



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

ELISA BITTENCOURT DE MARQUES

**ESTUDO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME EM SUPERFÍCIES
ABIÓTICAS: INFLUÊNCIA DE
CÁTIONS DIVALENTES E A OCORRÊNCIA DE
DETERMINANTES DE VIRULÊNCIA EM AMOSTRAS
CLÍNICAS DE *Enterococcus faecalis*.**

Londrina

2004

ELISA BITTENCOURT DE MARQUES

ESTUDO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME EM SUPERFÍCIES
ABIÓTICAS: INFLUÊNCIA DE
CÁTIONS DIVALENTES E A OCORRÊNCIA DE
DETERMINANTES DE VIRULÊNCIA EM AMOSTRAS
CLÍNICAS DE *Enterococcus faecalis*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Suzart dos Santos

Londrina

2004

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e irmãos

AGRADECIMENTOS

Agradeço

aos meus pais, José Antônio e Maria Christina, aos meus irmãos, Marisa e Guilherme, e a todos os meus familiares pelo apoio, carinho e torcida durante a elaboração deste trabalho

especialmente à Marisa e ao Flávio pela companhia nas “intermináveis” madrugadas na UEL.

ao Prof. Dr. Sérgio Suzart pelo trabalho de orientação

à Prof. Dra. Gislene Garcia F. Nascimento por me iniciar na pesquisa, sempre me incentivando e acreditando no meu trabalho

aos colegas de mestrado, Patrícia, Cíntia, Frank, Luís, Dóris, Fernanda, Rafael, Glaciela, Odair, Alice, Lígia e Newton pelo companheirismo e pela amizade.

às amigas, Mariana, Eliana e Cecília pela amizade e pelas dicas dadas durante a elaboração desta dissertação.

ao Prof. Dr. Silvano César da Costa pelo tratamento estatístico aos resultados deste trabalho.

aos professores do Departamento de Microbiologia, em especial às professoras Dra. Halha Ostrensky Saridakis, Dra. Jacinta Sanchez Pelayo e Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta por permitirem o uso dos laboratórios e dos equipamentos.

às funcionárias, Rosilda, Marta, Claci, Valdelice e Iara, pela atenção e colaboração.

*O meu olhar é nítido como um girassol.
Tenho o costume de andar pelas estradas
Olhando para a direita e para a esquerda,
E de vez em quando olhando para trás...
E o que vejo a cada momento
É aquilo que nunca antes eu tinha visto,
E eu sei dar por isso muito bem...
Sei ter o pasmo essencial
Que tem uma criança se, ao nascer,
Reparasse que nascera deveras...
Sinto-me nascido a cada momento
Para a eterna novidade do Mundo.”*

(Alberto Caeiro / Fernando Pessoa)

RESUMO

As espécies do gênero *Enterococcus* normalmente habitam o trato gastrointestinal de humanos e animais, mas também são encontrados no trato geniturinário e na cavidade oral de seres humanos, também nos vegetais, nas plantas, superfícies aquosas, solo e alimentos. *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, principais espécies pertencentes a este gênero, podem provocar uma variedade de infecções bacterianas. Porém, a origem destas infecções ainda permanece incerta, assim como o mecanismo de patogenicidade destes microrganismos. Um outro grande problema relacionado com o aparecimento de infecções é a formação de biofilme que possibilita a aquisição de genes. A formação de biofilme confere proteção em relação ao sistema imune e resistência a certos antimicrobianos. Além disso, pode resultar no aparecimento de diversas infecções conseqüentes a colonização dos tecidos e a implantação de instrumentos médicos, como sondas, cateteres e próteses, que servem como substrato para o crescimento microbiano. Diante da importância e da participação deste gênero bacteriano nas diversas infecções nosocomiais, este trabalho procurou analisar numa coleção de amostras clínicas de *E. faecalis*, os diferentes determinantes de virulência. Além disso, averiguou-se uma possível correlação entre a presença de genes de virulência e formação de biofilme em diferentes superfícies abióticas (vidro e poliestireno). A habilidade em formar biofilme nas superfícies abióticas mostrou-se diferente para as amostras clínicas e dependente da superfície utilizada, ocorrendo uma maior formação em vidro que em poliestireno. Porém esta diferença não estava relacionada a origem destas amostras. Os fatores que possivelmente poderiam interferir com a formação de biofilme em vidro e em poliestireno foram avaliados. Entre estes fatores foram analisados a formação de biofilme nas diferentes fases da curva de crescimento, a participação de cátions divalentes, grau de hidrofobicidade e mecanismo de *quorum sensing* no processo de formação da camada de biofilme. As diferentes fases da curva de crescimento mostraram-se bastante influentes na formação de biofilme, onde a maior formação ocorreu no final da fase exponencial e início da fase estacionária, correspondendo ao período de 15 h. As participações de cátions divalentes (zinco, cálcio, cobre, magnésio e ferro) no processo de formação do biofilme em ambas as superfícies foram avaliadas. Os íons ferro e cobre influenciaram significativamente na formação da camada de biofilme. O íon ferro reduziu significativamente o número de células bacterianas aderidas a ambas as superfícies, enquanto que o íon cobre depletou a formação de biofilme, sendo que essa influência apresentou-se dependente das concentrações de ambos os íons. Quanto ao grau de hidrofobicidade, este se mostrou dependente do tempo de análise, pois em 8 h (fase exponencial) ocorreu uma alteração significativa da hidrofobicidade, onde a frequência das amostras hidrofóbicas foi maior. O mecanismo de *quorum sensing* não foi observado no tempo utilizado durante a realização do experimento (15 h). Os nove determinantes de virulência analisados (*cyIMBA*, *efaA*, *enIA*, *eep*, *esp*, *aggA* e *gelE*) para as 95 amostras clínicas de *E. faecalis* apresentaram-se amplamente distribuídos, sendo que a grande maioria não apresentou associação com a origem das amostras. Quanto a possível associação entre determinantes de virulência e formação de biofilme em vidro e em poliestireno, apenas *cyIMBA*, *enIA*, *efaA*, *aggA*, *gelE* e *eep* mostraram-se associados à superfície utilizada e a classificação das amostras quanto à capacidade de formar biofilme.

Os isolados clínicos de *E. faecalis* aderiram mais fortemente à superfície de vidro em relação ao poliestireno e essa formação mostrou-se dependente do tempo de cultivo utilizado na análise, da concentração dos íons ferro e cobre, além da hidrofobicidade. Quanto aos determinantes analisados, estes se mostraram amplamente distribuídos entre as amostras e associados com a formação de biofilme tanto em vidro quanto em poliestireno.

ABSTRACT

The species of the *Enterococcus* genus usually reside in the gastrointestinal tract of humans and animals, but they are also found in the genitourinary tract and in the oral cavity of humans, besides in vegetables, plants, water surfaces, soil and foods. *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*, the main strains belonging to this genus, can cause a multitude of bacterial infections. The origin of these infections remains unclear, as well as the pathogenicity mechanism of these microorganisms. Another great problem related to the infection onset is the biofilm formation, once it allows for the gene acquisition between cells. The biofilm formation brings protection against the immune system and confers resistance to certain antimicrobials. Moreover, it can also result in the onset of several infections resulting from the tissue colonization and the implanting of medical devices, such as probes, catheters and prosthesis, that serve as substratum for the microbial growth. Given the importance and the participation of this bacterial genus on several nosocomial infections, this study sought to identify the different virulence determinants in clinical isolates of *E. faecalis*. It was also checked the possible correlation between the presence of these virulence genes and the biofilm formation on different abiotic surfaces (glass and polystyrene). The biofilm-forming ability on both surfaces was shown to be different for the clinical isolates and dependent on the surface used, the greatest biofilm formation occurred on glass surface than on polystyrene one. Although this difference was not related to the isolates origin. The factors which could possibly interfere on the biofilm formation on glass and polystyrene were assessed. The biofilm formation on different growth curve phases, participation of divalent cations, hydrophobicity degree and quorum sensing mechanism on biofilm formation process were analyzed. The different growth curve phases were shown to be quite influential on the biofilm formation on both surfaces and the greatest formation occurred in the end of the exponential phase and in the beginning of the stationary phase, corresponding to 15 hours. The participation of divalent cations (calcium, zinc, magnesium, iron and copper) on the biofilm formation in both surfaces were evaluated. Iron and copper were shown to be quite significative in relation to the biofilm layer formation. While iron significantly reduced the number of bacterial cells adhered to both surfaces, copper was responsible for depleting the biofilm formation. This influence appeared depending on the concentration of both ions. The hydrophobicity degree was found to be dependent on the time of analysis, because the degree was significantly altered in 8 hours (exponential phase), which most of isolates was hydrophobic. The nine virulence determinants analyzed (*cylMBA*, *efaA*, *enIA*, *eep*, *esp*, *aggA* and *gelE*) in the 95 *E. faecalis* clinical isolates were widely spread, showing no association with the origin of the isolates. As for the possible association between these virulence determinants and biofilm formation on glass and polystyrene, only *cylMA*, *enIA*, *efaA*, *aggA*, *gelE* and *eep* were shown associated and dependant on the material used and the classification of the isolates according to the capacity of biofilm formation. The *E. faecalis* clinical isolates adhered more strongly to the glass surface comparing to the polystyrene one and this formation was shown to be dependant on the time of the analysis, on the copper and iron ion concentration, besides on the hydrophobicity. The analyzed determinants were widely spread between the isolates and some of them are associated with the biofilm formation on both glass and polystyrene.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição das amostras de <i>Enterococcus faecalis</i> isoladas de pacientes com infecção urinária atendidos no Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná (HURNP).....	30
Tabela 2 – Descrição das amostras de <i>E. faecalis</i> isoladas de swab retal de pacientes atendidos no Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná (HURNP)	32
Tabela 3 – Descrição das amostras de <i>E. faecalis</i> isoladas de exsudato purulento de pacientes atendidos no Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná (HURNP).....	33
Tabela 4 – Seqüências de oligonucleotídeos utilizadas para pesquisa de prováveis determinantes de virulência em amostras clínicas de <i>E. faecalis</i> através da reação em cadeia da DNA polimerase (PCR)	42
Tabela 5 – Frequência de amostras clínicas de <i>E. faecalis</i> formadoras de biofilme em superfície de vidro	67
Tabela 6 – Frequência de amostras clínicas de <i>E. faecalis</i> formadoras de biofilme em superfície de poliestireno	68
Tabela 7 – Frequência de amostras clínicas de <i>E. faecalis</i> formadoras de biofilme em diferentes superfícies abióticas	69
Tabela 8 - Distribuição de amostras clínicas de <i>E. faecalis</i> formadoras de biofilme segundo o grau de hidrofobicidade	70
Tabela 9 - Distribuição de determinantes de virulência em amostras de <i>E. faecalis</i> isoladas de diferentes materiais clínicos	71
Tabela 10 - Distribuição de determinantes de virulência entre amostras clínicas de <i>E. faecalis</i> formadoras de biofilme em superfície de vidro	73
Tabela 11 - Distribuição de determinantes de virulência entre amostras clínicas de <i>E. faecalis</i> formadoras de biofilme em superfície de poliestireno.....	75
Tabela 12 - Ocorrência dos principais perfis genotípicos relativos à presença simultânea de genes de virulência encontrados em amostras de <i>E. faecalis</i> isoladas de diferentes materiais clínicos	77
Tabela 13 – Distribuição de determinantes de virulência em amostras clínicas de <i>E. faecalis</i> segundo a presença de genes detectados por PCR	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Curvas de crescimento de amostras representativas de <i>E. faecalis</i> isoladas de urina	80
Figura 2 - Formação de biofilme em vidro e poliestireno entre amostras representativas de <i>E. faecalis</i> isoladas de diferentes materiais clínicos	81
Figura 3 - Formação de biofilme em microplacas de poliestireno entre amostras clínicas representativas de <i>E. faecalis</i>	82
Figura 4 - Cinética de formação de biofilme na superfície de vidro em amostras representativas de <i>E. faecalis</i>	83
Figura 5 - Cinética de formação de biofilme na superfície de poliestireno em amostras representativas de <i>E. faecalis</i>	84
Figura 6 - Influência de cátions divalentes na formação de biofilme em vidro para amostras representativas de <i>E. faecalis</i>	85
Figura 7 - Influência de cátions divalentes na formação de biofilme em poliestireno para amostras representativas de <i>E. faecalis</i>	86
Figura 8 - Influência da concentração de íon Fe^{+2} na formação de biofilme em amostras representativas de <i>E. faecalis</i> aderidas à superfície de vidro	87
Figura 9 - Influência da concentração de íon Fe^{+2} na formação de biofilme em amostras representativas de <i>E. faecalis</i> aderidas à superfície de poliestireno	88
Figura 10 - Influência da concentração de íon Cu^{+2} na formação de biofilme em superfície de vidro em amostras representativas de <i>E. faecalis</i>	89
Figura 11 - Influência da concentração de íon Cu^{+2} na formação de biofilme em superfície de poliestireno em amostras representativas de <i>E. faecalis</i>	90
Figura 12 - Hidrofobicidade das amostras clínicas de <i>E. faecalis</i>	91
Figura 13 - Gel de agarose representativo contendo produtos de PCR de amostras clínicas de <i>E. faecalis</i>	92
Figura 14 - Gel de agarose representativo contendo produtos de PCR de amostras clínicas de <i>E. faecalis</i>	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Gerais:

(NH₄)₂SO₄	Sulfato de amônio
Arg	Arginina
Asp	Aspartato
ATP	Adenosina trifosfatada
BHI	Infuso de cérebro e coração
CaCl₂.2H₂O	Cloreto de cálcio diidratado
CaCl₂	Cloreto de cálcio
CuCl₂.2H₂O	Cloreto de cobre II diidratado
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO	Densidade óptica
ECM	Matriz extracelular
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FeCl₃	Cloreto férrico
FeSO₄.7H₂O	Sulfato ferroso heptaidratado
Gly	Glicina
HCl	Ácido clorídrico
KCl	Cloreto de potássio
KH₂PO₄	Fosfato monobásico de potássio
LB	Luria Bertani
MgCl₂.6H₂O	Cloreto de magnésio hexaidratado

MgSO₄.7H₂O	Sulfato de magnésio heptaidratado
MnSO₄.H₂O	Sulfato de manganês hidratado
Na₂EDTA. 2 H₂O	EDTA dissódico hidratado
Na₂HPO₄	Fosfato dibásico de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaH₂PO₄	Fosfato monobásico de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
Ser	Serina
TEB	Tris-EDTA-borato
Tris	Tris [hidroximetil] aminometano
UFC	Unidade formadora de colônia
Val	Valina
ZnCl₂	Cloreto de zinco

Unidades

β	Beta
μL	Microlitro
cm	Centímetro
g	Gramma
g/L	Gramma por litro
h	Horas
L	Litro
M	Molar
mA	Miliampéres

min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
nm	nanômetro
pmoles	Picomoles
rpm	Rotações por minuto
UFC/cm²	Unidade formadora de colônia por centímetro quadrado
UFC/mL	Unidade formadora de colônia por mililitro
V	Volts

SUMÁRIO

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS	16
1.2 EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES NOSOCOMIAIS.....	17
1.3 FATORES QUE CONTRIBUEM PARA O PROCESSO DE PATOGENICIDADE ENTEROCÓCICA	19
1.3.1 Resistência aos agentes antimicrobianos	19
1.3.2 Determinantes de virulência em <i>E. faecalis</i>	20
1.4 BIOFILME: CONCEITOS, IMPORTÂNCIA E FORMAÇÃO	24
2 OBJETIVOS	28
2.1 OBJETIVO GERAL	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 AMOSTRAS BACTERIANAS	29
3.2 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES	34
3.2.1 Meios de cultura	34
3.2.1.1 Caldo Infusão de cérebro e coração (BHI)	34
3.2.1.2 Caldo Infusão de cérebro e coração (caldo BHI) suplementado com glicose a 1%	34
3.2.1.3 Ágar Infusão de cérebro e coração (ágar BHI)	34
3.2.1.4 Caldo Luria-Bertani (LB)	35
3.2.1.5 Ágar Luria Bertani (LB)	35
3.2.1.6 Meio AT 1X	35
3.2.2 Soluções	36
3.2.2.1 Soluções utilizadas nos ensaios de formação de biofilme	36
3.2.2.1.1 Solução de Cloreto de Sódio a 0,85% (Solução salina)	36
3.2.2.1.2 Soluções de Safranina a 0,1%	36
3.2.2.1.3 Solução de Cristal Violeta de Hucker	36
3.2.2.1.4 Solução de Triton X-100 a 0,1%	37
3.2.2.1.5 Solução de Cloreto de Cálcio a 10 mM	37
3.2.2.1.6 Solução de Cloreto de Zinco a 10 mM	37

3.2.2.1.7 Solução de Cloreto de Magnésio a 10 mM	38
3.2.2.1.8 Solução de Cloreto Férrico a 10 mM	38
3.2.2.1.9 Solução de Cloreto de Cobre II a 10 mM	38
3.2.2.2 Soluções usadas nos ensaios de hidrofobicidade (SAT – “Salt Aggregation Test”)	39
3.2.2.2.1 Solução-tampão Fosfato de Sódio a 1 M (pH 6,8)	39
3.2.2.2.2 Solução de Sulfato de Amônio a 10 M	39
3.2.2.3 Soluções para o ensaio de detecção da produção de N-acilhomoserina lactona (AHL)	40
3.2.2.3.1 Solução-tampão AT 20 X (pH 7,0)	40
3.2.2.3.2 Solução de Sais AT 20 X	40
3.2.2.4 Soluções e reagentes para a identificação genotípica de determinantes de virulência através de PCR.....	41
3.2.2.4.1 Solução-tampão Tris-HCl a 1,5 M (pH 8,4)	41
3.2.2.4.2 Solução-tampão para PCR 10 X	41
3.2.2.4.3 Solução-tampão de dissolução de desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs)	41
3.2.2.4.4 Solução-tampão de dNTPs a 10 mM	42
3.2.2.4.5 Oligonucleotídeos utilizados na pesquisa de determinantes de virulência	42
3.2.2.4.6 Solução de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) a 10%	44
3.2.2.4.7 Solução-tampão de aplicação de amostra de DNA (6X)	44
3.2.2.4.8 Solução-tampão Tris-EDTA-Borato (TEB) 10 X	44
3.2.2.4.9 Gel de Agarose a 1%	45
3.2.2.4.10 Solução de Brometo de Etídio (5mg/mL)	45
3.3 METODOLOGIA	45
3.3.1 Estimativa da curva de crescimento	45
3.3.2 Detecção da formação de biofilme	46
3.3.2.1 Ensaio qualitativo em lamínulas de vidro	46
3.3.2.2 Ensaio quantitativo	47
3.3.2.2.1 Ensaio em lamínulas de vidro	47
3.3.2.2.2 Ensaio em placas de poliestireno	47
3.3.2.3 Determinação da produção de biofilme nas diferentes fases da curva de crescimento	49

3.3.3 Influência de cátions divalentes na formação de biofilme em diferentes superfícies abióticas	50
3.3.4 Ensaio de hidrofobicidade (SAT – “Salt Aggregation Test”)	50
3.3.5 Ensaio para detecção de N-acetilhomoserina lactona (AHL)	51
3.3.6 Detecção de genes de virulência em amostras clínicas de <i>E. faecalis</i>	52
3.3.6.1 Extração de DNA total	52
3.3.6.2 Reação em cadeia da DNA polimerase (PCR)	53
3.3.6.3 Eletroforese em gel de agarose do produto amplificado	53
3.7 Análise estatística	54
4 RESULTADOS	55
4.1 ESTIMATIVA DA CURVA DE CRESCIMENTO	55
4.2 QUANTIFICAÇÃO DA CAMADA DE BIOFILME FORMADA EM LAMÍNULAS DE VIDRO	55
4.3 QUANTIFICAÇÃO DA CAMADA DE BIOFILME FORMADA EM POLIESTIRENO.....	57
4.4 DETERMINAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME EM DIFERENTES FASES DA CURVA.....	59
4.5 INFLUÊNCIA DE CÁTIOS DIVALENTES NA FORMAÇÃO DE BIOFILME EM DIFERENTES SUPERFÍCIES ABIÓTICAS	60
4.6 TESTE DE HIDROFOBICIDADE (SAT)	63
4.7 ENSAIO PARA DETECÇÃO DE N-ACETILHOMOSERINA LACTONA (AHL)	64
4.8 PESQUISA DE GENES DE VIRULÊNCIA.....	64
5 DISCUSSÃO	94
6 CONCLUSÃO	104
REFERÊNCIAS	106
ANEXO	117

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS

O gênero *Enterococcus* sp. caracteriza-se por apresentar cocos Gram-positivos arranjados em cadeia, catalase negativos, não esporulantes e anaeróbios facultativos (MORRISON et al. 1997; GIARD et al., 1997). Inicialmente, a denominação *Enterococcus* sp. foi proposta por Thiercelin (1899) para definir uma bactéria Gram-positiva encontrada no trato gastrintestinal (*apud* MORRISON et al., 1997). Em 1933, Rebecca Craighill Lancefield classificou os estreptococos em grupos sorológicos de acordo com a presença de um antígeno de superfície de natureza glicídica. O gênero *Enterococcus* sp. foi incluído no grupo D dos estreptococos por apresentar um carboidrato de parede celular considerado como antígeno de superfície (ácido teicóico contendo glicerol) pertencente ao grupo D de Lancefield. Posteriormente, estudos moleculares e taxonômicos possibilitaram a inclusão de espécies como *Streptococcus faecalis* e *S. faecium* em um novo gênero designado de *Enterococcus* sp. (SCHLIEFER e KILPER-BÄLZ, 1984).

Atualmente, este gênero compreende vinte e seis espécies, destacando-se *E. faecalis* e *E. faecium* como as principais espécies envolvidas em infecções humanas e animais (FRANZ et al., 1999). As espécies pertencentes ao gênero *Enterococcus* sp. apresentam perfis bioquímicos distintos revelando que determinados substratos como carboidratos podem ser utilizados por uma determinada espécie e não por outra pertencente ao gênero. De modo geral, estes microrganismos apresentam particularidades que auxiliam em sua identificação como sobreviverem à variação de temperatura entre 10° e 60°C por 30 min, em ambiente hiperosmótico na presença de NaCl a 6,5% e variação de pH entre 5,0 e pH 9,6. (WILLEY et al., 1999).

As espécies *E. faecalis* e *E. faecium* normalmente habitam o trato gastrintestinal de humanos e animais, mas podem ser liberados para o meio ambiente através do material fecal podendo sobreviver por um longo período de tempo (KÜNH et al., 2000). Além disso, estas espécies são encontradas no trato geniturinário e na cavidade oral de humanos e, em plantas, superfícies aquosas,

solo e alimentos (DEVRIESE et al., 1992; MULLER et al., 2001; ROZDZINSKI et al., 2001; ARCHIMBAUD et al., 2002; LEROY e VUYST, 2002; RABICH et al., 2003).

Diversos estudos têm apontado para participação destas espécies em uma variedade de infecções bacterianas tais como endocardites, bacteremia, infecções urinárias, dentre outras (JONES et al., 1997; GIACOMETTI et al., 2000; ROZDZINSKI et al., 2001; HIGAKI et al., 2002). Durante a década de 80, estas espécies estabeleceram-se como patógenos nosocomiais encontrados em maior frequência em unidades de tratamento intensivo e em pacientes imunodeprimidos (MOELLERING, 1992; HUYCKE et al., 1998; HIGAKI et al., 2002). Neste período, o número de infecções associadas com as principais espécies aumentou consideravelmente (MORRISON et al., 1997; FRANZ et al., 1999).

