anchors a Surface Protein Containing a QVPTGV Motif to the Cell Wall. **Journal Bacteriology**, v.186, p.5865–5875, 2004.
- BAROCHI, M. A. et al. A pneumococcal pillus influences virulence and host inflammatory responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.103, p.2857-2862, 2006.
- BELANGERO, V. M. S. et al. Evaluation of Peritoneal Dialysis Catheters Using Scan Electron Microscopy. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v.4, p.186-191, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Surto de Enterococo resistente à vancomicina em estabelecimentos de assistência à saúde**. Informe Técnico No 05/07 2008. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/reniss/informe\\_vre\\_2008.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/reniss/informe_vre_2008.pdf). Acessado em 23 mar. 2016.
- BRIANDET, R. et al. Determination of the van der Waals, electron donor and electron acceptor surface tension components of static Gram-positive microbial biofilms. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**,v. 21, p. 299-310, 2001.
- BUDZIK J. M.; SCHNEEWIND, O. Pili prove pertinent to enterococcal endocarditis. **Journal Clinical Investigation**, v.116, p.2582–2584, 2006.
- CASSENEGO, A. P. V. et al. Virulência e formação de biofilme microbiano por *Enterococcus faecalis* isolados de swabs cloacais de frangos de corte infectados com *Eimeria* spp. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, p. 1433-1440, 2013.
- CARIOLATO, D. et al. Occurrence of virulence factors and antibiotic resistances in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* collected from dairy and human samples in North Italy. **Food Control**, v.19, p.886-892, 2008.
- COUTINHO, M. P. **Influência da morfologia da superfície na molhabilidade do titânio comercialmente puro**. 2007. 84 f. Dissertação (Mestrado em ciências dos materiais) - Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2007.

DANNE, C.; DRAMSI, S. Pili of Gram-positive bacteria: roles in host colonization. **Microbiology Reviews**, v.163, p.645–658, 2012.

DIANI, M. et al. The interactions between *esp*, *fsr*, *gelE* genes and biofilm formation and *pfge* analysis of clinical *Enterococcus faecium* strains. **African journal of microbiology research**, v.8, p.129–137, 2014.

DI ROSA, R. et al. Relationship between biofilm formation, the enterococcal surface protein (Esp) and gelatinase in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 256, p. 145-150, 2006.

DUPONT, H. et al. Prospective evaluation of virulence factors of enterococci isolated from patients with peritonitis: Impact on outcome. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 60, p. 247-253, 2008.

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

FONSECA, J.F.S.G. **Avaliação da capacidade de adesão e produção de biofilme em enterococos clínicos e alimentares**. 2010. Dissertação (Mestrado Microbiologia Aplicada) Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Lisboa, Portugal.

GAO, P. et al. *Enterococcus faecalis rnjB* is required for pilin gene expression and biofilm formation. **Journal Bacteriology**. v. 192, p.5489–5498, 2010.

GILMORE, M.S.; KOBAYAKAWA, S.; JETT, B. D. Biofilm formation by *Enterococcus faecalis* on IOLS. **Current Eye Research**. v. 30, p.741-745, 2005.

HEIKENS, E. et al. Enterococcal surface protein Esp is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162. **Journal of Bacteriology**, v.189, p. 8233–8240, 2007.

HENDRICKY, A.P. et al. LPxTG surface proteins of enterococci. **Trends in Microbiology**, v.17, p.423–430, 2009.

HENDRICKY, A.P. et al. Five genes encoding surface-exposed LPxTG proteins are enriched in hospital-adapted *Enterococcus faecium* clonal complex 17 isolates. **Journal Bacteriology**, v.189, p.8321–8332, 2007.

HOIBY, N. et al. The clinical impact of bacterial biofilms. **International Journal of Oral Sciences**, v.3, p. 55-65, 2011.

JARZEMBOWSKI, T. et al. A Prevalence of genes involved in pili-and biofilm formation and in vitro adherence properties of medical and faecal strains of *Enterococcus faecalis* isolated in Gdańsk. **Microbial Ecology in Health and Disease**. v. 21, p.100-103, 2009.

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

JOYANES, P. et al. In vitro adherence of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* to plastic biomaterials. **Clinical Microbiology and Infection**, v.5, p. 382–386.1999.

KAYAOGULU, G; ØTSTAVIK, D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. **Critical reviews in oral biology and medicine**, v.15, p.308–320, 2004.

KAFIL, H.S; MOBAREZ, A.M. Assessment of biofilm formation by enterococci isolates from urinary tract infections with different virulence profiles. **Journal of King Saud University – Science**, v.27, p.312-317, 2015.

KOBAYAKAWA, S; JETT,B.D ;GILMORE, M.S. Biofilm formation by *Enterococcus faecalis* on intraocular lens material. **Current Eye Research**, v.30, p.741–745, 2005

KRISTICH, C.J. et al. Esp- Independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. **Journal of Bacteriology**, v.186, p. 154-163, 2004.

LEUCK, A.M; JOHNSON, JR; DUNNY, G.M .A Widely Used *In Vitro* Biofilm Assay Has Questionable Clinical Significance for Enterococcal Endocarditis. **PLoS ONE**. v.9, 2014.

LOCATELLI, C.I. et al. Aderência bacteriana *in vitro* a lentes intra-oculares de polimetilmetacrilato e de silicone. Arquivos Brasileiros de **Oftalmologia**, v.67,p. 241-248,2004.