1.2 EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES NOSOCOMIAIS

A origem das infecções nosocomiais associada com o gênero *Enterococcus* sp. ainda não está completamente esclarecida, porém sugere-se que algumas espécies pertencentes à própria microbiota endógena do trato gastrointestinal sejam responsáveis por estas infecções ou em virtude da possibilidade de disseminação via intra-hospitalar (JOHNSON, 1994; JETT et al., 1994). A fonte de contaminação destes pacientes ainda é incerta, pois em geral amostras de *Enterococcus* sp. são isoladas de culturas mistas de microrganismos. Das espécies pertencentes a este gênero, *E. faecalis* é encontrada com maior frequência (80-90% dos casos) em casos considerados de infecção nosocomial, enquanto que *E. faecium* está associada particularmente a casos de infecções reincidentes (FRANZ et al., 1999; GIRAFFA, 2002).

Diversos estudos têm apontado para a participação de algumas espécies pertencentes ao gênero *Enterococcus* sp. em casos de bacteremias e, conseqüentemente, em menor extensão, em endocardites (JONES et al., 1997; LAUTENBACH et al., 1999; SHANKAR et al., 1999; ELSNER et al., 2000; WAAR et al., 2002; HAMMERUM e JENSEN, 2002; VERGIS et al., 2002). De modo geral, bacteremias podem evoluir para um quadro clínico de endocardites enterocócicas. Além disso, o risco de adquirir endocardite enterocócica é maior em pacientes advindos da comunidade com um quadro estabelecido de bacteremia que em casos

adquiridos no ambiente hospitalar segundo o estudo realizado por Maki e Agger (1988).

O gênero *Enterococcus* sp. causa cerca de 5% a 18% dos casos de endocardites envolvendo infecções nas válvulas cardíacas e nas próteses cardíacas, sendo que a maioria destas infecções está associada com a presença da espécie *E. faecalis* (FRANZ et al., 1999; XIAO et al., 1998). A ocorrência deste patógeno em casos de endocardites após bacteremias deve-se em parte a capacidade de aderir especificamente ao endotélio cardíaco através de adesinas contendo resíduos de carboidratos, particularmente de D-galactose e L-fucose (GUZMÁN et al. 1989).

Por décadas, a ocorrência de patógenos comumente associados às infecções urinárias, particularmente Gram-negativos, permanece inalterada. *Escherichia coli* é o principal agente etiológico encontrado em aproximadamente 75-90% das infecções urinárias (HOOTON e STAMM, 1997). Por outro lado, o restante dos casos associados a este tipo de infecção são normalmente causados por espécies pertencentes ao gênero *Staphylococcus* sp., *Proteus* sp., *Klebsiella* sp.e, por fim, *Enterococcus* sp. Nas últimas duas décadas, o número de casos de infecções urinárias associadas com amostras de *E. faecalis*, isoladas de pacientes ambulatoriais e/ou hospitalizados, vem aumentando paralelamente ao fenômeno de resistência aos principais agentes antimicrobianos utilizados na terapêutica médica.

A patogênese das infecções microbianas causadas por uma variedade de microrganismos segue uma seqüência de eventos que compreende três etapas principais: colonização de um sítio específico normalmente relacionado com a superfície de mucosa de tecidos; resistência aos mecanismos de defesas específicas e não específicas do hospedeiro e, por fim, alterações celulares associadas diretamente com a produção de toxinas ou indiretamente pela indução de resposta inflamatória (JOHNSON, 1994). Diversos estudos observaram que amostras clínicas de *E. faecalis* interagiram efetivamente com uma diversidade de estruturas, dentre as quais proteínas da matriz extracelular e células da mucosa colônica (JETT et al., 1994; ISENMANN et al., 2000; ROZDZINSKI et al., 2001). Apesar disso, as etapas relacionadas com o evento de adesão celular que habilita este patógeno a aderir a um determinado epitélio ainda precisam ser esclarecidas.

1.3 FATORES QUE CONTRIBUEM PARA O PROCESSO DE PATOGENICIDADE ENTEROCÓCICA

Os fatores que contribuem para a patogenicidade dos enterococos ainda não estão esclarecidos, porém sugere-se que a resistência a uma variedade de agentes antimicrobianos bem como a expressão de determinados fatores de virulência poderia de uma certa forma contribuir para processos celulares como adesão, translocação, evasão do sistema imune e alterações patológicas (MOELLERING, 1992; HUYCKE et al., 1998; DUPONT et al., 1998; FRANZ et al., 2001).

1.3.1 Resistência aos agentes antimicrobianos

Atualmente, o grande problema no tratamento de infecções bacterianas associadas com a presença de espécies pertencentes ao gênero *Enterococcus* sp. reside na aquisição de genes que conferem resistência a uma variedade de agentes antimicrobianos. Este gênero apresenta resistência intrínseca ao grupo das cefalosporinas, lincosaminas, β -lactâmicos, aminoglicosídeos, dentre outros (PORTILLO et al., 2000; FRANZ et al., 2001; SHEPARD e GILMORE, 2002). O fenômeno de resistência intrínseca é um evento considerado específico, uma vez que genes relacionados a este tipo em particular de resistência estariam localizados exclusivamente no cromossomo bacteriano (MURRAY, 1990; PORTILLO et al., 2000). Estes microrganismos ainda adquirem resistência as tetraciclinas, macrolídeos e glicopeptídeos (FOLEY e GILBERT, 1997). Estes genes podem ser adquiridos por mutação ou por transferência genética que ocorre via os processos de transformação, transdução ou conjugação mediada por feromônios, sendo que este último processo é considerado mais freqüente entre as espécies pertencentes ao gênero *Enterococcus* sp. (MURRAY, 1990; GIRAFFA, 2002).

O aparecimento de amostras clínicas de *E. faecalis* resistentes a vancomicina (VRE) trouxe consigo um enorme problema para o tratamento das principais infecções enterocócicas, pois reduziu as alternativas terapêuticas devido ao perfil de multirresistência inerente a este patógeno emergente (LANDMAN e QUALE, 1997; DENNESEN et al., 1998; LAUTENBACH et al., 1999; PORTILLO et al., 2000).

A transmissão de amostras VRE pela comunidade é um mecanismo ainda não conhecido, porém diversas hipóteses têm sido aventadas dentre as quais destacam-se a presença de fatores predisponentes relacionados aos pacientes, terapias antimicrobianas e uso de glicopeptídeos em ração animal como promotores do crescimento, como a avoparcina (HUYCKE et al. 1998; KÜHN et al., 2000).

1.3.2 Determinantes de virulência em *E. faecalis*

Os determinantes de virulência como adesinas, toxinas, proteínas de superfície, feromônios e outros fatores podem contribuir no processo de patogenicidade enterocócica habilitando amostras de *E. faecalis* a aderirem, invadirem e a escaparem dos principais mecanismos de defesa do hospedeiro (DUPONT et al., 1998; GIRAFFA, 2002; WAAR et al., 2002). Apesar de diversos fatores de virulência terem sido identificados e caracterizados na literatura científica, o mecanismo pelo qual estes determinantes de virulência contribuem para a patogênese enterocócica é completamente desconhecido.

Algumas amostras de *E. faecalis* produzem uma toxina capaz de lisar uma variedade de espécies de eritrócitos, macrófagos, neutrófilos e de interferir no crescimento de determinadas espécies bacterianas. Estudos envolvendo mutação insercional e conjugação demonstraram que este fator é constituído de um locus genético que apresenta simultaneamente propriedades hemolíticas e bactericidas (HASS e GILMORE, 1999). Este determinante designado de citolisina é um lantibiótico do tipo A que pode ser codificado tanto por um plasmídeo de alto peso molecular sensível ao feromônio quanto pelo cromossomo de amostras de *E. faecalis* (IKE et al., 1990; GILMORE et al., 1994, SEMEDO et al., 2003).

Estudos de análises genéticas revelaram que o operon da citolisina é constituído por seis genes responsáveis pela produção e maturação desta toxina. Este operon contém dois genes estruturais, *cyL_L* e *cyL_S*, cujos os produtos gênicos são modificados postraducionalmente pelo produto do gene *cyM*. Uma vez modificados, o produto do gene *cyB* remove a porção aminoterminal da seqüência líder transportando os peptídeos modificados através da membrana citoplasmática. No espaço extracelular, *CyL_L* e *CyL_S* são ativados através da ação de *CyIA* que remove uma seqüência GDVQAE encontrada na região aminoterminal de ambos

peptídeos estruturais. Em conjunto, estas subunidades estruturais ativadas são capazes de lisar tanto células procarióticas quanto eucarióticas (GILMORE et al., 1994; HASS e GILMORE, 1999; HASS et al., 2002; SEMEDO et al., 2003).

Substância de agregação (Agg) é uma proteína de superfície codificada por genes plasmídiais sensíveis a feromônios que apresenta a propriedade de favorecer o processo de conjugação tornando a superfície da bactéria doadora susceptível ao processo de adesão celular (JETT et al., 1998; WELLS et al., 2000). Esta proteína possui domínios RGD (seqüências Arg-Gly-Asp-Ser e Arg-Gly-Asp-Val) que reconhecem as integrinas, uma família de receptores de células eucarióticas (GALLI et al., 1990). A síntese da substância de agregação é regulada pela expressão de *iAD1* que inibe competitivamente a atividade do feromônio *cAD1* produzido pelas células receptoras (DUNNY et al., 1995; AN et al., 1999).

Estudos de virulência realizados em modelos animais revelaram que a substância de agregação permite que o microrganismo apresente a capacidade de aderir às células tubulares renais e invadir células epiteliais intestinais (SCHLIEVART et al., 1998; ISENMANN et al., 2000; SARTINGEN et al., 2000). Algumas evidências sugerem que o processo de adesão em linhagens celulares como macrófagos e leucócitos polimorfonucleares é mediado através de interação entre a integrina CR3 e o domínio RGD da proteína, o que possibilitaria a entrada do patógeno na célula eucariótica e, subsequente, interferência no processo de explosão respiratória (VANEK et al., 1999; RAKITA et al., 1999; SÜBMUTH et al., 2000).

O feromônio *cAD1*, após ser liberado, é captado pela célula receptora por *TraC*, um receptor de membrana, e liga-se a *TraA*. Esta ligação induz a expressão do promotor de *iad*, gerando *TraE1*, responsável pela ativação da expressão da substância de agregação (*Asa1*), codificada pelo plasmídeo *pAD1*. Este feromônio tem sua expressão aumentada em função da expressão de um determinante cromossomal (*eep*) com características hidrofílicas, porém este gene não contém a seqüência necessária para a síntese do feromônio. Acredita-se que o papel da proteína *Eep*, por sua similaridade com metaloproteases, esteja relacionado com o processamento e/ou transporte dos precursores de *cAD1*. Entretanto, ainda não há dados na literatura que revelem a freqüência deste gene na população enterocócica (AN et al., 1999; LAZAZZERA, 2001).

Gelatinase é uma peptidase, codificada pelo gene *gelE*, capaz de hidrolisar gelatina, colágeno, caseína, hemoglobina e outros pequenos peptídeos biologicamente ativos, sendo sua atividade associada a processos inflamatórios, mas ainda pouco se sabe sobre sua participação no processo de patogenicidade (JETT et al., 1994; FRANZ et al., 1999; ELSNER et al., 2000). Analisando o operon da gelatinase, verifica-se que à jusante do gene *gelE* encontra-se um gene que codifica para uma serina protease e à montante o agrupamento de genes *fsrABC* que regula tanto a produção de gelatinase quanto da serina protease (SU et al., 1991; QIN et al., 2000; MYLONAKIS et al., 2002).

O mecanismo de regulação da expressão de gelatinase e serina protease é dado por *quorum sensing*, onde a secreção de um feromônio ativador da biossíntese de gelatinase (GBAP) controla a produção de ambas as proteínas através de um sistema que compreende uma histidina proteína quinase, codificada por *fsrC*, e um regulador de resposta, codificado por *fsrA* (NAKAYAMA et al., 2001; NAKAYAMA et al., 2002). FsrB é traduzido como um precursor de GBAP e, posteriormente, é processado por um mecanismo desconhecido. GBAP é secretado e sua crescente concentração no meio induz a expressão do operon *fsrABC* que codifica para uma histidina quinase que funciona possivelmente como receptor para este feromônio, que ao ligar-se com GBAP, induz a expressão tanto de gelatinase quanto da serina protease. O produto de *fsrA* atua como um regulador da secreção de GBAP, pois limita a indução do mesmo, porém o mecanismo de regulação da expressão de FsrA ainda é desconhecido (NAKAYAMA et al., 2001).

Recentemente uma bacteriocina foi descrita em *E. faecalis*, a enterolisina A. Esta bacteriocina apresenta homologia com outras proteínas líticas e é responsável por lisar a parede celular de diversos microrganismos, tais como *Listeria monocytogenes* (NILSEN et al., 2003). A proteína madura (EnIA) apresenta um domínio com um grau de similaridade com domínios encontrados em metaloendopeptidases. Além disso, o gene *enIA* apresenta regiões repetitivas que supostamente possam ajudar EnIA a interagir com outras proteínas (NILSEN et al., 2003; HICKEY et al., 2003), facilitando a colonização deste microrganismo ao meio. Porém, a sua prevalência na população microbiana ainda permanece desconhecida e os estudos realizados até o momento apenas descrevem a sua presença em amostras isoladas de alimentos (NILSEN et al., 2003; HICKEY et al., 2003).

O gene *esp* é constituído de unidades de repetição (A, B e C), cujas seqüências são altamente conservadas, porém, recentemente, alguns estudos têm demonstrado que amostras de *E. faecalis* apresentando variações nestas unidades de repetição podem escapar efetivamente da resposta do sistema imune (SHANKAR et al., 1999; TOLEDO-ARANA et al., 2001; SHANKAR et al., 2001). Análises de seqüências homólogas ao gene *esp* revelaram que amostras clínicas de *E. faecium* apresentam diversas substituições de nucleotídeos tanto em regiões conservadas quanto em regiões não conservadas quando comparadas com seqüências oriundas de amostras de *E. faecalis*. Em conjunto, é possível que a variação estrutural encontrada dentro da seqüência que codifica para a proteína Esp em ambas as espécies possa estar contribuindo para o aparecimento de subpopulações dentro da espécie (WILLEMS et al., 2001; COQUE et al., 2002; HAMMERUM e JENSEN, 2002).

O gene *efaA* é um componente do operon *efaCBA* que codifica para um transportador de membrana responsável pelo fluxo de manganês na célula. O gene *efaC* codifica para uma ATPase; *efaB*, uma proteína transmembrânica hidrofóbica e *efaA*, o componente lipoprotéico deste transportador (LOWE et al., 1995; LOW et al., 2003). EfaA, um antígeno de *E. faecalis* inicialmente isolado do soro de um paciente com endocardite, possivelmente, atue como um receptor protéico do complexo transportador, onde sua expressão é regulada pela presença do íon manganês (LOWE et al., 1995). O mecanismo pelo qual esta proteína participa no processo de patogenicidade ainda não foi elucidado, entretanto alguns estudos têm demonstrado que aproximadamente 80% das amostras clínicas de *Enterococcus sp.* apresentam este determinante de virulência (EATON e GASSON, 2001; SEMEDO et al., 2003; DUPRÈ et al., 2003; CRETÍ et al., 2004). O estudo de Singh et al. (1998) sugeriu que o gene *efaA* possa ser útil como marcador genético de diferenciação entre *E. faecalis*, *E. faecium* e outras espécies, pois um variante do gene designado de *efaA_{fm}* foi identificado em amostras de *E. faecium* isoladas de leite.

Ace é uma proteína da superfície de *E. faecalis* que reconhece moléculas da matriz extracelular (MSCRAMM) (RICH et al., 1999; NALLAPAREDDY et al., 2000; HUBBLE et al., 2003). A proteína apresenta unidades repetitivas que variam em amostras de *E. faecalis*, porém o papel destas unidades ainda permanece desconhecido (RICH et al., 1999; NALLAPAREDDY et al., 2000).

Nallapareddy et al. (2002) demonstra que Ace tem a capacidade de ligar-se a componentes da matriz extracelular (colágeno e laminina) que podem estar sendo expostos em casos de lesão tecidual. A sua presença está associada com adesão à dentina, já que esta é composta de 90% de colágeno do tipo I (HUBBLE et al., 2003), a prevalência desta proteína em enterococos, segundo Creti et al. (2004) é de 100%.

A produção de polissacarídeos e a sua presença na superfície bacteriana favorecem a interação com a superfície hospedeira e, muitas vezes, protegem o microrganismo da ação do sistema imune através da resistência à fagocitose. O cluster gênico *epa* é responsável pela biossíntese de polissacarídeos imunorreativos e resistentes a fagocitose por leucócitos. Os genes desse cluster revelaram similaridade com os genes para a produção de ramnose, glicosil transferase e sistema de transporte dependente de ATP (TENG et al., 2002).

1.4 BIOFILME: CONCEITOS, IMPORTÂNCIA E FORMAÇÃO

Um grande problema relacionado com o aparecimento de infecções humanas é a formação de biofilme, que foi relatado primeiramente por Zobell (1943) (*apud* HABASH e REID, 1999). Basicamente, o biofilme consiste de uma população microbiana existente dentro de uma matriz extracelular, capaz de promover interações entre esta população e as superfícies bióticas e abióticas (COSTERTON et al., 1987; MARSHALL, 1992; HABASH e REID, 1999; DONLAN e COSTERTON, 2002; DUNNE Jr, 2002). De modo geral, esta população microbiana é formada de diversas espécies microbianas, dependendo do meio em que a mesma encontra-se aderida, pois metabólito de uma espécie pode servir de nutriente para a outra (COSTERTON et al., 1987; MARSHALL, 1992; BOWDEN e LI, 1997; PRATT e KOLTER, 1999; WATNICK e KOLTER, 2000; LAPPIN-SCOTT e BASS, 2001). O processo de formação de biofilme pode apresentar quatro etapas, incluindo a formação de um filme condicionante, aproximação da superfície, formação do glicocálice, crescimento da população microbiana nesta superfície e maturação do biofilme (COSTERTON et al., 1987; MARSHALL, 1992; WATNICK e KOLTER, 2000; DUNNE Jr, 2002).

A aproximação do microrganismo à superfície depende de uma série de fatores que incluem a espécie bacteriana, a composição da superfície, fatores ambientais, expressão de proteínas essenciais para a formação deste biofilme, além das forças que regem a interação microrganismo-substrato (COSTERTON et al., 1987; LAPPIN-SCOTT e BASS, 2001; DUNNE Jr, 2002). Inicialmente, a associação do microrganismo com o substrato é um processo reversível, pois, neste momento, onde a distância é maior que 10 nm, regem forças de interação como Van der Waals e eletrostáticas (MARSHALL, 1992; HABASH e REID, 1999). Se as forças eletrostáticas forem de natureza repulsiva, há a necessidade de formação de um filme condicionante, que pode ser favorecido devido à implantação de biomateriais com a propriedade de adsorver componentes do fluido corporal, alterando a carga do substrato e a energia livre disponível e, por fim, facilitando a aproximação do microrganismo (MARSHALL, 1992; BONNER et al., 1997; HABASH e REID, 1999; RUPP et al., 1999). À medida que a distância entre o microrganismo e o substrato torna-se menor que 10 nm, as forças de interação passam a ser irreversíveis, predominando as interações hidrofóbicas que podem favorecer adesinas específicas a reconhecer componentes do hospedeiro (HABASH e REID, 1999; RUPP et al., 1999).

O processo de adesão à superfície é mediado pela produção de exopolissacarídeos que formarão o glicocálice, responsável pelo processo de maturação deste biofilme, haja vista que a sua presença possibilita a captura de nutrientes, além de conferir certa proteção a esta população microbiana (COSTERTON, 1987; SHIRTLIFF et al., 2002). Na maioria das espécies, o glicocálice, conhecido como EPS (substâncias poliméricas extracelulares), é predominantemente aniônico, composto de exopolissacarídeos que podem conferir hidrofobicidade à superfície deste biofilme (BRIANDET et al., 2001; DUNNE Jr., 2002; GHIGO, 2003).

Uma vez que este microrganismo está irreversivelmente aderido ao substrato, inicia-se o processo de maturação do biofilme. A densidade e a complexidade do biofilme começam a aumentar, possibilitando a divisão celular e o aumento da produção de exopolissacarídeos que interagem com as moléculas do meio, formando o glicocálice (DUNNE Jr, 2002). Durante esse processo, há uma série de fatores que podem influenciar na maturação, como osmolaridade, pH, nutrientes, difusão de oxigênio. Esta população expande-se até atingir o equilíbrio

dinâmico, onde as células mais externas ao biofilme começam a destacar-se, possibilitando a colonização de outros substratos (MARSHALL, 1992; DUNNE Jr, 2002). A formação de biofilme pode ser regulada pelo mecanismo de *quorum sensing* que representa um processo celular relacionado com a regulação da expressão gênica (LAZAZZERA, 2000).

Estruturalmente, um biofilme é formado de células bacterianas (cerca de 15% do volume) e uma matriz polissacarídica, onde estas células encontram-se dispersas formando microcolônias. Entre estas microcolônias há canais por onde é possível ocorrer a passagem de água e nutrientes para as células localizadas mais internamente ao biofilme (DAVEY e O'TOOLE, 2000; DONLAN e COSTERTON, 2002). A disponibilidade de nutrientes é um fator essencial tanto para a estrutura de um biofilme bem como para a formação do filme condicionante, aderência das células microbianas, produção de matriz polissacarídica e competição bacteriana no estágio de maturação deste biofilme (BOWDEN e LI, 1997). Esta estrutura possibilita a aquisição de genes entre as células, por facilitar o processo conjugativo; confere proteção ao sistema imune e resistência a certos antimicrobianos devido à natureza da matriz exopolissacarídica (DAVEY e O'TOOLE, 2000).

A formação de biofilme é importante, pois pode resultar no aparecimento de diversas infecções como endocardite, onde a população coloniza as válvulas cardíacas, prostatite crônica, além de infecções decorrentes da implantação de instrumentos médicos, como sondas, cateteres, próteses, *stent* (COSTERTON et al., 1987; MARSHALL, 1992; PRATT e KOLTER, 1999; LAPPIN-SCOTT e BASS, 2001; DUNNE Jr, 2002). Estes biomateriais adsorvem proteínas do hospedeiro, como componentes da matriz extracelular (fibronectinas, colágeno, fibrinogênio, vitronectina e imunoglobulinas) que resultam na formação de um filme condicionante, propiciando assim a formação de biofilme e o aparecimento de infecções como resultado deste processo (YU et al., 1996; BONNER et al., 1997; GALLARDO-MORENO et al., 2001).

Outra questão referente à formação de biofilme é o aparecimento de infecções recorrentes seja pela presença de amostras resistentes presentes nesta população ou pela susceptibilidade reduzida do biofilme aos antimicrobianos. Esta redução na susceptibilidade a antimicrobianos é explicada pela difusão limitada da droga para este ambiente, interação do antimicrobiano com a matriz polissacarídica,

presença de enzimas, níveis de atividade metabólica, adaptação genética, bombas de efluxo de drogas e estrutura da membrana externa (FOLEY e GILBERT, 1997; CLOETE, 2003).

A difusão limitada é resultado da natureza da matriz polissacarídica, assim como a sua viscosidade (DONLAN e COSTERTON, 2002; GILBERT et al., 2002; CLOETE, 2003). A influência de enzimas presentes no biofilme está relacionada com o processo de biotransformação, onde o antimicrobiano é inativado quimicamente, além da influência na difusão do mesmo pela matriz (GILBERT et al., 2002; CLOETE, 2003). Um outro fator que interfere na resistência a antimicrobianos é o reduzido nível metabólico em que as células se encontram devido à disponibilidade de nutrientes no meio, onde a exposição a concentrações subinibitórias da droga pode selecionar aqueles microrganismos mais resistentes, levando tanto a uma adaptação fenotípica quanto genotípica dos mesmos, entre elas a expressão de bombas de efluxo e um aumento na produção de EPS, que leva a uma alteração na susceptibilidade ao antimicrobiano (GILBERT et al., 2002; CLOETE, 2003).

Conforme mencionamos anteriormente, a maioria das infecções enterocócica envolve a participação da espécie *E. faecalis* como agente etiológico de processos infecciosos oriundos tanto da comunidade quanto do ambiente hospitalar. O enfoque central desta dissertação é analisar uma coleção de amostras clínicas de *E. faecalis* isoladas de diferentes materiais clínicos quanto à capacidade de formarem biofilme em superfícies abióticas e uma possível correlação entre a presença de determinantes de virulência e o processo de formação de biofilme.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a formação de biofilme em amostras de *Enterococcus faecalis* isoladas de pacientes atendidos no ambulatório e internados no Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná (H.U.R.N.P.) e avaliar uma possível correlação entre a presença de prováveis determinantes de virulência identificados por reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) e a formação de biofilme.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar a curva de crescimento em um grupo representativo de amostras clínicas de *E. faecalis*.
- b) Avaliar a formação de biofilme em amostras clínicas de *E. faecalis* na presença de poliestireno e vidro, através de ensaios qualitativos e quantitativos.
- c) Determinar a produção de biofilme nas diferentes fases da curva de crescimento.
- d) Avaliar a influência de cátions divalentes na formação de biofilme em amostras clínicas de *E. faecalis*.
- e) Determinar o grau de hidrofobicidade das amostras clínicas de *E. faecalis*.
- f) Averiguar a produção de N-acilhomoserina lactona (AHL), molécula sinalizadora envolvida no processo de *quorum sensing*, em amostras clínicas de *E. faecalis*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS BACTERIANAS

Neste estudo, 95 amostras de *Enterococcus faecalis* foram isoladas de diferentes materiais clínicos como urina (Tabela 1), swab retal (Tabela 2) e exsudatos purulentos (Tabela 3) oriundas de pacientes do Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná (H.U.R.N.P.). As amostras clínicas foram isoladas e identificadas no período de 1999 a 2000 pelo Laboratório de Microbiologia do H.U.R.N.P., através de provas bioquímicas tais como fermentação de carboidratos, motilidade, ausência de produção de catalase, presença das enzimas pirrilidonilarilamidase (PYR) e leucina-aminopeptidase (LAP) que hidrolisam os respectivos substratos, L-pirrilidonil- β -naftilamida e leucina- β -naftilamida, bem como pela morfologia da colônia bacteriana e coloração de Gram (FACKLAM e COLLINS, 1989).

As amostras de *E. faecalis* foram estocadas em agar BHI semi-sólido e mantidas a temperatura ambiente. Além disso, as amostras clínicas foram estocadas em caldo BHI suplementado com glicerol a 15% e armazenadas no freezer.

Amostras de *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pCF218) (pCF372) e *A. tumefaciens* KYC6 (pCF218), ambas gentilmente cedidas por Clay Fuqua do Departamento de Biologia da Universidade de Indiana, foram utilizadas nos ensaios de detecção de produção de N-acetilhomoserina lactona (AHL) em amostras de *E. faecalis*. A amostra *A. tumefaciens* NTL4 (pCF218) (pCF372) é sensível à ação de AHL e resistente aos agentes antimicrobianos tetraciclina e espectomicina (4,5 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). A amostra *A. tumefaciens* KYC6 (pCF218) é altamente produtora de indutor e resistente a tetraciclina e canamicina (4,5 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente).

Tabela 1 - Descrição das amostras de *Enterococcus faecalis* isoladas de pacientes com infecção urinária atendidos no Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná (HURNP)

Amostra clínica (Nº)	Data de isolamento
200	31/07/99
202	02/08/99
205	04/08/99
207	04/08/99
208	05/08/99
211	06/08/99
213	06/08/99
221	20/08/99
222	25/08/99
230	01/09/99
232	01/09/99
236	06/09/99
254	10/09/99
270	21/09/99
271	21/09/99
272	23/09/99
279	28/09/99
280	29/09/99
297	15/10/99
316	06/12/99
317	12/11/99
318	26/11/99
319	02/12/99
320	06/12/99

Tabela 1 - Descrição das amostras de *Enterococcus faecalis* isoladas de pacientes com infecção urinária atendidos no Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná (HURNP) (Continuação)

Amostra clínica (Nº)	Data de isolamento
321	03/12/99
327	02/08/99
328	02/08/99
329	20/09/99
332	19/10/99
335	25/10/99
360	24/01/00
361	24/01/00
372	15/02/00
375	15/02/00
376	17/01/00
382	28/01/00
385	01/02/00
387	03/02/00
390	10/02/00
392	11/02/00
394	14/02/00
395	14/02/00
397	16/02/00
398	18/02/00
399	18/02/00
400	18/02/00
401	21/02/00
404	22/02/00
406	28/02/00
407	28/02/00

Tabela 2 – Descrição das amostras de *E. faecalis* isoladas de swab retal de pacientes atendidos no Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná (HURNP)

Amostra clínica (N°)	Data de isolamento
210	09/08/99
214	16/08/99
218	16/08/99
249	09/09/99
278	27/09/99
282	30/09/99
288	07/10/99
292	11/10/99
305	20/10/99
309	03/12/99
312	29/11/99
313	29/11/99
315	29/11/99
356	18/01/00
364	26/01/00
367	28/01/00
377	18/01/00
378	18/01/00
396	16/02/00

Tabela 3 – Descrição das amostras de *E. faecalis* isoladas de exsudato purulento de pacientes atendidos no Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná (HURNP)

Amostra clínica	Data de isolamento
(Nº)	
153	05/07/99
206	04/08/99
219	17/10/99
255	13/10/99
286	05/10/99
299	16/10/99
310	06/10/99
322	17/11/99
330	11/10/99
343	04/11/99
350	10/01/00
357	18/01/00
362	26/01/00
365	26/01/00
370	02/02/00
379	18/01/00
380	26/01/00
391	10/02/00
393	14/02/00
403	24/02/00
417	21/02/00
423	14/03/00
432	28/03/00
434	11/05/00
439	01/06/00
447	17/07/00

3.2 MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

3.2.1 Meios de cultura

3.2.1.1 Caldo Infusão de cérebro e coração (BHI)

Este meio de cultura foi preparado de acordo com as especificações do fabricante (BioBrás S.A.). Após a dissolução do meio, o pH foi ajustado para 7,4 com uma solução de NaOH a 1 M e o volume final completado com água destilada. Uma alíquota de 5-10 mL de caldo foi distribuída em tubos de ensaio e esterilizados sob calor úmido através de autoclave a 121°C durante 15 min. O meio de cultura foi mantido a 4°C até o momento do uso.

3.2.1.2 Caldo Infusão de cérebro e coração (caldo BHI) suplementado com glicose a 1%

Caldo BHI (BioBrás S.A.)	37g
Glicose (Vetec, Rio de Janeiro, RJ)	10 g
Água destilada q.s.p.	1L

Após a mistura dos componentes do meio, o pH foi ajustado para 7,4 com uma solução de NaOH a 1 M e o volume final completado com água destilada. O meio de cultura foi esterilizado sob calor úmido através de autoclave a 121°C durante 15 min. O meio de cultura foi mantido a 4°C até o momento do uso.

3.2.1.3 Ágar Infusão de cérebro e coração (ágar BHI)

O meio foi preparado de acordo com as especificações do fabricante (Biolife). Após a dissolução do meio de cultura, o pH foi ajustado para 7,4 com uma solução de NaOH a 1 M e o volume final completado com água destilada. Em

seguida, o meio foi esterilizado sob calor úmido através de autoclave a 121°C durante 15 min e 20 mL do meio vertidos em placas de Petri. O meio de cultura foi mantido a 4°C até o momento do uso.

3.2.1.4 Caldo Luria-Bertani (LB)

Triptona (Biobrás, MG)	10 g
Extrato de levedura (Biolife, Itália)	5 g
Cloreto de sódio (Vetec, Rio de Janeiro)	5 g
Água destilada q.s.p.	1 L

Os componentes do meio de cultura foram misturados, dissolvidos e fundidos e, em seguida, o meio de cultura foi submetido à esterilização através de autoclave a 121°C durante 15 min. O meio de cultura foi mantido a 4°C até o momento do uso.

3.2.1.5 Ágar Luria Bertani (LB)

A formulação é a mesma descrita no item 3.2.1.4, porém adiciona-se ao meio original 15 g de ágar bacteriológico (Vetec, Rio de Janeiro) para um volume final de 1 L de água destilada. Após a dissolução dos constituintes, o meio de cultura foi esterilizado sob calor úmido através de autoclave a 121°C durante 15 min. O meio de cultura foi mantido a 4°C até o momento do uso.

3.2.1.6 Meio AT 1X

Solução-tampão AT 20 X (item 3.2.2.3.1)	50 mL
Solução de sais AT 20 X (item 3.2.2.3.2)	50 mL
Glicose (Vetec, Rio de Janeiro)	0,5%
Água destilada q.s.p.	1 L

As soluções-tampão AT 20 X e de sais AT 20 X foram preparadas e esterilizadas, separadamente, a 121°C por 15 min. A solução de glicose foi

preparada separadamente e esterilizada na mesma condição citada anteriormente. Ao término do processo de esterilização, as soluções foram diluídas para concentração 1 X para serem utilizadas no momento oportuno.

3.2.2 Soluções

3.2.2.1 Soluções utilizadas nos ensaios de formação de biofilme

3.2.2.1.1 Solução de Cloreto de Sódio a 0,85% (Solução salina)

NaCl (Vetec, Rio de Janeiro, RJ)	8,5 g
Água destilada q.s.p.	1L

O sal foi completamente dissolvido em água destilada e, em seguida, a solução foi esterilizada sob calor úmido e pressão através de autoclave a 121°C durante 15 min.

3.2.2.1.2 Soluções de Safranina a 0,1%

Safranina (Vetec, Rio de Janeiro, RJ)	0,1 g
Água bidestilada q.s.p.	100 mL

O corante foi completamente dissolvido em água bidestilada.

3.2.2.1.3 Solução de Cristal Violeta de Hucker

Solução A:

Cristal Violeta (Vetec, Rio de Janeiro, RJ)	2 g
Etanol 95% (Merck, Darmstadt, Germany)	20 mL

Solução B:

Oxalato de amônio (Vetec, Rio de Janeiro, RJ)	0,8 g
Água destilada q.s.p.	80 mL

As soluções A e B foram preparadas separadamente e, em seguida, filtradas em papel de filtro. Estas soluções foram mantidas em temperatura ambiente até o momento do uso.

3.2.2.1.4 Solução de Triton X-100 a 0,1%

Triton X-100 (Vetec, Rio de Janeiro, RJ)	0,1 mL
Água bidestilada q.s.p.	100 mL

Esta solução foi preparada misturando-se o Triton X-100 em água bidestilada. A solução foi mantida em temperatura ambiente até o momento do uso.

3.2.2.1.5 Solução de Cloreto de Cálcio a 10 mM

CaCl ₂ anidro (Vetec, Rio de Janeiro, RJ)	0,56 g
Água destilada q.s.p.	500 mL

O composto foi completamente dissolvido em água destilada e, em seguida, a solução foi esterilizada sob calor úmido e pressão através de autoclave a 121°C durante 15 min.

3.2.2.1.6 Solução de Cloreto de Zinco a 10 mM

ZnCl ₂ anidro (Vetec, Rio de Janeiro, RJ)	0,68 g
--	--------

Água destilada q.s.p.	500 mL
-----------------------	--------

O composto foi completamente dissolvido em água destilada e, em seguida, a solução foi esterilizada sob calor úmido e pressão através de autoclave a 121°C durante 15 min.

3.2.2.1.7 Solução de Cloreto de Magnésio a 10 mM

MgCl ₂ .6H ₂ O (Vetec, Rio de Janeiro, RJ)	0,48 g
Água destilada q.s.p.	500 mL

O composto foi completamente dissolvido em água destilada e, em seguida, a solução foi esterilizada sob calor úmido e pressão através de autoclave a 121°C durante 15 min.

3.2.2.1.8 Solução de Cloreto Férrico a 10 mM

FeCl ₃ anidro (Vetec, Rio de Janeiro, RJ)	1,35 g
Água destilada q.s.p.	500 mL

O composto foi completamente dissolvido em água destilada e, em seguida, a solução foi esterilizada nas condições citadas no item 3.2.2.1.7.

3.2.2.1.9 Solução de Cloreto de Cobre II a 10 mM

CuCl ₂ .2H ₂ O (Vetec, Rio de Janeiro, RJ)	0,85 g
Água destilada q.s.p.	500 mL

O composto foi completamente dissolvido em água destilada e a solução foi esterilizada nas condições citadas no item 3.2.2.1.7.

3.2.2.2 Soluções usadas nos ensaios de hidrofobicidade (SAT – “Salt Aggregation Test”)

3.2.2.2.1 Solução-tampão Fosfato de Sódio a 1 M (pH 6,8)

Na ₂ HPO ₄ (Synth, Labsynth, Diadema, SP)	71 g
Água bidestilada q.s.p.	500 mL

O componente foi dissolvido em água bidestilada e o pH ajustado com uma solução-tampão de Fosfato Monobásico de Sódio (NaH₂PO₄) a 1 M (pH 4,7). A solução foi esterilizada sob calor úmido e pressão através de autoclave a 121°C durante 15 min. No momento do uso, a solução estoque foi diluída para a concentração de 0,002 M.

3.2.2.2.2 Solução de Sulfato de Amônio a 10 M

(NH ₄) ₂ SO ₄ (Vetec, Rio de Janeiro, RJ)	660,7 g
Solução-tampão Fosfato de Sódio a 0,002 M (pH 6,8) q.s.p.	500 mL

O componente foi dissolvido a quente em solução-tampão descrita no item 3.2.2.2.1 e a solução esterilizada sob calor úmido e pressão através de autoclave a 121°C durante 15 min. Na preparação de diferentes concentrações desta solução, a solução estoque foi diluída em solução-tampão de Fosfato de Sódio a 0,002 M.

3.2.2.3 Soluções para o ensaio de detecção da produção de N-acilhomoserina lactona (AHL)

3.2.2.3.1 Solução-tampão AT 20 X (pH 7,0)

KH ₂ PO ₄ (Vetec, Rio de Janeiro)	214 g/L
NaOH (Vetec, Rio de Janeiro)	35 g
Água destilada q.s.p.	1 L

Os componentes foram dissolvidos, o pH da solução ajustado para 7,0 e, em seguida, o volume final completado com água destilada. A solução foi esterilizada sob calor úmido e pressão através de autoclave a 121°C durante 15 min.

3.2.2.3.2 Solução de Sais AT 20 X

(NH ₄) ₂ SO ₄ (Vetec, Rio de Janeiro)	40 g
MgSO ₄ .7H ₂ O (Vetec, Rio de Janeiro)	3,2 g
CaCl ₂ .2H ₂ O (Vetec, Rio de Janeiro)	0,2 g
FeSO ₄ .7H ₂ O (Vetec, Rio de Janeiro)	0,1 g
MnSO ₄ .H ₂ O (Vetec, Rio de Janeiro)	0,024 g
Água destilada q.s.p.	1 L

Os componentes foram dissolvidos e o volume final completado com água destilada. A solução foi esterilizada sob calor úmido e pressão através de autoclave a 121°C durante 15 min.

3.2.2.4 Soluções e reagentes para a identificação genotípica de determinantes de virulência através de PCR

3.2.2.4.1 Solução-tampão Tris-HCl a 1,5 M (pH 8,4)

A solução foi preparada dissolvendo-se 18,7 g de Tris (UBS, Cleveland, Ohio) em 80 mL de água bidestilada e, em seguida, o pH ajustado para 8,4 com uma solução de HCl a 1 M. Após completar o volume com 100 mL de água bidestilada, a solução foi esterilizada sob calor úmido e pressão através de autoclave a 121°C durante 15 min e armazenada a temperatura ambiente.

3.2.2.4.2 Solução-tampão para PCR 10 X

Tris-HCl (pH 8,4)	200 mM
KCl (Vetec, Rio de Janeiro, RJ)	500 mM
Água deionizada q.s.p.	1000mL

Após a homogeneização, a solução foi esterilizada sob calor úmido e pressão através de autoclave a 121°C durante 15 min e, em seguida, armazenada a 4°C. A solução foi diluída para 1X no momento do uso.

3.2.2.4.3 Solução-tampão de dissolução de desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs)

Tris (UBS, Cleveland, Ohio)	5 mM
Na ₂ EDTA.2H ₂ O (UBS, Cleveland, Ohio)	1mM
2-mercaptoetanol a 0,2 M (Sigma)	2 mM
Etanol absoluto (Vetec, Rio de Janeiro, RJ)	0,5 mL
Água deionizada q.s.p.	1 mL

O componente Na₂EDTA.2H₂O foi dissolvido em água deionizada, a quente, em 50% do volume total a ser preparado. Em seguida, o pH foi ajustado para 7,5 com uma solução de HCl a 1 M. A solução foi esterilizada sob calor úmido a 121°C durante 15 min. Após o resfriamento desta solução, o etanol absoluto e 2-mercaptoetanol foram adicionados e o volume final completado com água deionizada esterilizada. A solução permaneceu armazenada em microtubos de polipropileno (MCT-150-C, Axygen Scientific, USA) a –20°C até o momento do uso.

3.2.2.4.4 Solução-tampão de dNTPs a 10 mM

Os dNTPs foram preparados em solução-tampão de dissolução (item 3.2.2.4.3) na concentração final de 10 mM e, em seguida, armazenados a –20°C. No momento do uso, esta solução foi diluída 50 vezes em água deionizada esterilizada.

3.2.2.4.5 Oligonucleotídeos utilizados na pesquisa de determinantes de virulência

A pesquisa de genes de virulência em amostras clínicas de *E. faecalis* foi realizada através da reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) utilizando-se pares de oligonucleotídeos (Tabela 4) descritos na literatura (Eaton e Gasson, 2001), exceto os oligonucleotídeos homólogos aos genes *gelE*, *eep* e *enIA* que foram desenhados exclusivamente para este estudo com o propósito de averiguar a ocorrência destes determinantes de virulência responsáveis pelas sínteses da enzima gelatinase, proteína de membrana necessária para a expressão de feromônio e enterolisina A, respectivamente.

Tabela 4 – Seqüências de oligonucleotídeos utilizadas para pesquisa de prováveis determinantes de virulência em amostras clínicas de *E. faecalis* através da reação em cadeia da DNA polimerase (PCR)

Marcadores de virulência ^a	Amplicons (bp)	Pares de oligonucleotídeos 5' → 3'	Amostras de referência	°T _a ^b
<i>esp</i>	~933	Esp11 = 5'- TTGCTAATGCTAGTCCACGACC- 3' Esp12= 5'- GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA-3'	<i>E. faecium</i> Ec2594	62°C
<i>efaA</i>	~705	TE5= 5'- GACAGACCCTCACGAATA-3' TE6= 5'- AGTTCATCATGCTGCTGTAGTA-3'	-	52°C
<i>enIA</i>	~960	ENIEF1= 5'- TTCTTCTTATTCTGTCAACGCAGC-3' ENIER1= 5'- GACTGTGAAATACCTATTTGCAAGC-3'	-	59°C
<i>aggA</i>	~1.553	TE3=5'-AAGAAAAAGTAGACCAAC-3' TE4= 5'- AACGGCAAGACAAGTAAATA-3'	-	52°C
<i>cylB</i>	~843	TE15= 5'- ATTCCTACCTATGTTCTGTTA-3' TE16= 5'- AATAAACTCTTCTTTTCCAAC-3'	<i>E. faecalis</i> DS16	55°C

Tabela 4 – Seqüências de oligonucleotídeos utilizadas para pesquisa de prováveis determinantes de virulência em amostras clínicas de *E. faecalis* através da reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) (Continuação)

Marcadores de virulência ^a	Amplicons (bp)	Pares de oligonucleotídeos		Amostras de referência	°T _a ^b
		5' → 3'			
<i>cyIM</i>	~742	TE13= 5'- CTGATGGAAAGAAGATAGTAT-3'		<i>E. faecalis</i> DS16	56°C
		TE14= 5'- TGAGTTGGTCTGATTACATTT-3'			
<i>cyIA</i>	~517	TE17= 5'- TGGATGATAGTGATAGGAAGT-3'		<i>E. faecalis</i> DS16	57°C
		TE18= 5'- TCTACAGTAAATCTTTCGTCA-3'			
<i>eep</i>	~937	eepF1= 5'- GAGCGGGTATTTTAGTTCGT-3'		<i>E. faecalis</i> OGIX	58°C
		eepR1= 5'- TACTCCAGCATTGGATGCT-3'			
<i>gelE</i>	~1.004	gelEF1= 5'- GTACAGGCATCTTTGTTGGA-3'		<i>E. faecalis</i> OG1RF	54°C
		gelER1= 5'- GATTCATTCAAGGACCTGA-3'			

^a *cyIA*, componente do operon *cyI* responsável pela ativação da citolisina; *enIA*, codifica para enterolisina A; *efaA*, componente do operon *efa* que codifica para um transportador de membrana; *esp*, associada com proteína envolvida no processo de evasão celular; *aggA*, codifica para substância de agregação envolvida na aderência, agregação celular e conjugação; *gelE*, codifica para protease responsável pela hidrólise da gelatina e outros pequenos peptídeos biologicamente ativos, também associado a processos inflamatórios; *cyIB*, componente do operon *cyI* que codifica para transporte de citolisina; *cyIM*, componente do operon *cyI* que codifica para modificação pós-traducional da citolisina; *eep*, proteína de membrana necessária para a expressão de feromônio cAD1.

^b Temperatura de anelamento específica para cada marcador utilizada na reação em cadeia da DNA polimerase (PCR)

3.2.2.4.6 Solução de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) a 10%

Foram dissolvidos 10 g de SDS (UBS, Cleveland, Ohio) em 9 mL de água bidestilada. Após completar o volume final para 100 mL com água bidestilada, a solução foi esterilizada sob calor úmido a 121°C durante 15 min e armazenada a temperatura ambiente.

3.2.2.4.7 Solução-tampão de aplicação de amostra de DNA (6X)

Azul de bromofenol (Vetec, Rio de Janeiro, RJ)	0,1%
Na ₂ EDTA.2H ₂ O (pH 8,0) (UBS, Cleveland, Ohio)	100 mM
SDS	1,5%
Glicerol	15%
Água bidestilada q.s.p	1 mL

O componente Na₂EDTA.2H₂O foi dissolvido em água bidestilada esterilizada, a quente, em 50% do volume total a ser preparado. Em seguida, os demais componentes foram acrescentados e o volume final completado com água bidestilada esterilizada. A solução foi mantida a 4°C até o momento do uso.

3.2.2.4.8 Solução-tampão Tris-EDTA-Borato (TEB) 10 X

Tris	108 g
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	188,1 g
Ácido bórico (UBS, Cleveland, Ohio)	55g
Água deionizada q.s.p.	1000 mL

Após dissolução do ácido bórico, a quente, os demais componentes foram adicionados, dissolvidos e o volume final completado com água deionizada esterilizada. No momento do uso, a solução-tampão foi diluída em água deionizada esterilizada.

3.2.2.4.9 Gel de Agarose a 1%

Um grama de agarose desidratada (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) foi dissolvido em 100 mL de TEB 1 X até completa dissolução, fundido e utilizado na montagem do gel de agarose para ser utilizado no sistema de eletroforese.

3.2.2.4.10 Solução de Brometo de Etídio (5mg/mL)

Esta solução foi preparada em solução-tampão de Tris-HCl a 0,05 M (pH 8,5) na concentração de 5 mg/mL e, em seguida, armazenada em frasco âmbar a temperatura ambiente.

3.3 METODOLOGIA

3.3.1 Estimativa da curva de crescimento

O ensaio foi realizado segundo Neder (1992), com ligeiras modificações. Cada amostra bacteriana foi estriada em meio BHI (item 3.2.1.3) e incubada a 37°C durante 18 h. Transcorrido este período, uma colônia de cada amostra foi inoculada em 6 mL de caldo BHI (item 3.2.1.1) e incubada a 37°C durante 1 h. Em seguida, uma alíquota de 100 µL de cultura bacteriana foi transferida para cada tubo de ensaio contendo 6 mL de caldo BHI. Os ensaios foram realizados no intervalo de 2 h, sendo que os pontos considerados importantes para a determinação da curva de crescimento foram 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 e 36 h. Em cada período de tempo proposto, procedeu-se a contagem de células bacterianas no espectrofotômetro através da leitura do comprimento de onda a 600 nm e pelo método de diluição seriada em placa. No ensaio de diluição, as suspensões bacterianas foram diluídas em solução salina a 0,85% (item 3.2.2.1.1), plaqueadas e

incubadas a 37°C durante 16 h. As células bacterianas viáveis foram expressas como unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL). Estes experimentos foram realizados em duplicata.