MANNU,L.et AL. . Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. **International Journal of Food Microbiology**, v.88, p. 291– 304, 2003.

MARQUES, E.B. **Estudo da formação de biofilme em superfícies abiótica: Influência de cátions divalentes e a ocorrência de determinantes de virulência em amostras clínicas de *Enterococcus faecalis***. 2004. 167f .Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Pós-graduação em Microbiologia, UEL, Londrina.

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

MARRAFFINI, L. A. & SCHNEEWIND, O. Targeting proteins to the cell wall of sporulating *Bacillus anthracis*. **Molecular Microbiology**. v. 62, p.1402–1417, 2006.

MAISEY,H.C. et al. A group B streptococcal pilus protein promotes phagocyte resistance and systemic virulence. **FASEB Journal**, v.22, p.1715–1724,2008.

MERRITT, K. et al. Factors influencing bacterial adhesion.**Handbook of bacterial adhesion: principles, methods and applications**, p. 53-98. 2000.

- MIKULSKA, M. et al. Risk factors for enterococcal bacteremia in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. **Transplant Infectious Disease**, v.12, p.505–12, 2010.
- MOHAMED, J.A. et al. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. **Infection and Immunity**, v.72, p.3658–3663, 2004.
- MOHAMED, J.A.; HUANG, D.B. Biofilm formation by enterococci. **Journal of medical microbiology**. v.12, p.1581-8, 2007.
- MOLINOS, C. et al. Detection of *ebp* (endocarditis-and biofilm-associated pilus) genes in enterococcal isolates from clinical and non-clinical origin. **International Journal of Food Microbiology**, v.126, p.123-126, 2008.
- MONTEALEGRE, M.C, et al. The *Enterococcus faecalis* EbpA Pilus Protein: Attenuation of Expression, Biofilm Formation, and Adherence to Fibrinogen Start with the Rare Initiation Codon ATT .**mBio**, v.6, 2015.
- NALLAPAREDDY, S. R. et al. A functional collagen adhesin gene, *acm*, in clinical isolates of *Enterococcus faecium* correlates with the recent success of this emerging nosocomial pathogen. **Infection and Immunity**, v. 76, p.4110 –4119, 2008.
- NALLAPAREDDY, S.R. et al. Endocarditis and biofilm associated pili of *Enterococcus faecalis*. **Journal Clinical Investigation**, v. 116, p.2799–2807, 2006.
- NIELSEN, H.V. et al. Pilin and sortase residues critical for endocarditis- and biofilm-associated pilus biogenesis in *Enterococcus faecalis*, **Journal Bacteriology**, v 195, p.4484 –4495, 2013.
- ÖZDEN ,T.B .et al. Occurrence of enterocin genes, virulence factors, and antibiotic resistance in 3 bacteriocin-producer *Enterococcus faecium* strains isolated from Turkish tulum cheese. **Turkish Journal of Biology**,v. 37, p 443–449, 2013.
- PILLAI et al. Effects of glucose on *fsr*-mediated biofilm formation in *Enterococcus faecalis*, **Journal of Infection Disease**, v.190, p.967–970, 2004.
- PRAKASH, B.;VEEREGOWDA, B. M.; KRISHNAPPA, G. Biofilms: a survival strategy of bacteria.**Current Science**, v.85, p.1299.1306, 2003.
- RAMADHAN, A.; HEGEDUS, E. Biofilm formation and *esp* gene carriage in enterococci. **Journal of clinical pathology**,v. 58, p.685-686, 2005.
- RICE, L.B. et al. A potential virulence gene, *hyl Efm*, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. **Journal of Infection in Developing Countries** v.187, p, 508–512,2003.
- SILLANPÄÄ, J.et al.Contribution of individual Ebp pilus subunits of *Enterococcus faecalis* OG1RF to pilus biogenesis, biofilm formation and urinary tract infection. **PLoS One** , v. 8, 2013.

- SILLANPÄÄ, J. et al. A family of putative MSCRAMMs from *Enterococcus faecalis*. **Microbiology**. v. 150, p. 2069–2078, 2004.
- SILVA, S. et al. Silicone colonisation by non- *Candida albicans* *Candida* species in the presence of urine **Journal of Medical Microbiology**. v. 59, p.747-754, 2010.
- STEPANOVIC, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *staphylococci*. v. 5, p.687-690, 2007.
- TALEBI, M. et al. Antibiotic Resistance and Biofilm Formation of *Enterococcus faecalis* in Patient and Environmental Samples. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v.8, 2015.
- TENDOLKAR, P.M et al. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. **Infection and Immunity**, v.72, p.6032–9,2004.
- THURLOW, L.R. et al. Gelatinase Contributes to the Pathogenesis of Endocarditis Caused by *Enterococcus faecalis*. **Infection and Immunity**. v. 78, p. 4936–4943, 2010.
- TSIGRELIS, C., et al. Vancomycin resistant *Enterococcus faecalis* endocarditis: linezolid failure and strain characterization of virulence factors. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p.631–635, 2007.
- TSIKRIKONIS et al. Differences in biofilm formation and virulence factors between clinical and fecal enterococcal isolates of human and animal origin. **Microbial Pathogenesis**. v. 52, p.336–343, 2012.
- VANKERCHOVEN, V. et al.. Development of a multiplex PCR for the Detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl*, genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 4473-4479, 2004.