3.3.2 Detecção da formação de biofilme

3.3.2.1 Ensaio qualitativo em lamínulas de vidro

O ensaio qualitativo para formação de biofilme foi realizado conforme a metodologia descrita por Christensen et al. (1982), com ligeiras modificações. Cada amostra bacteriana foi estriada em ágar BHI (item 3.2.1.3) e incubada a 37°C durante 24 h. Transcorrido este período, uma colônia de cada amostra foi transferida para um caldo BHI suplementado e não suplementado com glicose a 1% (itens 3.2.1.2 e 3.2.1.1, respectivamente), acrescidos de lamínulas de vidro arredondadas de 13 mm de diâmetro (Glasstécnica, Brasil). Os tubos de ensaio foram incubados a 37°C durante 15 h. Em seguida, o conteúdo de cada tubo foi cuidadosamente removido e lavado com água destilada esterilizada, eliminando as bactérias que não aderiram ao vidro. Os tubos foram incubados a 60°C por 1 h para que as bactérias aderidas se fixem à superfície da lamínula. Transcorrida este período, as lamínulas foram coradas com uma solução de safranina a 0,1% (item 3.2.2.1.2) e lavadas com água destilada esterilizada. As lamínulas coradas foram mantidas a temperatura ambiente até completa secagem das mesmas, em seguida, analisadas em microscópio óptico. O grau de aderência ao suporte sólido foi estimado de acordo com a formação de um tapete microbiano na lamínula de vidro em ausente (0%), 20% de cobertura (+), 40% (2+), 60% (3+), 80% (4+) e 100% (5+). Tubos de ensaio contendo somente meio de cultura foram incluídos como controle negativo. Os ensaios foram realizados em duplicata.

3.3.2.2 Ensaios quantitativos

3.3.2.2.1 Ensaio em lamínulas de vidro

A quantificação da camada de biofilme em superfície de vidro foi realizada através do método de diluição seriada (PFALLER et al., 1988). As amostras bacterianas foram estriadas em ágar BHI (item 3.2.1.3) e os meios de cultura incubados a 37°C durante 24 h. Transcorrido este período, uma colônia bacteriana de cada amostra foi inoculada em 5 mL de caldo BHI suplementado com glicose a 1% (item 3.2.1.2) e, em seguida, os meios de cultura incubados a 37°C durante 1 h. Neste instante, o número de células bacterianas foi determinado através de espectrofotometria em comprimento de onda a 600 nm com o objetivo de determinar o inóculo inicial em cada experimento (DO_{600} igual a 0,02). Em seguida, 100 μ L de cada cultivo bacteriano foram transferidos para tubos de ensaios com 3 mL de caldo BHI acrescido de glicose a 1% contendo lamínulas de vidro arredondadas (13 mm de diâmetro) e incubados a 37°C durante 15 h. Posteriormente, o conteúdo de cada tubo foi retirado e a lamínula de vidro transferida para um outro tubo de ensaio contendo 1 mL de uma solução de Triton X-100 a 0,1% (item 3.2.2.1.4) para liberação de células bacterianas que aderiram ao suporte sólido. A suspensão microbiana foi diluída em solução salina a 0,85% (item 3.2.2.1.1) e plaqueada em ágar BHI com o propósito de averiguar o número de células bacterianas por mililitro existente na área da lamínula. Tubos de ensaio contendo somente meio de cultura foram incluídos como controle negativo. Os ensaios foram realizados em duplicata.

3.3.2.2.2 Ensaio em placas de poliestireno

A quantificação da camada de biofilme em superfície de poliestireno foi realizada conforme ensaio em microplacas de poliestireno em fundo em U conduzido por Stepanovic et al. (2000), com ligeiras modificações. As amostras bacterianas foram estriadas em ágar BHI (item 3.2.1.3) e os meios incubados a 37°C por 24 h. Após este período, uma colônia de cada amostra foi transferida para 5 mL de caldo BHI suplementado com glicose a 1% (item 3.2.1.2) e o meio incubado a

37°C por 1 h. Transcorrido este período, o número de células bacterianas foi determinado através de espectrofotometria em comprimento de onda a 600 nm com o objetivo de determinar o inóculo inicial em cada experimento (DO_{600} igual a 0,02). Em seguida, 50 μ L deste cultivo foram transferidos para cada poço da placa de poliestireno contendo 150 μ L de caldo BHI suplementado com glicose a 1% e esta incubada a 37°C durante 15 h. Transcorrido o período de incubação, o conteúdo dos poços foram cuidadosamente aspirados e lavados com solução salina esterilizada (item 3.2.2.1.1). Posteriormente, as placas foram incubadas a 37°C durante por 1 h e 30 min para permitir a fixação celular e, em seguida, coradas com cristal violeta de Hucker (item 3.2.2.1.3) por 5 min. O excesso de corante foi retirado e os poços novamente lavados com solução salina esterilizada. Decorrido este processo, as placas foram submetidas à secagem a 37°C durante 30 min. A formação de biofilme foi determinada através da leitura da densidade óptica a 550 nm em um aparelho de ELISA (Multiskan EX, LabSystem, USA). As amostras foram classificadas de acordo com o cut-off (DO_C) que foi definido em função da média de três experimentos considerados como controle negativo que incluíam poços acrescidos somente do meio de cultura. Os ensaios foram realizados em duplicata.

Os critérios utilizados para classificar as amostras clínicas de *E. faecalis* quanto à capacidade e a intensidade de formarem biofilme em superfície de poliestireno foram os descritos por Stepanovic et al. (2000) como segue:

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

$DO_C < DO_A \leq 2DO_C$ – Fracamente formadora de biofilme (FRF)

$2DO_C < DO_A < 4DO_C$ – Moderadamente formadora de biofilme (MF)

$DO_A \geq 4DO_C$ – Fortemente formadora de biofilme (FF)

Paralelamente, a quantificação foi expressa em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL), onde o ensaio foi realizado na mesma maneira como descrito acima, porém a solução de Hucker foi substituída pela solução de Triton X-100 a 0,1% (item 3.2.2.1.4). O conteúdo de cada poço da placa de poliestireno foi ressuspensionado nesta solução e, em seguida, as diluições seriadas foram plaqueadas em ágar BHI e incubadas a 37°C durante 24 h para averiguar o número de células aderidas à superfície de poliestireno.

3.3.2.3 Determinação da produção de biofilme nas diferentes fases da curva de crescimento

Para avaliar a formação de biofilme em poliestireno nas diferentes fases da curva de crescimento, as amostras bacterianas foram estriadas em ágar BHI (item 3.2.1.3) e os meios incubados a 37°C por 24 h. Após este período, uma colônia de cada amostra foi transferida para 5 mL de caldo BHI suplementado com glicose a 1% (item 3.2.1.2) e o meio incubado a 37°C por 1 h. Transcorrido este período, o número de células bacterianas foi determinado através de espectrofotometria utilizando-se comprimento de onda a 600 nm com o objetivo de determinar o inóculo inicial a ser usado em cada experimento (DO_{600} igual a 0,02). Em seguida, 50 μ L deste cultivo foram transferidos para cada poço da placa de poliestireno contendo 150 μ L de caldo BHI suplementado com glicose a 1% e incubada a 37°C durante os tempos de 6, 10, 15, 24, 36 e 48 h. Transcorrido o período de incubação, o conteúdo dos poços foram cuidadosamente aspirados e lavados com solução salina esterilizada (item 3.2.2.1.1). Posteriormente, as placas foram incubadas a 37°C durante 1 h e 30 min para permitir a fixação celular e, em seguida, coradas com cristal violeta de Hucker (item 3.2.2.1.3) por 5 min. O excesso de corante foi retirado e os poços novamente lavados com solução salina esterilizada. As placas de poliestireno foram submetidas à secagem a 37°C durante 30 min e a quantificação da camada de biofilme foi determinada através da leitura da densidade óptica a 550 nm em um aparelho de ELISA (Multiskan EX, Labsystem, USA).

Para avaliar a influência das diferentes fases da curva na formação de biofilme em vidro, o procedimento foi semelhante ao descrito anteriormente com algumas modificações. As amostras bacterianas foram estriadas em ágar BHI (item 3.2.1.3) e os meios de cultura incubados a 37°C durante 24 h. Transcorrido este período, uma colônia bacteriana de cada amostra foi inoculada em 5 mL de caldo BHI suplementado com glicose a 1% (item 3.2.1.2) e, em seguida, os meios de cultura, incubados a 37°C durante 1 h para determinação do inóculo inicial (OD_{600} igual a 0,02). Em seguida, 100 μ L de cada cultivo bacteriano foram transferidos para tubos de ensaios com 3 mL de caldo BHI acrescido de glicose a 1% contendo lamínulas de vidro arredondadas (13 mm de diâmetro) e incubados a 37°C durante

os tempos de 6, 10, 15, 24, 36 e 48 h. Transcorrido o tempo de incubação, o conteúdo de cada tubo foi retirado e adicionou-se 1mL de safranina (item 3.2.2.1.2) por 5 min. O excesso de corante foi retirado, através de lavagens com salina, e então foi acrescentado 200 μ L da solução de Triton X-100 a 0,1% (item 3.2.2.1.4). As células aderidas à lamínula foram ressuspensas nessa solução e o conteúdo do tubo foi adicionado nos poços das microplacas de poliestireno, onde o resultado da quantificação da camada de biofilme foi também expresso em função da leitura da densidade óptica a 550nm em um leitor de ELISA (Multiskan EX, Labsystem, USA). Tubos de ensaio contendo somente meio de cultura foram incluídos como controles negativos. Os ensaios foram realizados em duplicata.

3.3.3 Influência de cátions divalentes na formação de biofilme em diferentes superfícies abióticas

O ensaio foi realizado segundo as metodologias descritas no item 3.3.2.2., dependendo do material a ser utilizado. A influência de cátions divalentes na formação de biofilme em superfícies inertes (poliestireno e vidro) foi averiguada em um grupo representativo de amostras de *E. faecalis* produtoras de biofilme nos materiais investigados. O ensaio foi equivalente ao quantitativo para poliestireno e vidro, exceto que no meio de cultura foi adicionado diferentes sais, como cloretos de magnésio, cálcio, zinco, ferro e cobre na concentração final de 5 mM (itens 3.2.2.1.7, 3.2.2.1.5, 3.2.2.1.6, 3.2.2.1.8 e 3.2.2.1.9, respectivamente). Em função dos resultados obtidos na presença dos diferentes cátions divalentes, os íons ferro e cobre foram escolhidos em virtude de interferirem drasticamente na formação de biofilme. Portanto, experimentos com diferentes concentrações de sais de ferro e cobre (0,01; 0,05; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 mM) foram testadas para ambos materiais segundo as metodologias descritas nos itens 3.3.2.2.1 e 3.3.2.2.2. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

3.3.4 Ensaio de hidrofobicidade (SAT – “Salt Aggregation Test”)

Este ensaio foi realizado segundo a metodologia descrita por Ljungh & Wadström (1995), com ligeiras modificações. Cada amostra clínica foi estriada em

ágar BHI (item 3.2.1.3) e o meio de cultura incubado a 37°C durante 24 h. Transcorrido este período, uma colônia bacteriana de cada amostra foi inoculada em 1 mL de caldo BHI (item 3.2.1.1) e o meio de cultura incubado a 37°C durante 1 h. Em seguida, 500 µL do cultivo foram inoculados em 4,5 mL de caldo BHI e o meio incubado a 37°C durante 15 h. Após este período, a suspensão foi centrifugada a 10.000 rpm (MR1822, Jouan, France) por 10 min e o sedimento foi ressuspenso em 5 mL de solução-tampão de fosfato de sódio a 0,002 M (item 3.2.2.2.1). O número de células foi determinado através de espectrofotometria ($DO_{600} = 1,0$). Diferentes concentrações de sulfato de amônio (0; 0,05; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 e 4 M) foram preparadas a partir da solução descrita no item 3.2.2.2 e adicionadas (50 µL de cada concentração) nos poços de microplacas de poliestireno em fundo em U contendo 50 µL da suspensão microbiana. As placas foram mantidas a temperatura ambiente durante 12 h para observação da agregação celular. O ensaio foi realizado na mesma condição descrita acima para o tempo de cultivo correspondente a 8 h (fase exponencial). Uma solução tampão de fosfato de sódio foi adicionada em cada poço da microplaca como controle negativo do experimento. As amostras bacterianas que produziram agregação a uma concentração inferior a 2 M de sulfato de amônio foram consideradas hidrofóbicas. Os ensaios foram realizados em duplicata.

3.3.5 Ensaio para detecção de N-acetilhomoserina lactona (AHL)

O ensaio foi realizado segundo a metodologia descrita por Gram et al. (2002), com ligeiras modificações. As amostras de *E. faecalis* foram estriadas em placas de BHI (item 3.2.1.3) e os meios incubados a 37°C durante 24 h. As amostras de *A. tumefaciens* NTL4 e KYC6 foram inoculadas no caldo AT suplementado com os respectivos agentes antimicrobianos (item 3.2.1.6) e incubados a 28°C durante 48 h. Transcorrido o período de 24 h, uma colônia bacteriana de cada amostra de *E. faecalis* foi inoculada em 1 mL de caldo LB (item 3.2.1.4) e o meio incubado a 37°C por 1 h. O número de células foi determinado através de espectrofotometria (DO_{600} igual a 0,02) com o objetivo de assegurar o mesmo inóculo inicial para todas as amostras. Após este período, 100 µL de cada amostra foi subcultivada em 3 mL de caldo LB (item 3.2.1.4) e o meio incubado a 37°C durante 15 h. Em seguida, as

amostras de *E. faecalis* e *A. tumefaciens* KYC6 (pCF218) foram centrifugadas a 12.000 rpm por 5 min. O sedimento foi recuperado e ressuspensão no meio de cultura específico para cada amostra. Uma alíquota de 10 µL de cada amostra foi inoculada na superfície de um disco de papel filtro esterilizado e colocado na superfície do ágar LB (item 3.2.1.5) semeado com a amostra de *A. tumefaciens* NTL4 (pCF218) (pCF372) e suplementado com X-gal a 50 µg/mL. Todas as placas foram incubadas a 28°C durante 48 h. Discos de papel de filtro crescidos somente de meio de cultura foram utilizados como controles negativos. Os ensaios foram realizados em duplicata.

3.3.6 Detecção de genes de virulência em amostras clínicas de *E. faecalis*

3.3.6.1 Extração de DNA total

A extração de DNA foi realizada conforme a metodologia descrita por Yost e Nattress (2000), com ligeiras modificações. As amostras foram cultivadas em 3 mL de caldo BHI (item 3.2.1.1) a 37°C por 18 h. Transcorrido este período, uma alíquota de 1,5 mL do cultivo foi transferida para microtubos de polipropileno (MCT-150-C, Axygen Scientific, USA), os quais foram centrifugados a 12.000 rpm durante 10 min a 4°C (MR1822, Jouan, France). Após esse procedimento, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensão com o restante do cultivo e centrifugado nas condições descritas acima. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensão em 1 mL de água deionizada esterilizada e a preparação, centrifugada a 12.000 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi cuidadosamente removido e o sedimento ressuspensão em 100 µL de água deionizada esterilizada. Em seguida, a suspensão celular foi submetida a um banho-maria a 100°C por 30 min e resfriada em um banho de gelo por 3 min. Depois deste período, a preparação foi centrifugada a 12.000 rpm por 25 min a 4°C e 50 µL do sobrenadante foram transferidos para outro microtubo de polipropileno novo e esterilizado. A preparação de DNA total foi mantida a -20°C até o momento do uso.

3.3.6.2 Reação em cadeia da DNA polimerase (PCR)

A reação de amplificação foi preparada no volume final de 25 μL e, em cada microtubo de polipropileno de 0,2 mL (Axygen Scientific, USA), foi adicionado 2,5 μL de uma solução-tampão para PCR 10 X (item 3.2.2.4.2), 1,25 μL de solução de MgCl_2 a 50 mM (Gibco), 2,5 μL de solução de dNTPs a 10 X (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (item 3.2.2.4.4), 1,0 μL do par de oligonucleotídeos a 100 pmoles (0,5 μL de cada) (item 3.2.2.4.5), 0,025 μL de Taq DNA polimerase 500 U (Biosystem, Brasil). A preparação foi homogeneizada e, em seguida, uma alíquota de 10 μL de DNA total foi adicionada e o volume completado com água deionizada esterilizada.

Os microtubos de polipropileno contendo as preparações foram colocados em um termociclador (PCR Sprint, ThermoHybaid, UK) e submetidos às condições de amplificação: 1 ciclo de 94°C por 5 min seguidos de 30 ciclos de 94°C por 45 segundos, T_a (Tabela 4) por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e, finalmente, 1 ciclo de 72° por 3 min.

3.3.6.3 Eletroforese em gel de agarose do produto amplificado

Após as reações de amplificação, os produtos gerados pela reação da PCR foram misturados com 2,0 μL de solução-tampão de amostra de DNA (6X) (item 3.2.2.4.7) e submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% (item 3.2.2.4.9). Os parâmetros empregados nas corridas eletroforéticas foram de 80V e 40 mA, em tampão TEB 0,5X (item 3.2.2.4.8), durante o período de 1 h. Ao término de cada corrida eletroforética, o gel de agarose foi corado em brometo de etídio a 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (item 3.2.2.4.10) durante 15 min. Em seguida, o gel foi lavado e colocado sobre a superfície de um transiluminador de luz ultravioleta (Hoefer UV-25, Pharmacia Biotech, San Francisco, USA) para ser analisado e/ou fotografado em filme branco e preto.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises em relação ao ensaio quantitativo para formação de biofilme em ambas as superfícies foram realizadas através do teste de qui-quadrado (χ^2) e teste exato de Fisher, onde se investigou a associação entre a classificação das amostras de acordo com camada de biofilme formada e as origens das mesmas. Quanto aos valores de UFC/mL/cm² e de DO₅₅₀ (somente para poliestireno) obtidos no experimento de quantificação, foi realizado a análise de variância com nível de significância de 5%, sendo que o valor do coeficiente de variação, no caso dos valores de UFC/mL/cm², corresponde ao logaritmo decimal destes valores para que as pressuposições da análise pudessem ser atendidas. Para investigar uma possível associação entre as origens das amostras, o material utilizado no ensaio e a classificação das mesmas em relação à camada de biofilme formada em ambos os materiais foram realizados o teste de Cochran-Mantel-Haenszel. O teste de qui-quadrado (χ^2) foi necessário para avaliar uma associação somente entre o substrato e a classificação das amostras em função da camada de biofilme formada. Quanto aos dados de hidrofobicidade da superfície microbiana foi aplicado uma análise de *deviance* (modelo reduzido) buscando uma possível correlação entre tempo, origens das amostras e hidrofobicidade. No ensaio da influência de cátions divalentes na formação de biofilme em ambas as superfícies foi realizado o teste de Dunnett ao nível de significância de 5%.

Na análise dos resultados da reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) foram utilizados o teste de qui-quadrado (χ^2) e o teste de exato de Fisher para averiguar uma associação entre os determinantes analisados e as origens das amostras. Para os resultados deste mesmo experimento, o teste χ^2 utilizando proporções foi utilizado para investigar a associação entre os determinantes analisados e a classificação das amostras em função da formação da camada de biofilme em ambos os materiais.

4 RESULTADOS

4.1 ESTIMATIVA DA CURVA DE CRESCIMENTO

As curvas de crescimento de um grupo representativo de amostras clínicas de *E. faecalis* estão representadas na Figura 1. O crescimento das amostras deu-se ao longo de 36 h, sendo que os intervalos de tempo considerados para a determinação da curva foram de 0, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 20, 24 e 36 h.

No intervalo de 4 a 12 h, observou-se um crescimento exponencial das amostras clínicas, onde o valor de $\log_{100} \times \text{DO}_{600}$ em 12 h (2,2) equivale a aproximadamente 4 vezes o valor de $\log_{100} \times \text{DO}_{600}$ em 4 h (0,6). Neste intervalo de tempo, foi estimado o tempo de duplicação através da fórmula:

$$t_d = \frac{tx \log 2}{\log N - \log N_0},$$

onde t_d é o tempo de duplicação (min); t é o tempo de análise; N é o número de células no tempo t ; N_0 é o número de células iniciais. O tempo de duplicação (t_d) estimado foi equivalente a 36 min.

Entre 12 e 24 h, os valores de $\log_{100} \times \text{DO}_{600}$ permaneceram praticamente inalterados, indicando o período da fase estacionária, entretanto, em 36 h, observou-se uma redução de aproximadamente 0,9 nos valores de $\log_{100} \times \text{DO}_{600}$ (2,0) quando comparados aos valores em 24 h (2,2).

As quatro fases de uma curva de crescimento apresentaram-se da seguinte forma: a fase lag correspondente ao período de 0 a 4 h; a fase log ou exponencial equivalente ao período de 4 a 12 h; enquanto que a estacionária, correspondente ao período de 12 a 24 h e um tempo superior a 24 h, equivalente à fase de declínio.

4.2 QUANTIFICAÇÃO DA CAMADA DE BIOFILME FORMADA EM LAMÍNULAS DE VIDRO

No ensaio qualitativo realizado no início da fase estacionária (15 h), as amostras clínicas de *E. faecalis* foram classificadas de acordo com a formação de

um tapete microbiano aderido à lamínula de vidro em ausência (0%), 20% de cobertura (+), 40% (2+), 60% (3+), 80% (4+) e 100% (5+). Este ensaio foi realizado na presença e na ausência de glicose e observou-se que a presença deste carboidrato influenciou na aderência à lamínula, pois houve um aumento na formação do tapete microbiano em comparação à ausência do carboidrato. No ensaio quantitativo, realizado em 15 h, a glicose foi acrescida ao meio de cultura devido à sua influência na adesão à lamínula de vidro. Os resultados deste experimento foram expressos em unidades formadoras de colônia por centímetro quadrado (UFC/cm²).

As amostras clínicas de *E. faecalis* foram classificadas de acordo com os ensaios qualitativo e quantitativo em não formadoras de biofilme, fracas, moderadas e fortemente formadoras de biofilme. As amostras que não apresentaram nenhuma aderência à lamínula em ambos os ensaios foram classificadas como amostras não formadoras de biofilme. As fracamente formadoras de biofilme apresentaram uma aderência à lamínula aproximadamente de 20%, onde esta cobertura correspondeu a 1.0×10^5 a 9.9×10^5 UFC/cm². As amostras que apresentaram aproximadamente de 40 a 60% da lamínula coberta por células bacterianas foram classificadas como moderadamente formadoras de biofilme, sendo este valor equivalente a 1.0×10^6 a 9.9×10^6 UFC/cm². As amostras classificadas como fortemente formadoras aderiram mais que 80% da extensão da lamínula, correspondendo a valores maiores que 1.0×10^7 UFC/cm².

A distribuição dos diferentes grupos formadores de biofilme está representada na Figura 2. As amostras fracamente formadoras foram representadas por valores de logUFC/cm² iguais a 5,5 (amostras urinárias e de exsudato purulento) e 6,0 para amostra de swab retal. Amostras classificadas como moderadamente formadoras em vidro foram representadas por valores de logUFC/cm² aproximadamente a 6,5 (amostras urinárias e de exsudato purulento) e a 7,0 para amostra de swab retal. Valores de logUFC/cm² próximos de 7,5 representaram a amostras fortemente formadoras de biofilme isoladas de swab retal, exsudato purulento e urinária.

A freqüência de amostras clínicas de *E. faecalis* formadoras de biofilme em superfície de vidro está representada na Tabela 5. Das 95 amostras, 53 (55,8%) aderiram moderadamente à superfície de vidro, seguidas de 25 (26,3%) que aderiram fortemente e os demais grupos, a uma freqüência menor que 16% das

amostras analisadas. Entre as amostras urinárias, a maioria (62,0%) aderiu moderadamente à lamínula de vidro, seguida das amostras fortemente formadoras de biofilme (20,0%), as fracamente (16,0%) e, por fim, as não formadoras de biofilme (2,0%). Quanto à formação de biofilme entre as 26 amostras de exsudato purulento, a maioria (46,2%) aderiu moderadamente ao vidro, seguida de 38,5% das amostras capazes de aderir fortemente à superfície, enquanto que os demais grupos ocorreram em uma frequência menor que 12% das amostras analisadas. A maioria das amostras de swab retal (52,6%) aderiu moderadamente à lamínula de vidro, enquanto que 26,3% e 21,0% das amostras analisadas aderiram fortemente e fracamente à superfície, respectivamente. Nenhuma das amostras oriundas de swab retal foi classificada como não formadora de biofilme. Entretanto, não houve diferença significativa entre a origem das amostras e a classificação das mesmas quanto à capacidade de formarem biofilme na superfície de vidro ($p > 0,05$).

4.3 QUANTIFICAÇÃO DA CAMADA DE BIOFILME FORMADA EM POLIESTIRENO

No ensaio quantitativo, a glicose foi adicionada ao meio de cultura com o propósito de estimular a aderência das células bacterianas à superfície de poliestireno. A quantificação da camada de biofilme foi realizada no início da fase estacionária que corresponde a 15 h de cultivo.

Os critérios usados para classificar as amostras clínicas em diferentes grupos quanto à capacidade de formar ou não biofilme foram estabelecidos de acordo com os valores de densidade óptica a 550nm (DO_{550}) e de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL). As amostras clínicas que apresentaram aderência com valores de DO_{550} inferiores a 0,21 foram consideradas não formadoras de biofilme. Os valores entre 0,22 e 0,42 representaram as amostras fracamente formadoras de biofilme e na faixa entre 0,43 a 0,84 foram classificadas como moderadamente formadoras de biofilme. As amostras fortemente formadoras de biofilme apresentaram valores de DO_{550} acima de 0,84.

A distribuição dos diferentes grupos formadores de biofilme em poliestireno está representada na Figura 3. As amostras fortemente formadoras de biofilme foram representadas por valores de DO_{550} iguais a 0,9 para amostra

urinária, 1,3 para amostra de exsudato purulento e 0,8 para amostra de swab retal. Valores de DO_{550} próximos a 0,6 representaram as amostras moderadamente formadoras de biofilme oriundas de urina e de swab retal, enquanto que valor igual a 0,7 representou a amostra oriunda de exsudato prurulento. As amostras urinárias, de swab retal e de exsudato purulento com valores de DO_{550} próximos de 0,4 representaram as fracamente formadoras de biofilme. Valores de DO_{550} inferiores a 0,2 representaram as amostras não formadoras de biofilme oriundas de urina, exsudato purulento e swab retal.

Paralelamente, o número de células bacterianas viáveis foi determinado através do plaqueamento de diluições seriadas. A faixa entre $1,0 \times 10^2$ a $9,9 \times 10^3$ UFC/mL corresponde diretamente à leitura de DO_{550} entre 0,22 e 0,42, enquanto que $1,0 \times 10^4$ a $9,9 \times 10^4$ e acima de $1,0 \times 10^5$ correspondem às leituras de densidades ópticas 0,43 a 0,84 e acima de 0,84, respectivamente.

A distribuição dos diferentes grupos formadores de biofilme segundo valores de logUFC/mL está representada na Figura 2. As amostras fracamente formadoras foram representadas por valores de logUFC/mL iguais a 4,0 (amostras de swab retal de exsudato purulento) e próximo de 2,0 para amostra de swab retal. Amostras classificadas como moderadamente formadoras em poliestireno foram representadas por valores de logUFC/mL próximos a 4,5 para as amostras de swab retal, exsudato purulento e urina. Valor de logUFC/cm² próximo de 5,5 representou a amostra fortemente formadora isolada de swab retal, valor próximo de 6,5 representou a amostras urinária e, por fim, a amostra de exsudato purulento representada por valor de logUFC/mL próximo de 7,0.

A frequência de amostras clínicas formadoras de biofilme em superfície de poliestireno está apresentada na Tabela 6. Das 95 amostras analisadas, metade (50,5%) pertence ao grupo das fracamente formadoras de biofilme, seguida das moderadamente formadoras (26,3%), não formadoras (16,8%) e, por fim, das fortemente (6,3%) formadoras de biofilme.

Entre as amostras urinárias, a maioria (56,0%) aderiu fracamente à superfície abiótica, seguida pelas moderadamente formadoras (22,0%) e as demais amostras foram agrupadas em menor frequência entre as fortemente (8,0%) e não formadoras (14,0%) de biofilme. Em relação as 26 amostras de exsudato purulento, 13 (50,0%) foram caracterizadas como fracamente formadoras de biofilme, enquanto que 09 (34,6%) das amostras foram consideradas como moderadamente formadoras

e os demais grupos ocorreram em menor que 11,5% das amostras analisadas. Nas amostras de swab retal, verificou-se que as frequências de amostras não formadoras e fracamente formadoras de biofilme foram equivalentes (31,6% e 36,8%, respectivamente), enquanto que a presença das amostras moderadamente formadoras de biofilme foi observada em 26,3% das amostras analisadas e somente 01 (5,3%) amostra foi considerada fortemente formadora de biofilme. Entretanto, não houve diferença significativa entre a classificação das amostras e a origem do material clínico ($p > 0,05$).

Comparando-se o comportamento das amostras clínicas quanto à formação de biofilme em ambas as superfícies abióticas, observou-se uma diferença significativa entre a formação da camada de biofilme e a superfície empregada ($p < 0,0001$) (Tabela 7). Algumas diferenças foram observadas quanto aos diferentes grupos formadores de biofilme, uma vez que, em vidro, a maioria (55,8%) das amostras apresentou a capacidade de formar moderadamente biofilme, enquanto que metade (50,5%) das amostras comportou-se como fracamente formadora de biofilme em superfície de poliestireno. De modo geral, a maioria (68,4%) das 95 amostras analisadas foi classificada como moderadamente formadora de biofilme, seguida de 56,8% fracamente formadoras e o restante das amostras distribuídas em menor extensão entre as fortemente (29,5%) e não formadoras (17,9%) de biofilme.

4.4 DETERMINAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME EM DIFERENTES FASES DA CURVA

Com o propósito de averiguar o grau de formação da camada de biofilme nas diferentes fases da curva de crescimento, procedeu-se a quantificação da camada de biofilme em um grupo representativo de amostras clínicas em ambas as superfícies abióticas. Os ensaios quantitativos foram realizados em diferentes tempos de cultivo correspondendo às fases exponencial (6 e 10 h), estacionária (15 e 24 h) e de declínio (36 e 48 h) (Figura 1).

Em superfície de vidro, a formação da camada de biofilme variou em função do tempo de cultivo das amostras como pode ser observado nos resultados apresentados na Figura 4. Os resultados demonstraram que a camada de biofilme formada na superfície de vidro aumentou progressivamente a partir de 10 h de

cultivo, atingindo um pico máximo de formação de biofilme em 15 h. É importante ressaltar que o valor de leitura da densidade óptica (DO_{550}) em 15 h (0,6) é aproximadamente 2 vezes o encontrado em 6 h de cultivo (0,3) para as amostras moderadamente e fracamente formadoras de biofilme. Para as amostras fortemente formadoras, essa diferença no valor da leitura DO_{550} em 15 h (1,4) em relação ao valor em 6 h (0,5) é maior (cerca de 3 vezes). Este valor para as amostras analisadas permanece inalterado até às 24 h quando se inicia a redução da camada de biofilme no final da fase estacionária. Após 24 h de cultivo bacteriano, a formação de biofilme caiu consideravelmente em função da fase de crescimento que corresponde à fase de declínio.

A figura 5 representa os resultados referentes à formação de biofilme em poliestireno nas diferentes fases da curva de crescimento. Estes resultados demonstraram que a camada de biofilme na superfície de poliestireno aumentou progressivamente a partir de 10 h de cultivo, sendo que, esta camada atingiu seu pico máximo de formação em 15 h. Neste período, o valor da leitura de DO_{550} em 15 h (próximo de 1,0) para as amostras classificadas como fortemente formadoras aumenta aproximadamente 5 vezes o valor da leitura em 6 h (0,2). Para as moderadamente e fracamente formadoras de biofilme, essa diferença é cerca de 2,5 e 1,5 vezes o valor da leitura de DO_{550} em 6 h (0,2 a 0,5 e 0,2 a 0,3), respectivamente. No período de 15 a 24 h, correspondente a fase estacionária, a camada permanece inalterada para as amostras analisadas, porém, a partir de 24 h, essa camada de biofilme formada reduz em função do início da fase de declínio.

4.5 INFLUÊNCIA DE CÁTIOS DIVALENTES NA FORMAÇÃO DE BIOFILME EM DIFERENTES SUPERFÍCIES ABIÓTICAS

O ensaio para avaliar a influência de cátions divalentes na formação de biofilme em ambas as superfícies abióticas foi realizado através de métodos quantitativos, onde os resultados foram expressos em UFC/mL para poliestireno e em UFC/cm² para vidro. As amostras clínicas capazes de formar biofilme em ambas as superfícies abióticas foram incluídas nestes experimentos realizados durante a fase estacionária.

Os resultados referentes a influência de cátions divalentes na formação de biofilme em superfície de vidro estão apresentados na Figura 6. Observa-se que os íons cálcio, magnésio e zinco não influenciaram significativamente na formação da camada de biofilme quando comparados a ausência dos mesmos, pois os valores de $\log\text{UFC}/\text{cm}^2$ permaneceram inalterados. Entretanto, os íons ferro causaram uma redução significativa na camada de biofilme em relação ao ensaio realizado na ausência do íon, uma vez que os valores de $\log\text{UFC}/\text{cm}^2$ na presença do íon ferro (na faixa de 2,0 a 4,5) sofreram uma diminuição aproximadamente de 0,5 vezes o valor do $\log\text{UFC}/\text{cm}^2$ na ausência deste cátion (na faixa de 5,0 a 8,0). Esta diferença foi estatisticamente provada pelo teste de Dunnett, onde a diferença mínima significativa observada foi de 1,7103. Quanto ao ensaio quantitativo na presença do íon cobre, observou-se que este cátion foi capaz de inibir a formação de biofilme na superfície de vidro. Na concentração final de 5mM, o íon cobre inibiu completamente a formação da camada de biofilme.

Os resultados relativos à influência de cátions divalentes na formação de biofilme em superfície de poliestireno estão representados na Figura 7. Pelos resultados apresentados, nota-se que os íons zinco, cálcio e magnésio não exerceram efeito significativo na formação de biofilme, pois na presença dos referidos cátions, os valores de $\log\text{UFC}/\text{mL}$ não sofreram alterações significativas quando comparados aos valores de $\log\text{UFC}/\text{mL}$ na ausência dos mesmos. Entretanto, o íon ferro provocou uma alteração significativa na formação de biofilme na superfície de poliestireno, uma vez que os valores de $\log\text{UFC}/\text{mL}$ na presença do íon (1,0 a 3,0) reduziram aproximadamente de 2,5 vezes quando comparados aos valores de $\log\text{UFC}/\text{mL}$ na ausência deste íon (2,5 a 7,0). Essa alteração foi comprovada estatisticamente pelo teste de Dunnett, onde o valor da diferença mínima significativa foi de 1,5101. A presença dos íons cobre no meio de cultivo inibiu a formação da de biofilme em poliestireno.

Os resultados da influência das diferentes concentrações (0,01, 0,05, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 e 10,0 mM) de íon ferro na camada de biofilme em superfície de vidro estão apresentados na Figura 8. De acordo com os resultados apresentados, nota-se que uma concentração igual ou superior a 5,0mM reduziu a formação de biofilme nesta superfície, independentemente dos grupos aos quais as amostras pertencem com relação a capacidade de formar ou não biofilme. Esta redução é mostrada pela diminuição no valor de $\log\text{UFC}/\text{cm}^2$ na concentração de

5,0mM (2,5 a 5,0) cerca de 0,6 vezes o valor inicial de $\log\text{UFC}/\text{cm}^2$ (5,0 a 8,0), sendo que os menores valores de $\log\text{UFC}/\text{cm}^2$ representam as amostras fracamente formadoras de biofilme, enquanto que os maiores valores representam as amostras fortemente formadoras. Esta redução é progressiva até a última concentração testada (10mM), porém, nesta concentração, a formação de biofilme não foi completamente inibida.

A influência das diferentes concentrações (0,01, 0,05, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 e 10,0 mM) do íon ferro na formação da camada de biofilme em poliestireno está apresentada na Figura 9. Nota-se que concentrações deste cátion iguais ou superiores a 2,5 mM provocaram uma redução na formação da camada de biofilme, pois os valores de $\log\text{UFC}/\text{mL}$ nesta concentração (2,5 a 4,5) reduziram aproximadamente 0,7 vezes o valor de $\log\text{UFC}/\text{mL}$ na ausência do cátion (3,5 a 6,5), sendo que os menores valores de UFC/mL representam as amostras fracamente formadoras de biofilme, enquanto que os valores maiores, as fortemente formadoras. Porém, a uma concentração de 10 mM, a formação da camada de biofilme foi completamente inibida.

Os resultados das diferentes concentrações do íon cobre (0,01, 0,05, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 e 10,0 mM) na formação de biofilme em vidro são mostrados na Figura 10. De acordo com os resultados obtidos, a redução da camada de biofilme varia segundo a capacidade de formar biofilme na superfície de vidro das amostras analisadas. As amostras moderadamente e fortemente formadoras tiveram a formação da camada de biofilme reduzida a partir de uma concentração igual ou superior a 0,01mM, sendo depletada a uma concentração superior a 5mM. Para as amostras fracamente formadoras de biofilme, a concentração do íon que acarretou na diminuição da camada de biofilme é equivalente ou superior a 0,01mM, sendo que, em concentrações acima de 2,5mM, essa formação da camada de biofilme foi completamente inibida.

A influência das concentrações de íon cobre (0,01, 0,05, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 e 10,0 mM) na formação de biofilme em poliestireno está apresentada na Figura 11. Pelos resultados obtidos, as alterações na formação de biofilme variaram de acordo com a capacidade das amostras analisadas em formar biofilme na superfície de poliestireno. Para as amostras fracamente formadoras, a redução na formação de biofilme só ocorreu a uma concentração igual ou superior a 1mM, sendo que, a partir de uma concentração de 5mM, a formação de biofilme foi

completamente inibida. A formação de biofilme para as amostras moderadamente formadoras alterou-se a partir de uma concentração igual a 2,5mM e, em concentrações superiores, essa formação foi completamente inibida pela presença do íon. Para as amostras fortemente formadoras de biofilme, a redução na formação do mesmo foi significativa a uma concentração igual ou superior a 5mM, sendo que, na concentração de 10mM, houve a completa inibição da formação de biofilme em poliestireno.

4.6 TESTE DE HIDROFOBICIDADE (SAT)

O ensaio de hidrofobicidade foi realizado através do método de SAT (“salt aggregation test”), onde o grau de hidrofobicidade foi expresso em função da agregação celular bacteriana frente a diferentes concentrações de sulfato de amônio (0,0, 0,05, 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, e 4,0 M), onde as amostras consideradas hidrofóbicas aglutinaram a uma concentração inferior a 2 M do referido sal. Este ensaio foi realizado em dois períodos da curva de crescimento, em 8 (fase exponencial) e em 15 h (fase estacionária).

No ensaio realizado em 15 h, todas as amostras aglutinaram a uma concentração superior ou igual a 2 M de sulfato de amônio, caracterizando-as como hidrofílicas. No ensaio utilizando-se o tempo de 8 h de cultivo (Figura 12), ocorreu uma alteração significativa dos resultados ($p < 0,0001$). Das 95 amostras clínicas, 50 (52,6%) aglutinaram a uma concentração inferior a 2M de sulfato de amônio, caracterizando-as como hidrofóbicas. Em relação as 50 amostras urinárias, 54,0% foram caracterizadas como amostras hidrofóbicas, enquanto que das 19 amostras oriundas de swab retal, 63,2% apresentaram-se hidrofóbicas. As amostras oriundas de exsudato purulento, em sua maioria (57,7%), permaneceram caracterizadas como hidrofílicas quando comparadas aos resultados do ensaio em 15 h. Porém, não houve uma diferença significativa entre a freqüência de amostras hidrofóbicas em relação à origem das mesmas ($p = 0,3667$).

A distribuição das amostras clínicas formadoras de biofilme segundo o grau de hidrofobicidade com 8h de cultivo é apresentada na Tabela 8. Para as amostras classificadas como formadoras de biofilme em vidro, não houve diferença

quanto ao grau de hidrofobicidade. As amostras fracamente e fortemente formadoras de biofilme na superfície de vidro apresentaram-se hidrofílicas em sua maioria, 17,8% e 26,7%, respectivamente. A maior parte das amostras (58,0%) moderadamente formadoras de biofilme em vidro foram caracterizadas como hidrofóbicas. Em poliestireno, a maioria (18,0%) das amostras não formadoras de biofilme caracterizou-se como hidrofóbica, o mesmo equivale para as amostras moderadamente (28,0%) e fortemente formadoras (8,0%). As amostras fracamente formadoras, em sua maioria (55,5%), apresentaram-se como amostras hidrofílicas.

4.7 ENSAIO PARA DETECÇÃO DE N-ACETILHOMOSERINA LACTONA (AHL)

Com o propósito de se investigar a presença de uma provável molécula autoindutora em 40 amostras clínicas de *E. faecalis*, um ensaio de difusão em placa foi realizado utilizando-se uma amostra de *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 que carrega os plasmídeos pCF218 e pCF372 que contém um regulador TraR, respondendo à presença de AHL e TraR/AHL dependente de lacZ, respectivamente. A indução de uma atividade β -galactosidase na amostra repórter em presença de *E. faecalis* sugere a presença de moléculas autoindutoras envolvidas no processo de *quorum sensing*. Neste estudo, nenhuma das amostras analisadas foi capaz de produzir moléculas autoindutoras em 15 h de cultivo bacteriano. Os ensaios foram realizados neste tempo devido às amostras apresentarem maior formação da camada de biofilme no início da fase estacionária como foi constatado pelos resultados apresentados nas Figuras 4 e 5.

4.8 PESQUISA DE GENES DE VIRULÊNCIA

Os nove determinantes analisados por PCR estão representados nas Figuras 13 e 14. A distribuição destes determinantes entre as amostras clínicas está apresentada na Tabela 9. Quanto as 95 amostras de *E. faecalis*, 56 (58,9%) albergaram o gene *efaA*, assim como o *eep* (58,9%), seguidas de 55 amostras (57,9%) que albergaram o gene *esp*. O gene *gelE* foi encontrado a uma frequência

de 45.3%, seguido pelo gene *aggA* (36.8%) e o restante dos determinantes foram encontrados a uma frequência menor que 17% das amostras analisadas.

O gene *esp* foi encontrado na maior parte das amostras urinárias (62,0%), seguidos dos genes *eep* (58,0%), *efaA* (54,0%), *gelE* (50,0%) e *aggA* (38,0%), sendo que os demais determinantes foram detectados em menos que 23% das amostras analisadas. A maior parte das amostras isoladas de exsudato purulento (69,2%) albergaram o gene *efaA*, seguida de *eep* (58,0%) e *esp* (46,1%). Os genes *aggA* e *gelE* foram detectados em menos que 40% das amostras isoladas de exsudato purulento, entretanto em apenas 1 amostra (3,8%), os genes *cyIA* e *enIA* foram detectados, enquanto que os genes *cyIMB* não foram encontrados em nenhuma das amostras de exsudato purulento analisadas. Grande parte das amostras oriundas de swab retal albergou os genes *eep* (68,4%), *esp* (63,1%), *efaA* (57,9%) e *gelE* (47,4%), enquanto que as restantes albergaram os demais genes a uma frequência inferior a 32,0%. Entretanto, apenas os genes *cyIMB* mostraram-se significativamente associados às amostras urinárias ($p < 0,0001$).

A distribuição dos determinantes entre as amostras formadoras de biofilme em vidro está apresentada na Tabela 10. Somente os genes *efaA*, *esp*, *cyIM* e *eep* foram detectados em apenas uma amostra não formadora de biofilme. Nas amostras fracamente formadoras de biofilme, o gene *esp* foi encontrado em maior frequência (60,0%), seguidos de 46,7% que albergaram os genes *efaA*, *gelE* e *eep* e de 40,0% das amostras analisadas que carregaram o gene *aggA*, os demais determinantes foram encontrados a uma frequência menor que 7%. O gene *efaA* foi encontrado na maior parte (64,1%) das amostras moderadamente formadoras de biofilme, seguido dos genes *esp* e *eep* (56,6%), *gelE* (45,35), *aggA* (35,85) e, por fim, os demais determinantes a uma frequência inferior a 20,7% das amostras analisadas. A maioria das amostras classificadas como fortemente formadoras de biofilme (72,0%) albergaram o gene *eep*, seguidos pelos genes *esp* (60,0%), *efaA* (56,0%), *gelE* (48,0%), *aggA* (40,0%) e, por fim, a uma frequência menor que 17%, os demais determinantes analisados. Houve uma associação significativa entre as amostras moderadamente formadoras de biofilme em vidro e os seguintes determinantes, *cyIAM*, *enIA*, *efaA*, *esp*, *aggA*, *gelE* e *eep* ($p < 0,05$).

Os determinantes de virulência estão distribuídos entre as amostras clínicas formadoras de biofilme em poliestireno conforme apresentado na Tabela 11. Para a maior parte das 16 amostras não formadoras de biofilme (62,5%), o gene *eep*

foi encontrado em maior frequência, seguido de 56,2% que albergaram o gene *efaA* e 50,0% das amostras analisadas carregaram os genes *esp*, *aggA* e *gelE*, enquanto que os demais determinantes foram encontrados em menos que 13% destas amostras. Os genes *esp* e *eep* foram detectados na maioria das amostras fracamente formadoras de biofilme (58,3%), seguidos do gene *efaA* (56,2%) e dos determinantes restantes (menor que 36%). Para a maior parte das amostras moderadamente formadoras de biofilme (72,0%), o gene *efaA* foi encontrado em maior frequência, seguidos pelos genes *esp* (60,0%), *gelE* e *eep* (56,0%) e os demais determinantes encontrados a uma frequência menor que 33,0% das amostras analisadas. Mais da metade das amostras fortemente formadoras de biofilme albergou os genes *gelE* (83,3%), *esp* e *eep* (66,7%), enquanto que menos de 34% das amostras analisadas albergaram os demais genes pesquisados. Para as amostras fracamente formadoras de biofilme em poliestireno foi encontrada uma associação significativa para os genes *cylA*, *efaA*, *esp*, *aggA* e *eep* ($p < 0,05$).

A ocorrência dos principais perfis genotípicos relativos à presença simultânea de genes de virulência encontrados em amostras clínicas de *E. faecalis* está apresentada na Tabela 12. Enquanto que a distribuição dos nove determinantes de virulência pesquisados segundo a quantidade destes detectada por PCR está representada na Tabela 13. A maior parte das amostras albergaram de 2 a 3 genes (24,2% e 28,4%, respectivamente), o restante das amostras apresentaram, a uma frequência menor que 15%, 0, 1, 4, 5, 6 e 7 determinantes detectados. Nenhuma das amostras analisadas apresentou os nove determinantes pesquisados, porém apenas 1 amostra urinária apresentou 8 dos 9 genes (*cyIMBA*⁺, *efaA*⁺, *esp*⁺, *aggA*⁺, *gelE*⁺, *eep*⁺). Das 50 amostras urinárias, todas apresentaram pelo menos um determinante, sendo 2 e 3 genes, a quantidade detectada em maior frequência (20,0% e 32,0%, respectivamente). Das 26 amostras de exsudato purulento, grande parte apresentou de 2 a 3 determinantes detectados (26,9% e 34,6%, respectivamente), sendo que nenhuma das amostras apresentou mais de 5 genes detectados. Para as amostras isoladas de swab retal, a maioria apresentou de 2 (31,6%) a 3 (10,5%) genes detectados, entretanto em nenhuma das amostras foram detectados mais de 7 determinantes.

Das 23 amostras que albergaram 2 genes, 5,3% delas albergaram *efaA*⁺ e *esp*⁺, *efaA*⁺ e *gelE*⁺, *esp*⁺ e *eep*⁺, sendo que a maioria destas (aproximadamente 22%) era oriunda de material urinário. O gene *eep* foi o que se

apresentou mais freqüente (8/11) para aquelas amostras em que apenas um determinante foi detectado. O perfil *efaA*⁺, *esp*⁺, *gelE*⁺ foi encontrado em maior freqüência (7/27) para aquelas amostras que albergaram 3 determinantes, onde a maioria das amostras com este perfil era de origem urinária (4/7).

Tabela 5 – Freqüência de amostras clínicas de *E. faecalis* formadoras de biofilme em superfície de vidro^b

Material clínico (Nº de amostras)	Nº (%) de amostras formadoras de biofilme ^a			
	NF	FRF	MF	FF
Urina (50)	01 (2,0)	08 (16,0)	31 (62,0)	10 (20,0)
Exsudato purulento (26)	01 (3,9)	03 (11,5)	12 (46,2)	10 (38,5)
Swab retal (19)	0 (0,0)	04 (21,0)	10 (52,6)	05 (26,3)
TOTAL	02/95 (2,1)	15/95 (15,8)	53/95 (55,8)	25/95 (26,3)

^aAs amostras clínicas de *E. faecalis* foram classificadas de acordo com a capacidade de formar biofilme na superfície de vidro em: NF: não formadora de biofilme; FRF, fracamente formadora de biofilme; MF: moderadamente formadora de biofilme; FF: fortemente formadora de biofilme.

^bAs amostras não diferem significativamente quanto à origem do material e a capacidade de formar biofilme em vidro ($p=0,5770$)

Tabela 6 – Freqüência de amostras clínicas de *E. faecalis* formadoras de biofilme em superfície de poliestireno^b

Material clínico (Nº de amostras)	Nº (%) de amostras formadoras de biofilme em poliestireno ^a			
	NF	FRF	MF	FF
Urina (50)	07 (14,0)	28 (56,0)	11 (22,0)	04 (8,0)
Exsudato purulento (26)	03 (11,5)	13 (50,0)	09 (34,6)	01 (3,9)
Swab retal (19)	06 (31,6)	07 (36,8)	05 (26,3)	01 (5,3)
TOTAL	16/95 (16,8)	48/95 (50,5)	25/95 (26,3)	06/95 (6,3)

^aAs amostras clínicas de *E. faecalis* foram classificadas de acordo com a capacidade de formar biofilme na superfície de vidro em: NF: não formadora de biofilme; FRF, fracamente formadora de biofilme; MF: moderadamente formadora de biofilme; FF: fortemente formadora de biofilme.

^b As amostras não diferem significativamente quanto à origem do material e a capacidade de formar biofilme em poliestireno ($p=0,5009$)

Tabela 7 – Frequência de amostras clínicas de *E. faecalis* formadoras de biofilme em diferentes superfícies abióticas^c

Grupos formadores de biofilme ^a	Nº (%) de amostras formadores de biofilme em superfícies abióticas ^b		
	Vidro	Poliestireno	TOTAL
NF	02/95 (2,1)	16/95 (16,8)	17/95(17,9)
FRF	15/95 (15,8)	48/95 (50,5)	54/95 (56,8)
MF	53/95 (55,8)	25/95 (26,3)	65/95 (68,4)
FF	25/95 (26,3)	06/95 (6,3)	28/95 (29,5)

^aGrupos classificados de acordo com a capacidade de formar ou não biofilme em diferentes superfícies. NF: não formadora de biofilme; FRF, fracamente formadora de biofilme; MF: moderadamente formadora de biofilme; FF: fortemente formadora de biofilme.

^bOs ensaios de biofilme foram realizados em lamínulas de vidro arredondadas (13 mm) e microplacas de poliestireno em fundo em U.

^c As amostras diferem significativamente quanto ao substrato utilizado e a capacidade de formar biofilme ($p < 0,0001$)

Tabela 8 – Distribuição de amostras clínicas de *E. faecalis* formadoras de biofilme segundo o grau de hidrofobicidade^a

Formação de biofilme ^b	Nº (%) de amostras hidrofóbicas		Nº (%) de amostras hidrofílicas	
	Poliestireno	Vidro	Poliestireno	Vidro
NF	09/50 (18,0)	01/50 (2,0)	07/45 (15,5)	01/45 (2,2)
FRF	23/50 (46,0)	07/50 (14,0)	25/45 (55,5)	08/45 (17,8)
MF	14/50 (28,0)	29/50 (58,0)	11/45 (24,5)	24/45 (53,3)
FF	04/50 (8,0)	13/50 (26,0)	02/45 (4,5)	12/45 (26,7)

^a Grau de hidrofobicidade determinado em 8 h pelo método de aglutinação em sulfato de amônio

^bAs amostras clínicas de *E. faecalis* foram classificadas de acordo com a capacidade de formar biofilme nas superfícies abióticas em: NF: não formadora de biofilme; FRF, fracamente formadora de biofilme; MF: moderadamente formadora de biofilme; FF: fortemente formadora de biofilme.

Tabela 9 – Distribuição de determinantes de virulência em amostras de *E. faecalis* isoladas de diferentes materiais clínicos

Genes de virulência ^a	Nº (%) de amostras clínicas de <i>E. faecalis</i>			TOTAL
	Urina (n = 50)	Exsudato purulento (n = 26)	Swab retal (n = 19)	
<i>cyIA</i>	11 (22,0)	01 (3,8)	04 (21,0)	16/95 (16,8)
<i>cyIB</i>	11 (22,0)	0 (0,0)	03 (15,8)	14/95 (14,7)
<i>cyIM</i>	11 (22,0)	0 (0,0)	03 (15,8)	14/95 (14,7)
<i>enIA</i>	07 (14,0)	01 (3,8)	01 (5,3)	09/95 (9,5)
<i>esp</i>	31 (62,0)	12 (46,1)	12 (63,1)	55/95 (57,9)
<i>efaA</i>	27 (54,0)	18 (69,2)	11 (57,9)	56/95 (58,9)

Tabela 9 – Distribuição de determinantes de virulência em amostras de *E. faecalis* isoladas de diferentes materiais clínicos (Continuação)

Genes de virulência ^a	Nº (%) de amostras clínicas de <i>E. faecalis</i>			TOTAL
	Urina (n = 50)	Exsudato purulento (n = 26)	Swab retal (n = 19)	
<i>eep</i>	29 (58,0)	14 (53,8)	13 (68,4)	56/95 (58,9)
<i>aggA</i>	19 (38,0)	10 (38,5)	06 (31,6)	35/95 (36,8)
<i>gelE</i>	25 (50,0)	09 (34,6)	09 (47,4)	43/95 (45,3)

^a*cyIA*, componente do operon *cyI* responsável pela ativação da citolisina; *enIA*, codifica para enterolisina A; *efaA*, componente do operon *efa* que codifica para um transportador de membrana; *esp*, associada com proteína envolvida no processo de evasão celular; *aggA*, codifica para substância de agregação envolvida na aderência, agregação celular e conjugação; *gelE*, codifica para protease responsável pela hidrólise da gelatina e outros pequenos peptídeos biologicamente ativos, também associado a processos inflamatórios; *cyIB*, componente do operon *cyI* que codifica para transporte de citolisina; *cyIM*, componente do operon *cyI* que codifica para modificação pós-traducional da citolisina; *eep*, proteína de membrana necessária para a expressão de feromônio cAD1.

Tabela 10 – Distribuição de determinantes de virulência entre amostras clínicas de *E. faecalis* formadoras de biofilme em superfície de vidro

Genes de virulência ^a	Nº (%) de amostras formadoras de biofilme em superfície de vidro ^b			
	NF (n = 02)	FRF (n = 15)	MF (n = 53)	FF (n = 25)
<i>cylA</i>	0 (0,0)	01 (6,7)	11 (20,7)	04 (16,0)
<i>enlA</i>	0 (0,0)	01 (6,7)	07 (13,2)	01 (4,0)
<i>efaA</i>	01 (50,0)	07 (46,7)	34 (64,1)	14 (56,0)
<i>esp</i>	01 (50,0)	09 (60,0)	30 (56,6)	15 (60,0)
<i>aggA</i>	0 (0,0)	06 (40,0)	19 (35,8)	10 (40,0)
<i>gelE</i>	0 (0,0)	07 (46,7)	24 (45,3)	12 (48,0)

Tabela 10 – Distribuição de determinantes de virulência entre amostras clínicas de *E. faecalis* formadoras de biofilme em superfície de vidro (Continuação)

Genes de virulência ^a	Nº (%) de amostras formadoras de biofilme em superfície de vidro ^b			
	NF (n = 02)	FRF (n = 15)	MF (n = 53)	FF (n = 25)
<i>cyiB</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	10 (18,9)	04 (16,0)
<i>cyiM</i>	01 (50,0)	0 (0,0)	09 (17,0)	04 (16,0)
<i>eep</i>	01 (50,0)	07 (46,7)	30 (56,6)	18 (72,0)

^a Conforme os determinantes descritos na Tabela 9.

^bAs amostras clínicas de *E. faecalis* foram classificadas de acordo com a capacidade de formar biofilme na superfície de vidro em: NF: não formadora de biofilme; FRF, fracamente formadora de biofilme; MF: moderadamente formadora de biofilme; FF: fortemente formadora de biofilme.

Tabela 11 – Distribuição de determinantes de virulência entre amostras clínicas de *E. faecalis* formadoras de biofilme em superfície de poliestireno

Genes de virulência ^a	Nº (%) de amostras formadoras de biofilme em superfície de poliestireno ^b			
	NF (n = 16)	FRF (n = 48)	MF (n = 25)	FF (n = 06)
<i>cyIA</i>	02 (12,5)	10 (20,8)	04 (16,0)	0 (0,0)
<i>enIA</i>	02 (12,5)	05 (10,4)	01 (4,0)	01 (16,7)
<i>efaA</i>	09 (56,2)	27 (56,2)	18 (72,0)	02 (33,3)
<i>esp</i>	08 (50,0)	28 (58,3)	15 (60,0)	04 (66,7)
<i>aggA</i>	08 (50,0)	17 (35,4)	08 (32,0)	02 (33,3)
<i>gelE</i>	08 (50,0)	16 (33,3)	14 (56,0)	05 (83,3)

Tabela 11 – Distribuição de determinantes de virulência entre amostras clínicas de *E. faecalis* formadoras de biofilme em superfície de poliestireno (Continuação)

Genes de virulência ^a	Nº (%) de amostras formadoras de biofilme em superfície de poliestireno ^b			
	NF (n = 16)	FRF (n = 48)	MF (n = 25)	FF (n = 06)
<i>cyIB</i>	02 (12,5)	07 (14,6)	03 (12,0)	02 (33,3)
<i>cyIM</i>	0 (0,0)	08 (16,7)	05 (20,0)	01 (16,7)
<i>eep</i>	10 (62,5)	28 (58,3)	14 (56,0)	04 (66,7)

^a Conforme os determinantes descritos na Tabela 9.

^b As amostras clínicas de *E. faecalis* foram classificadas de acordo com a capacidade de formar biofilme na superfície de poliestireno em: NF: não formadora de biofilme; FRF, fracamente formadora de biofilme; MF: moderadamente formadora de biofilme; FF: fortemente formadora de biofilme.

Tabela 12 – Ocorrência dos principais perfis genotípicos relativos à presença de genes de virulência encontrados em amostras de *E. faecalis* isoladas de diferentes materiais clínicos

Perfil genético ^a	Nº (%) de amostras clínicas albergando os perfis genéticos
Nenhum	02/95 (2,1)
<i>agg, eep.</i>	03/95 (3,2)
<i>eep</i>	08/95 (8,4)
<i>efaA, agg, eep</i>	03/95 (3,2)
<i>efaA, agg, esp</i>	03/95 (3,2)
<i>efaA, esp</i>	05/95 (5,3)
<i>efaA, esp, agg, eep</i>	03/95 (3,2)
<i>efaA, esp, agg, gelE</i>	02/95 (2,1)
<i>efaA, esp, agg, gelE, eep</i>	02/95 (2,1)
<i>efaA, esp, eep</i>	03/95 (3,2)
<i>efaA, esp, gelE</i>	07/95 (7,4)
<i>efaA, gelE</i>	05/95 (5,3)

Tabela 12 – Ocorrência dos principais perfis genotípicos relativos à presença de genes de virulência encontrados em amostras de *E. faecalis* isoladas de diferentes materiais clínicos (Continuação)

Perfil genético ^a	Nº (%) de amostras clínicas albergando os perfis genéticos
<i>enlA, gelE, eep</i>	02/95 (2,1)
<i>esp</i>	02/95 (2,1)
<i>esp, agg</i>	02/95 (2,1)
<i>esp, agg, gelE, eep</i>	02/95 (2,1)
<i>esp, epp</i>	05/95 (5,3)
<i>esp, gelE, eep</i>	03/95 (3,2)

^a Associação de determinantes de virulência, conforme descritos na Tabela 9, encontrados em amostras clínicas de *E. faecalis*.

Tabela 13 - Distribuição de determinantes de virulência em amostras clínicas de *E. faecalis* segundo a presença de genes detectados por PCR

NÚMERO DE GENES DETECTADOS ^a	MATERIAL CLÍNICO (%)			Total
	Urina (50)	Exsudato purulento (26)	Swab retal (19)	
0	0 (0,0)	01 (3,8)	01 (5,3)	02/95 (2,1)
1	05 (10,0)	04 (15,4)	02 (10,5)	11/95 (11,6)
2	10 (20,0)	07 (26,9)	06 (31,6)	23/95 (24,2)
3	16 (32,0)	09 (34,6)	02 (10,5)	27/95 (28,4)
4	06 (12,0)	05 (19,2)	03 (15,8)	14/95 (14,7)
5	07 (14,0)	0 (0,0)	02 (10,5)	09/95 (9,5)
6	04 (8,0)	0 (0,0)	01 (5,3)	05/95 (5,3)
7	01 (2,0)	0 (0,0)	02 (10,5)	03/95 (3,2)
8	01 (2,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	01/95 (1,0)
9	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)

^a Coexistência de genes de virulência em amostras clínicas de *E. faecalis*

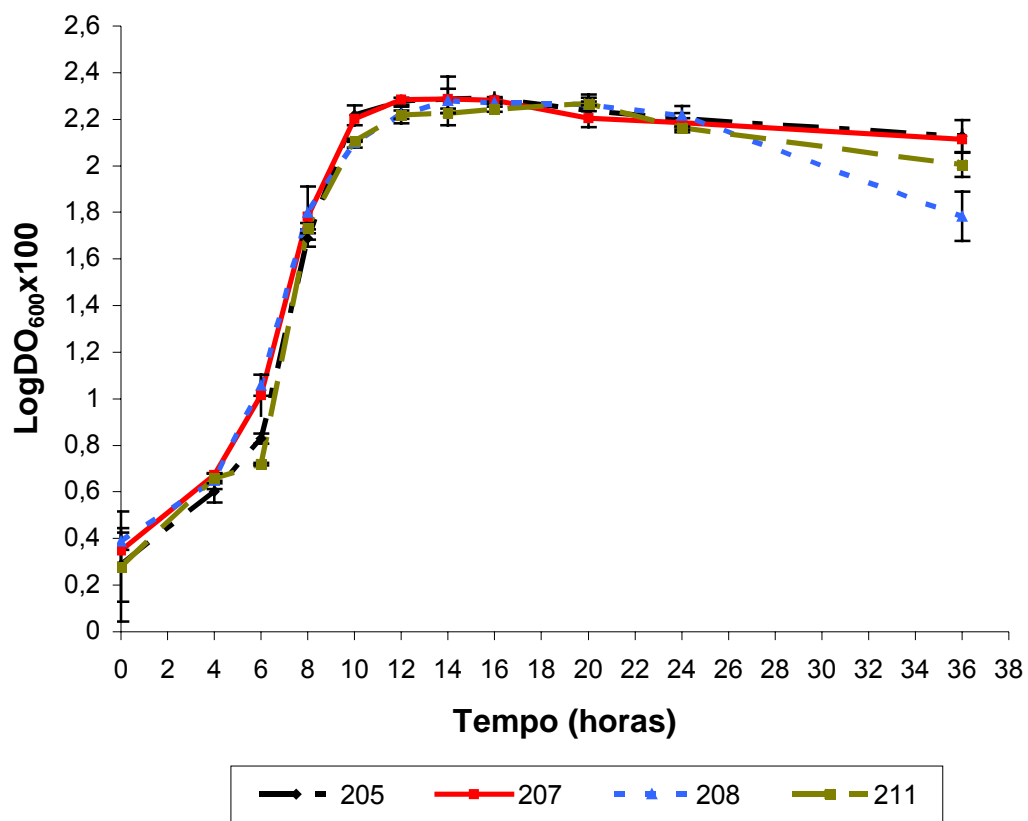


Figura 1 – Curvas de crescimento de amostras representativas de *E. faecalis* isoladas de urina. Os valores indicados no eixo x representam o tempo (em h) correspondendo ao crescimento microbiano, enquanto os valores do logaritmo decimal da densidade óptica (DO_{600}) estão indicados no eixo y. As amostras 205, 207, 208 e 211 são originárias de material urinário. As barras indicadas no gráfico representam o desvio padrão de experimentos realizados em duplicata.

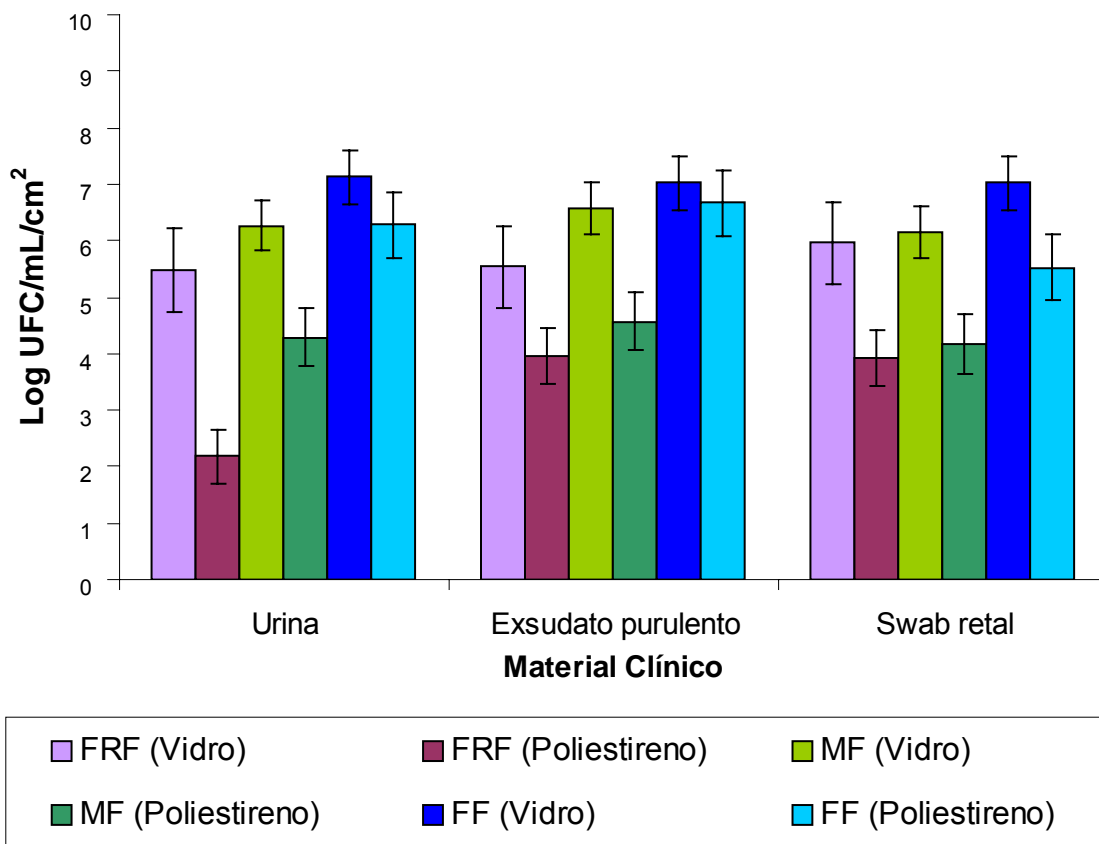


Figura 2 - Formação de biofilme em vidro e poliestireno entre amostras representativas de *E. faecalis* isoladas de diferentes materiais clínicos. O eixo y apresenta o valor de log do número de células viáveis aderidas às superfícies (UFC/mL/cm²), enquanto o eixo x representa as amostras originadas de materiais clínicos classificadas em relação à formação de biofilme. As siglas representam as amostras classificadas de acordo com a formação de biofilme: FRF – fracamente formadora; MF – moderadamente formadoras; FF – fortemente formadoras. As barras representam os desvios padrão de experimentos realizados em duplicata. As cores das colunas representam o valor do log da UFC/cm²/mL obtido por amostras representativas em relação à origem e à superfície utilizada no experimento de quantificação

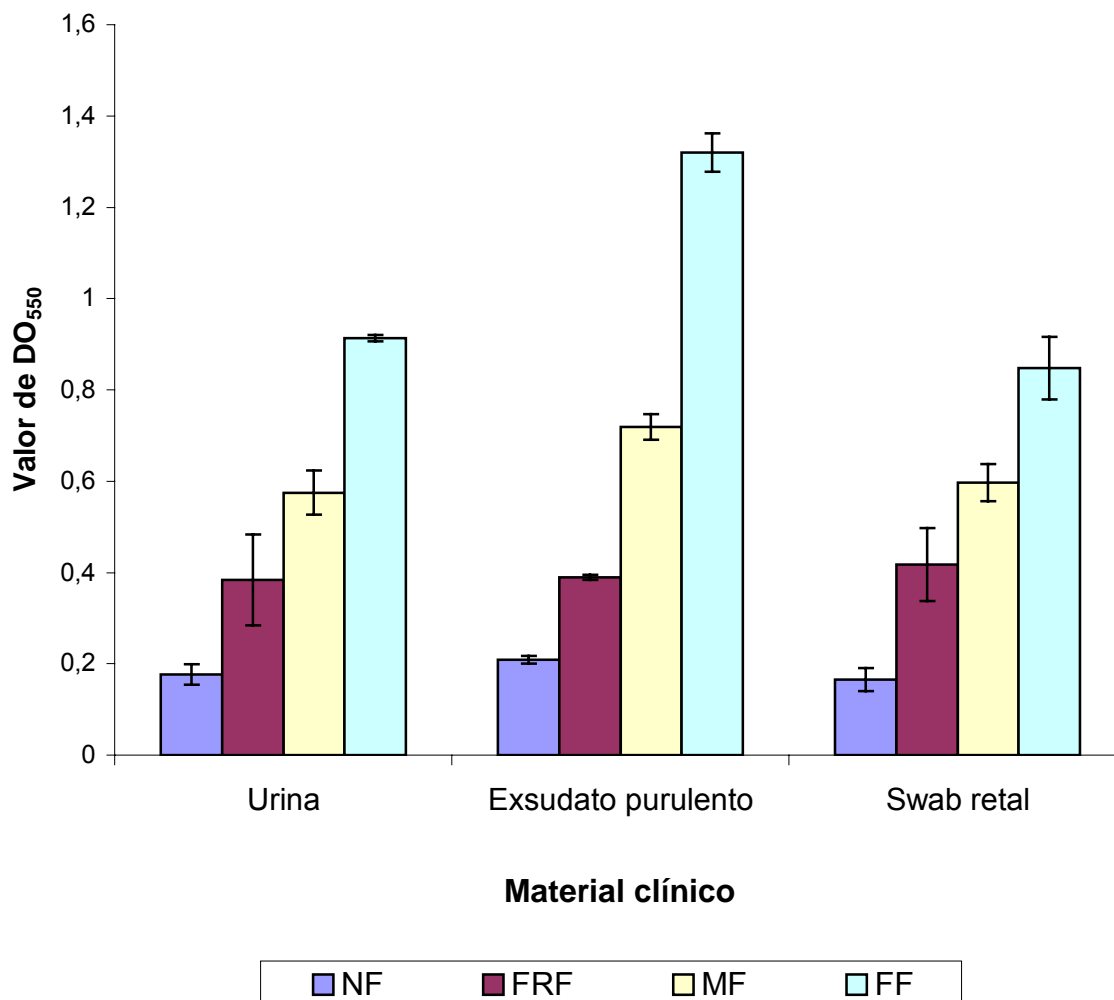


Figura 3 - Formação de biofilme em microplacas de poliestireno entre amostras clínicas representativas de *E. faecalis*. O eixo y apresenta o valor de DO_{550} , enquanto o eixo x representa as amostras clínicas classificadas de acordo com a formação de biofilme. As siglas representam as amostras classificadas de acordo com a formação de biofilme: FRF – fracamente formadora; MF – moderadamente formadoras; FF – fortemente formadoras. As barras representam os desvios padrão de experimentos realizados em duplicata. As cores das colunas representam os valores de DO_{550} de amostras representativas em relação à origem do material clínico.

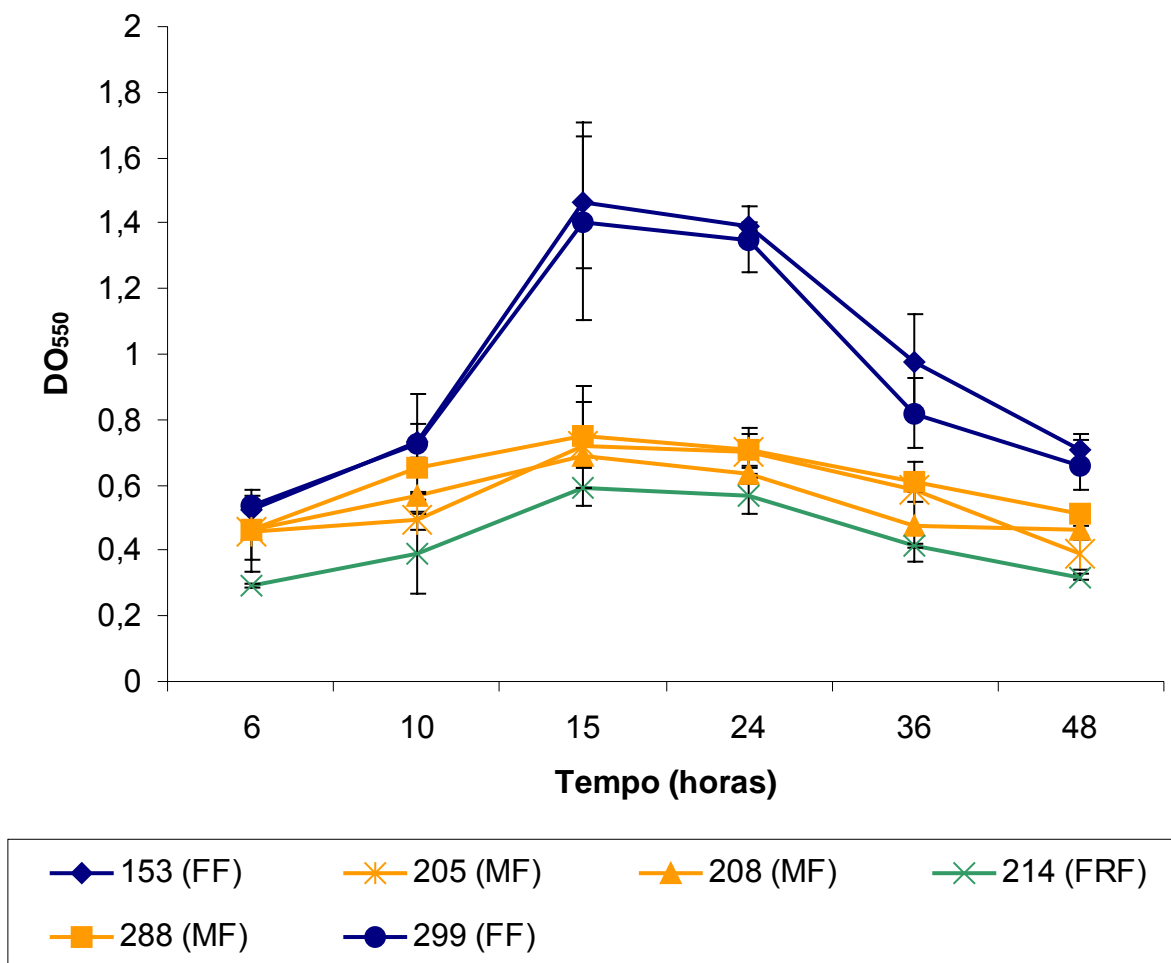


Figura 4 - Cinética de formação de biofilme na superfície de vidro em amostras representativas de *E. faecalis*. O eixo x representa o tempo (em h), enquanto que o eixo y, o valor de DO_{550} . As siglas representam as amostras classificadas de acordo com a formação de biofilme: FRF – fracamente formadora; MF – moderadamente formadoras; FF – fortemente formadoras. As amostras 153 e 299 são oriundas de exsudato purulento, as amostras 205 e 208 são oriundas de material urinário e as amostras 214 e 288 são oriundas de swab retal. As barras representam o desvio padrão de experimentos realizados em duplicata. ($p < 0,0001$)

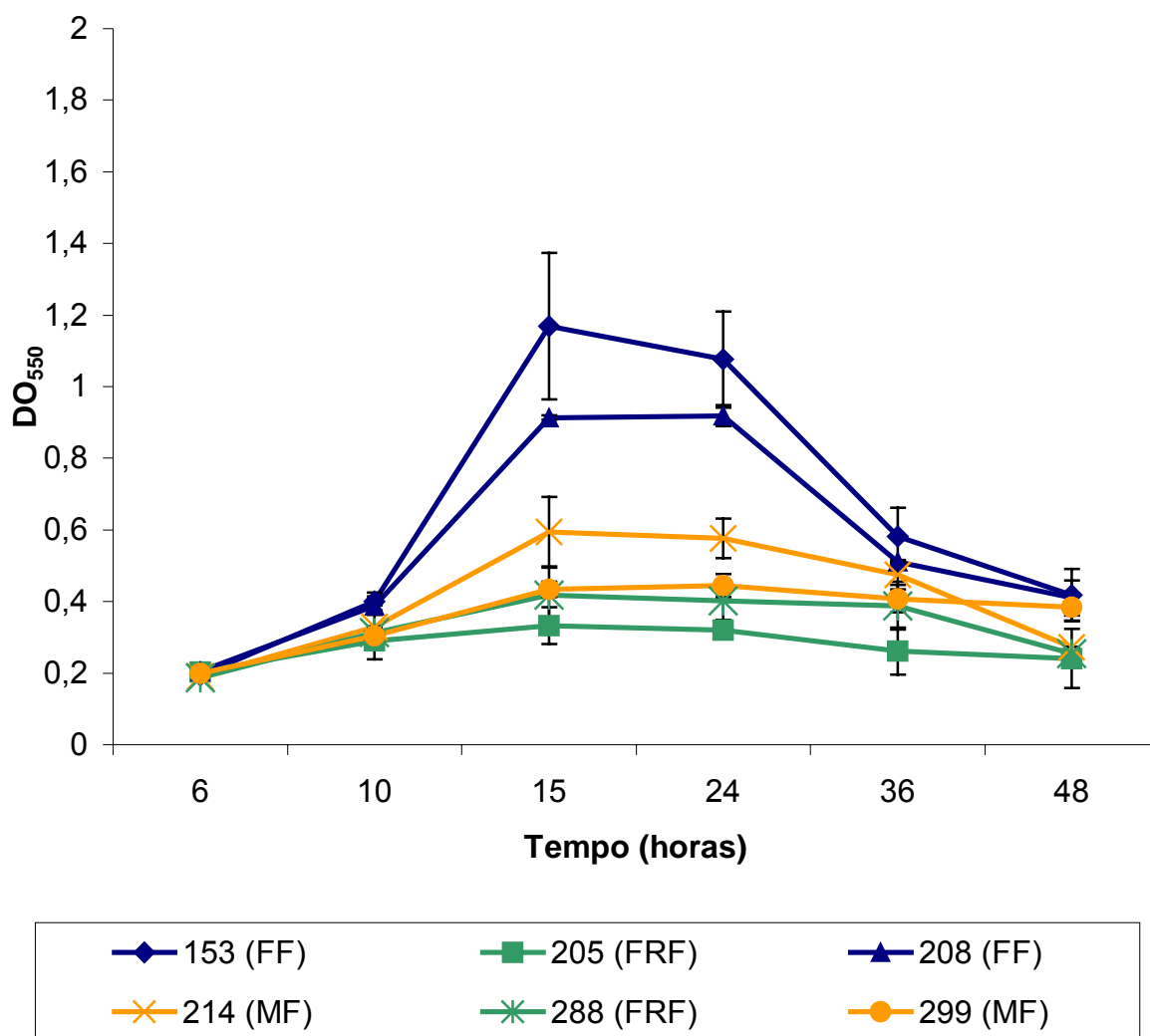


Figura 5 - Cinética de formação de biofilme na superfície de poliestireno em amostras representativas de *E. faecalis*. O eixo x representa o tempo (em h), enquanto que o eixo y, o valor de DO_{550} . As siglas representam as amostras classificadas em relação à formação de biofilme: FRF – fracamente formadora; MF – moderadamente formadoras; FF – fortemente formadoras. As amostras 153 e 299 são oriundas de exsudato purulento, as 205 e 208 são oriundas de material urinário e as amostras 214 e 288 são oriundas de swab retal. As barras representam o desvio padrão de experimentos realizados em duplicata. ($p < 0,0001$)

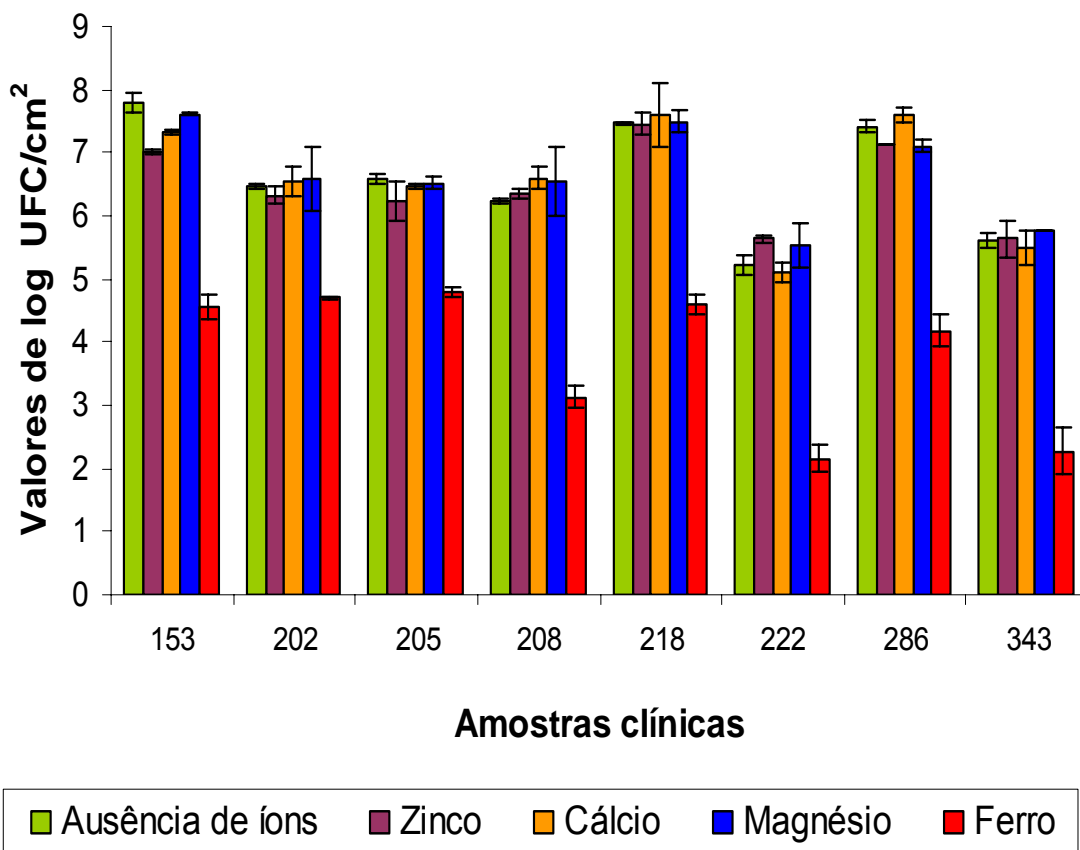


Figura 6 - Influência de cátions divalentes na formação de biofilme em superfície de vidro entre amostras representativas de *E. faecalis*. O eixo x representa as amostras isoladas de material clínico. As amostras 153, 286 e 343 são oriundas de exsudato purulento, as amostras 205, 208 e 222 são de material urinário e a amostra 218 é de swab retal. O eixo y representa o valor do log do número de células viáveis (UFC/cm²). De acordo com a capacidade de formar biofilme em vidro, as amostras 153, 286 e 218 foram classificadas como fortemente formadoras de biofilme, as amostras 202, 205 e 208 foram consideradas como moderadamente formadoras de biofilme e as amostras fracamente formadoras são representadas pelas amostras 222 e 343. As cores das colunas indicam os cátions divalentes. As barras representam o desvio padrão de experimentos realizados em duplicata. (Diferença mínima significativa = 1,7103)

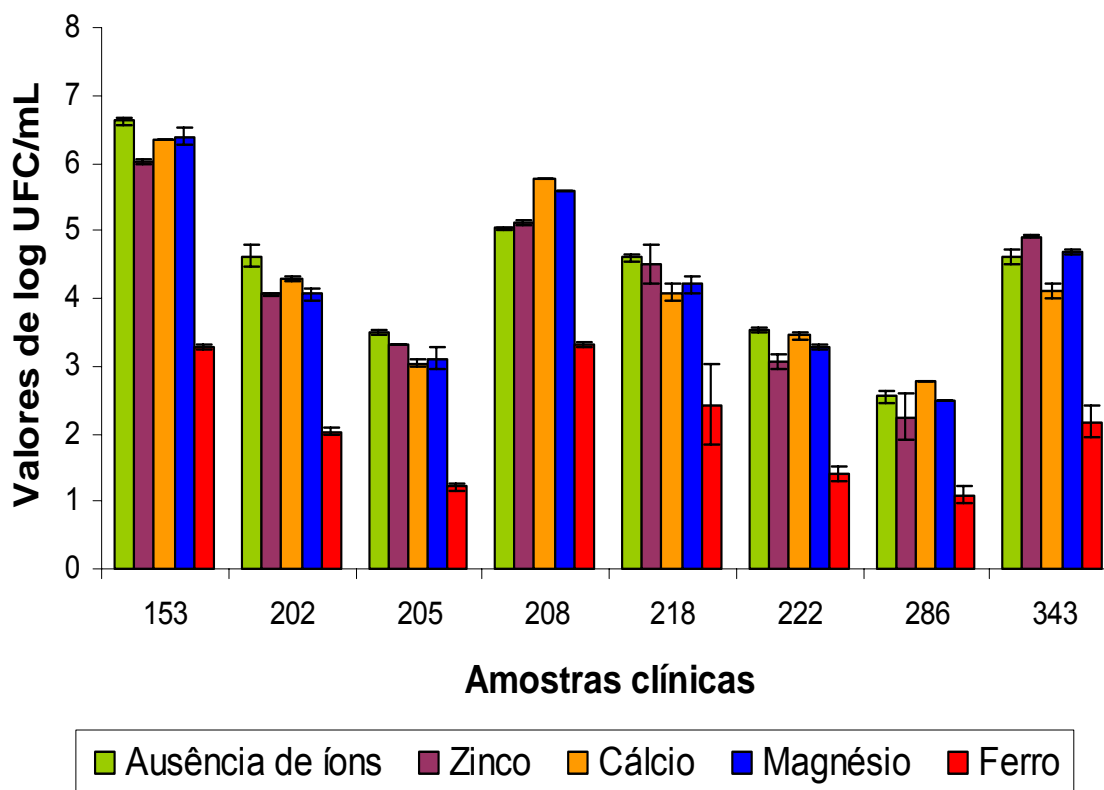


Figura 7 - Influência de cátions divalentes na formação de biofilme em poliestireno para amostras representativas de *E. faecalis*. O eixo x representa as amostras isoladas de material clínico. As amostras 153, 286 e 343 são oriundas de exsudato purulento, as amostras 205, 208 e 222 são de material urinário e a amostra 218 é de swab retal. O eixo y representa o valor do log do número de células viáveis (UFC/mL). De acordo com a capacidade de formar biofilme em poliestireno, as amostras 153 e 208 foram classificadas como fortemente formadoras de biofilme, as amostras 202, 218 e 343 foram consideradas como moderadamente formadoras de biofilme e as amostras fracamente formadoras são representadas pelas amostras 205, 222 e 286. As barras representam o desvio padrão de experimentos realizados em duplicata. (Diferença mínima significativa = 1,5101)

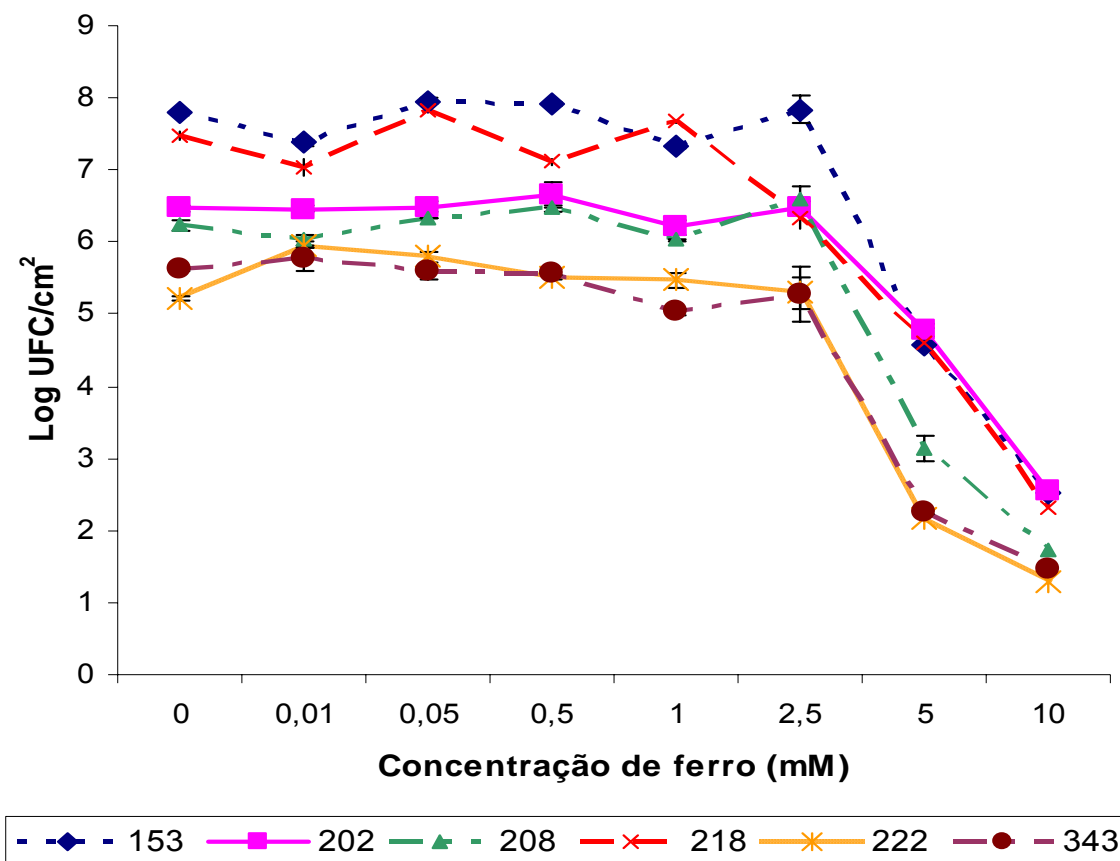


Figura 8 – Influência da concentração de íon Fe^{+2} na formação de biofilme em amostras representativas de *E. faecalis* aderidas à superfície de vidro. O eixo y representa o valor de log do número de células viáveis (UFC/cm^2) aderidas à lamínula de vidro, enquanto o eixo x representa as concentrações finais do referido cátion divalente. As amostras 202, 208 e 222 são oriundas de material urinário, 343 e 153 são amostras oriundas de exsudato purulento e a amostra 218 é proveniente de swab retal. De acordo com a capacidade de formar biofilme em vidro, as amostras 153 e 218 foram classificadas como fortemente formadoras de biofilme, as amostras 202 e 208 foram consideradas como moderadamente formadoras de biofilme e as amostras fracamente formadoras são representadas pelas amostras 222 e 343. As barras representam os desvios padrão de experimentos realizados em duplicata.

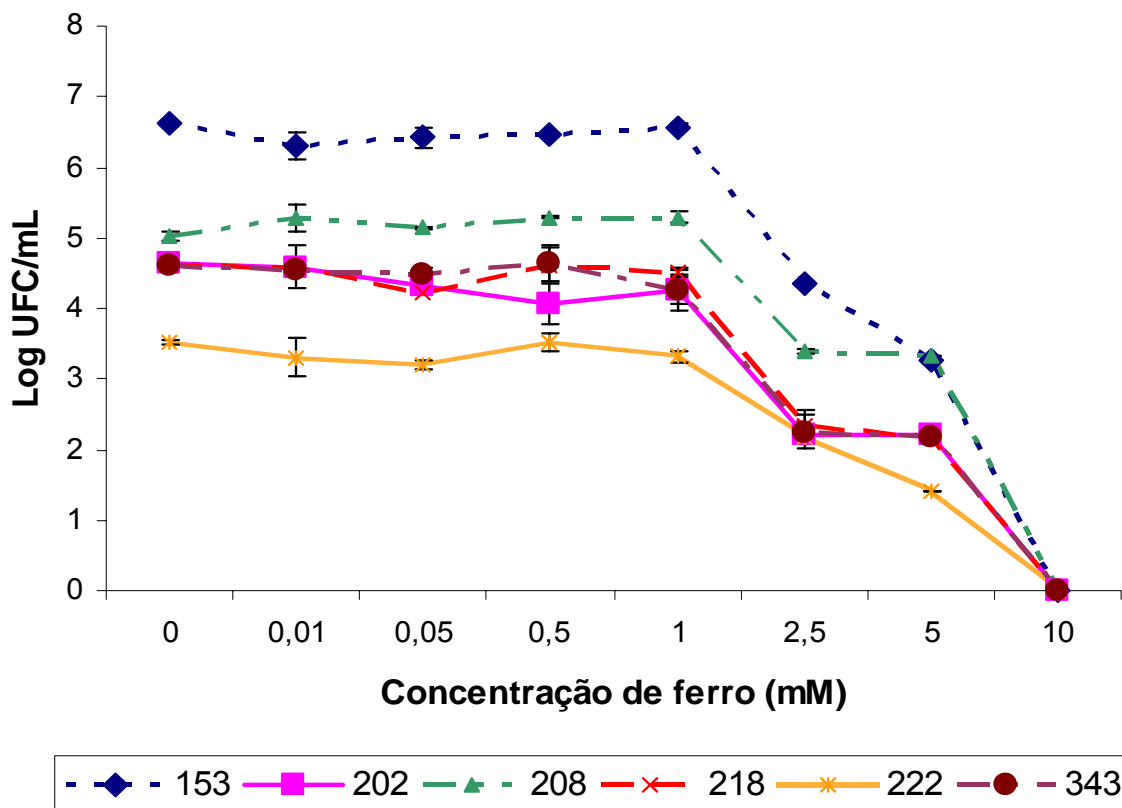


Figura 9 – Influência da concentração de íon Fe^{+2} na formação de biofilme em amostras representativas de *E. faecalis* aderidas à superfície de poliestireno. O eixo y apresenta o valor de log do número de células viáveis (UFC/mL), enquanto o eixo x representa as concentrações finais do referido cátion divalente. As amostras 202, 208 e 222 são oriundas de material urinário, 343 e 153 são amostras oriundas de exsudato purulento e a amostra 218 é proveniente de swab retal. De acordo com a capacidade de formar biofilme em poliestireno, as amostras 153 e 208 foram classificadas como fortemente formadoras de biofilme, as amostras 202, 218 e 343 foram consideradas como moderadamente formadoras de biofilme e as amostras fracamente formadoras estão representadas pela amostra 222. As barras representam os desvios padrão de experimentos realizados em duplicata.

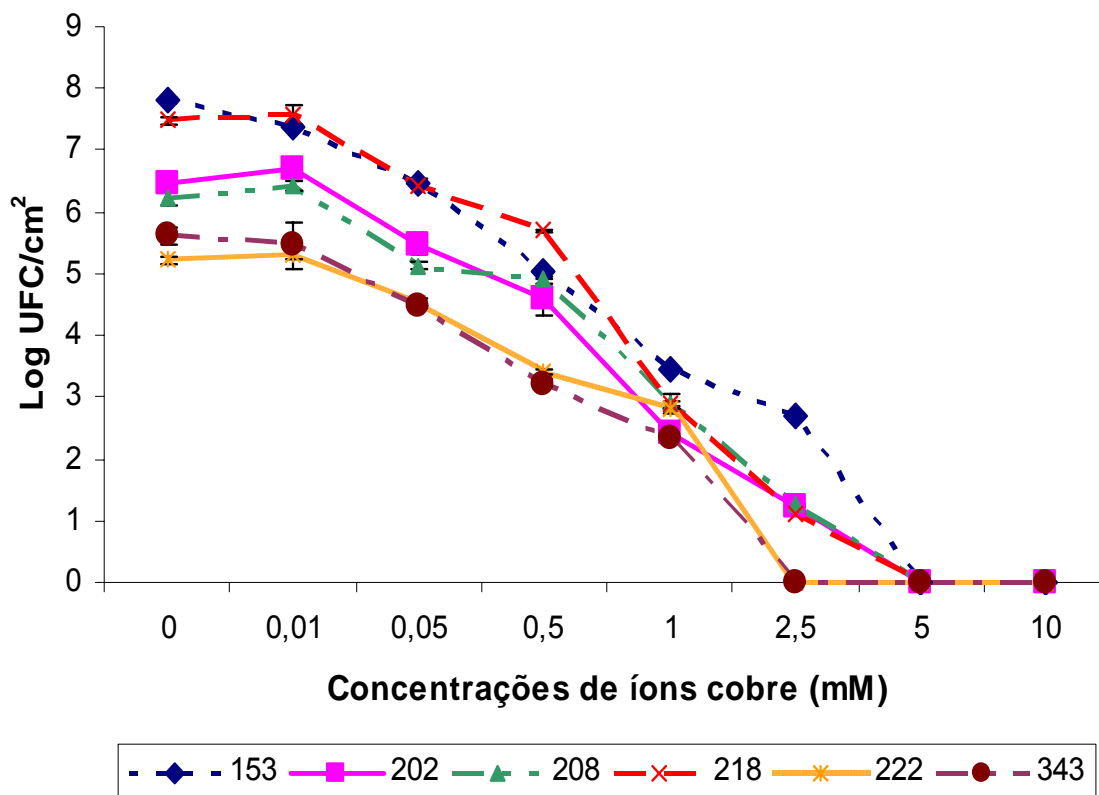


Figura 10 – Influência da concentração de íon Cu^{+2} na formação de biofilme em superfície de vidro em amostras representativas de *E. faecalis*. O eixo y apresenta o valor de log do número de células viáveis (UFC/cm^2) aderidas à lamínula de vidro, enquanto o eixo x representa as concentrações finais do referido cátion divalente. As amostras 202, 208 e 222 são oriundas de material urinário, 343 e 153 são amostras oriundas de exsudato purulento e a amostra 218 é proveniente de swab retal. De acordo com a capacidade de formar biofilme em vidro, as amostras 153 e 218 foram classificadas como fortemente formadoras de biofilme, as amostras 202 e 208 foram consideradas como moderadamente formadoras de biofilme e as amostras fracamente formadoras são representadas pelas amostras 222 e 343. As barras representam os desvios padrão de experimentos realizados em duplicata.

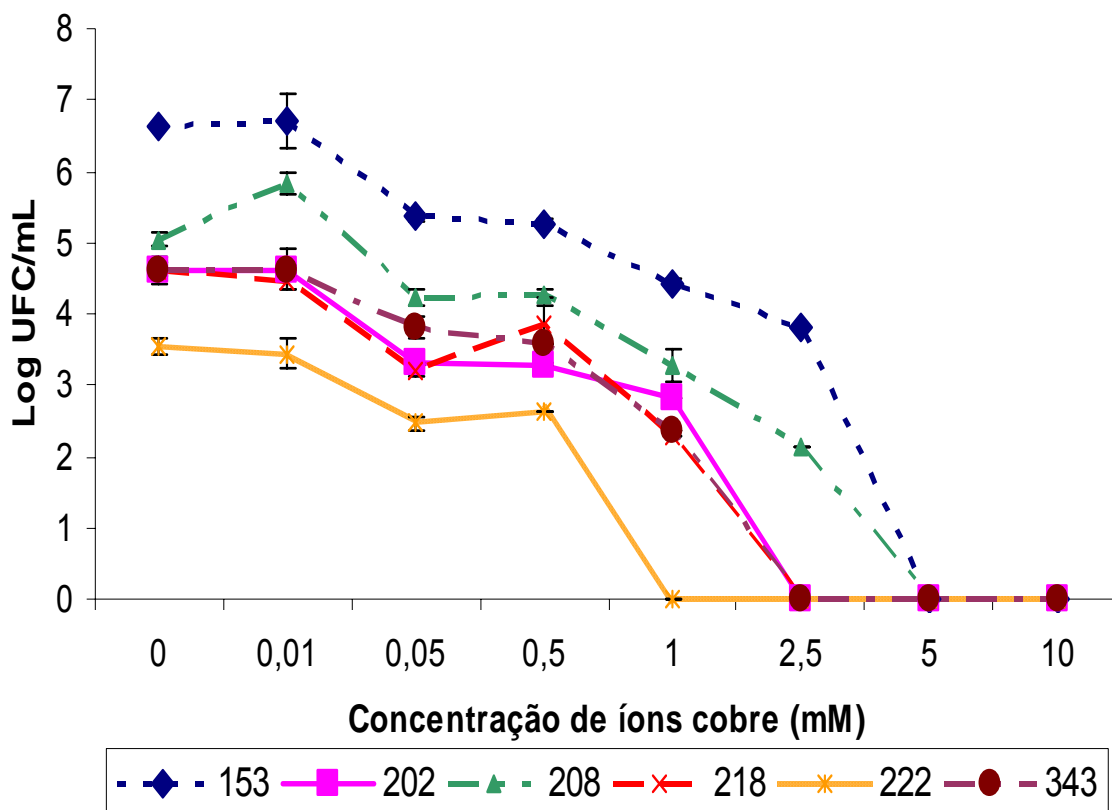


Figura 11 – Influência da concentração de íon Cu^{+2} na formação de biofilme em superfície de poliestireno em amostras representativas de *E. faecalis*. O eixo y apresenta o valor de log do número de células viáveis (UFC/mL), enquanto o eixo x representa as concentrações finais do referido cátion divalente. As amostras 202, 208 e 222 são oriundas de material urinário, 343 e 153 são amostras oriundas de exsudato purulento e a amostra 218 é proveniente de swab retal. De acordo com a capacidade de formar biofilme em poliestireno, as amostras 153 e 208 foram classificadas como fortemente formadoras de biofilme, as amostras 202, 218 e 343 foram consideradas como moderadamente formadoras de biofilme e as amostras fracamente formadoras estão representadas pela amostra 222. As barras representam os desvios padrão de experimentos realizados em duplicata.

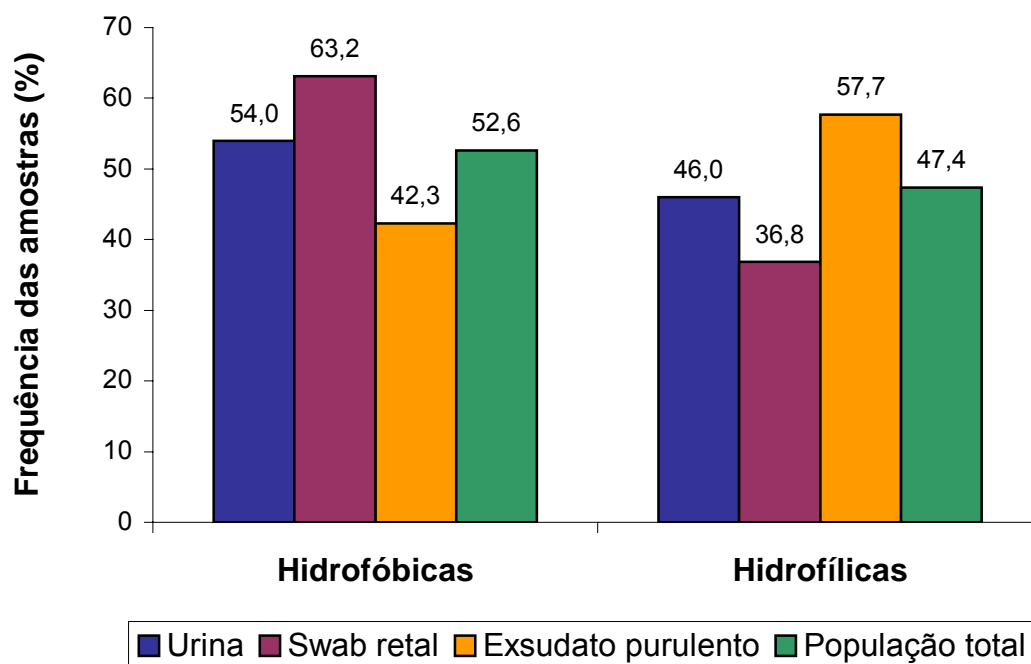


Figura 12 - Hidrofobicidade das amostras clínicas de *E. faecalis*. O eixo y representa a frequência de amostras hidrofóbicas ou hidrofílicas, enquanto o eixo x apresenta a natureza hidrofóbica ou hidrofílica da superfície celular das amostras clínicas. A cor de cada coluna representa o material clínico analisado. Os valores acima de cada coluna representam a frequência de amostras clínicas de *E. faecalis* segundo o grau de hidrofobicidade ($p < 0,0001$).

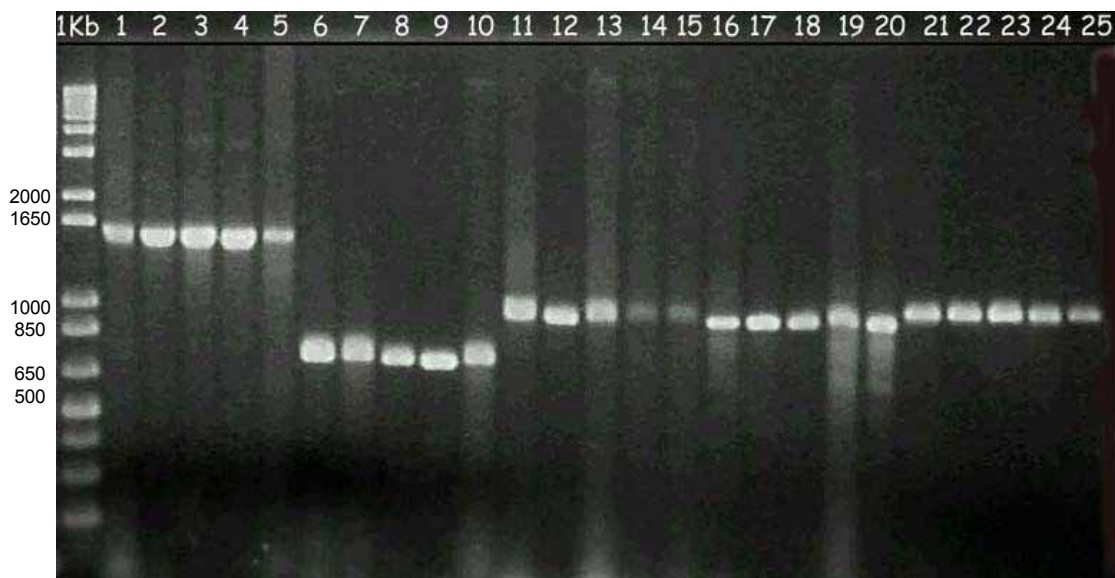


Figura 13 - Gel de agarose representativo contendo produtos de PCR de amostras clínicas de *E. faecalis*. A coluna marcada com 1Kb representa o marcador de peso molecular (1Kb Plus DNA Ladder - Gibco). As colunas de 1 a 5 representam as amostras *aggA*⁺ (153, 202, 210, 232 e 236, respectivamente). As colunas de 6 a 10 representam as amostras *efaA*⁺ (206, 211, 254, 255 e 270, respectivamente). As colunas de 11 a 15 representam as amostras *enlA*⁺ (200, 206, 221, 312 e 329, respectivamente). As colunas de 16 a 20 representam as amostras *esp*⁺ (288, 309, 316, 322 e 327, respectivamente). As colunas de 21 a 25 representam as amostras *gelE*⁺ (350, 357, 401, 404 e 447, respectivamente).

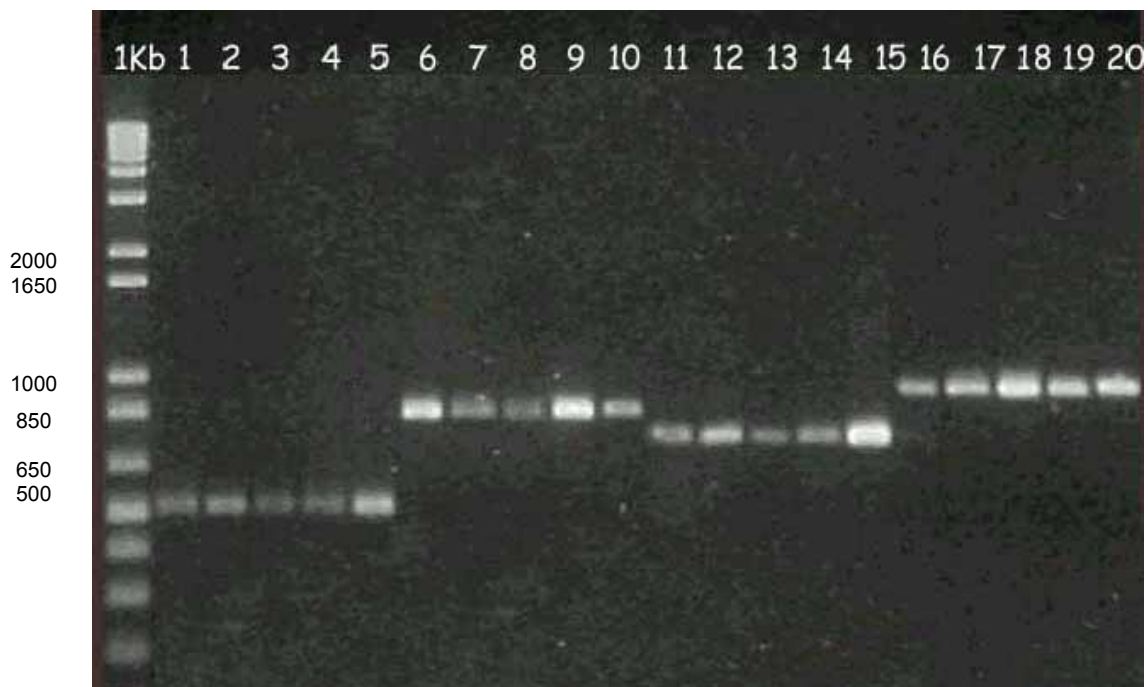


Figura 14 - Gel de agarose representativo contendo produtos de PCR de amostras clínicas de *E. faecalis*. A coluna 1Kb representa o marcador de peso molecular (1Kb Plus DNA Ladder - Gibco). As colunas de 1 a 5 representam as amostras *cyIA*⁺ (202, 207, 214, 232 e 278, respectivamente). As colunas de 6 a 10 representam as amostras *cyIB*⁺ (202, 207, 208, 232 e 272, respectivamente). As colunas de 11 a 15 representam as amostras *cyIM*⁺ (202, 207, 208, 210 e 211, respectivamente). As colunas de 16 a 20 representam as amostras *eep*⁺ (297, 299, 313, 315 e 378, respectivamente).

5 DISCUSSÃO

A formação de biofilme em uma superfície biótica ou não pode acarretar muitos danos, principalmente na área industrial e médica. Em relação à área médica, o grande problema resultado da formação de biofilme está relacionado com a implantação de instrumentos cirúrgicos, como sondas e cateteres. Estes são responsáveis pelo aumento no número de infecções recorrentes e de difícil tratamento. A adesão e a multiplicação dos microrganismos nestas superfícies facilitam o processo de formação de biofilme, conseqüentemente dificultando a antibioticoterapia. Neste estudo utilizou-se o poliestireno e o vidro para averiguar a formação de biofilme em amostras clínicas de *E. faecalis*, um microrganismo presente nos casos de reinfecções, principalmente hospitalares (MORRISON et al., 1997; FRANZ et al., 1999).

Poucos estudos têm relatado a formação de biofilme em amostras de *E. faecalis*. Toledo-Arana et al. (2001) e Sandoe et al. (2003) estudaram a formação de biofilme em amostras clínicas de enterococos em poliestireno. Foley e Gilbert (1997), utilizaram o PVC (cloreto de polivinil) como substrato para a amostra de *E. faecalis* JH2, enquanto que Bonner et al. (1997) analisou, para amostras de *E. faecalis* e *E. coli*, a formação de biofilme em poliuretano.

Nos ensaios quantitativos em vidro e em poliestireno para as amostras de *E. faecalis*, observou-se que estas se mostraram capazes de formar biofilme em ambos as superfícies abióticas, porém com comportamentos diferentes. A maior parte das amostras aderiu moderadamente ao vidro, que apresenta características de uma superfície altamente hidrofílica, enquanto que na superfície de poliestireno, a maioria apresentou um comportamento de aderir fracamente à superfície considerada de caráter hidrofóbico.

As amostras oriundas de exsudato purulento encontraram-se em menor freqüência no grupo das amostras moderadamente formadoras de biofilme, porém em maior freqüência nas amostras classificadas como fortemente formadoras. As amostras urinárias encontraram-se em maior prevalência no grupo das amostras classificadas como moderadamente formadoras. Enquanto que todas as amostras oriundas de swab retal apresentaram a capacidade de formar biofilme em vidro. Na análise da formação

de biofilme em poliestireno, a menor frequência para as amostras fracamente formadoras de biofilme é de amostras oriundas de swab retal, que foram mais frequentes no grupo das amostras não formadoras. As amostras urinárias estavam em maior frequência no grupo das amostras fracamente formadoras de biofilme, enquanto que as amostras de exsudato purulento foram prevalentes no grupo das moderadamente formadoras de biofilme. Não houve uma diferença significativa entre as origens das amostras e as superfícies abióticas analisadas, porém, quando se comparam estas superfícies, a diferença passa a ser significativa, independentemente da origem das amostras.

A diferença no comportamento das amostras quanto à adesão segundo a origem das mesmas e a superfície utilizada foi observada no estudo de Guzmán et al. (1989), que utilizou diferentes amostras de *E. faecalis*, oriundas de infecção do trato urinário ou de endocardite, e que estas aderem de maneira diferenciada dependendo da superfície utilizada. Essa diferença quanto à superfície usada foi observado no estudo de Faille et al. (2002), que utilizou *E. coli*, *B. cereus* e *B. subtilis* em diferentes materiais (vidro, poliamida, polietileno, PVC, Teflon® e ferro), relatando uma menor aderência ao vidro, pois durante o procedimento de descontaminação do material, as amostras aderidas ao vidro apresentaram-se menos resistentes a este processo.

No presente estudo foi encontrada uma grande frequência de amostras formadoras de biofilme, independentemente da classificação em fracas, moderadas e fortemente formadoras. Porém observou-se que o comportamento das amostras difere quanto ao material utilizado, onde houve uma maior aderência ao substrato hidrofílico (vidro) frente ao hidrofóbico (poliestireno), o que, em parte, pode ser explicado pelo resultado de hidrofobicidade. Além disso, todas as amostras oriundas de swab retal mostraram-se capazes de formar biofilme somente em vidro, podendo, mais uma vez, o comportamento estar relacionado a hidrofobicidade. Posteriormente, poderiam ser analisados outros materiais mais utilizados na prática médica, procurando observar esta diferença de comportamento frente à superfície utilizada.

Outros fatores, além da superfície, foram utilizados para caracterizar a formação de biofilme em amostras clínicas de *E. faecalis*. Um fator relacionado à formação de biofilme em superfícies abióticas é o tempo de cultivo utilizado no ensaio,

pois os microrganismos seguem algumas etapas até a completa formação do mesmo, como aproximação da superfície, adesão, formação do glicocálice, crescimento da população microbiana e maturação do biofilme (COSTERTON et al., 1987; MARSHALL, 1992; WATNICK e KOLTER, 2000; DUNNE Jr, 2002). Sendo que todas estas etapas requerem tempo para que o microrganismo possa realizá-las adequadamente. Conseqüentemente, a importância em se verificar a formação de biofilme nas diferentes fases da curva de crescimento.

No tempo utilizado no experimento de quantificação, correspondente ao final da fase logarítmica e início da estacionária (15h), é relatado na literatura uma maior formação de biofilme, pois é na fase estacionária que se inicia a limitação de nutrientes, condição esta que propicia a formação de biofilme (DUNNE Jr, 2002; DONLAN e COSTERTON, 2002).

No ensaio que detectou a influência das fases da curva no número de células aderidas tanto na superfície de vidro quanto na de poliestireno, foi observado um aumento da camada de biofilme formada, a partir de 10 h de cultivo que se estendeu até 15 h. De 15 a 24 h, essa camada permaneceu inalterada e, posteriormente, reduziu independentemente do material e da origem da amostra utilizada. A influência do tempo de cultivo na formação de biofilme ou na aderência a superfícies foi encontrada em outros estudos (XIAO et al. 1998; PRATTEN et al., 2001; WAAR et al., 2002; BÉCHET e BLONDEAU, 2003; MARTINO et al., 2003; MULLIGAN et al., 2003) que a relacionaram com a diferença na expressão de adesinas ou ao mecanismo de *quorum sensing*. Sendo que essas adesinas podem interferir com a hidrofobicidade da superfície microbiana (SHEPARD e GILMORE, 2002), facilitando o processo de adesão.

O meio de cultivo, assim como elementos adicionados a ele podem conferir uma mudança na carga elétrica da superfície microbiana, interferindo com o processo de aproximação e adesão a superfícies e, conseqüentemente, a formação de biofilme (BOWDEN e LI, 1997; BRIANDET et al., 2001). Para avaliar esta hipótese, ainda não descrita para enterococos, verificou-se a influência de alguns cátions divalentes na formação de biofilme tanto em poliestireno quanto em vidro.

Observou-se que os íons ferro reduziram significativamente o número de células aderidas nas superfícies. Diferentemente, os íons cobre impediram a formação do biofilme, pois, na sua presença, não houve nenhuma aderência a ambas as superfícies. Essa ação inibitória deve-se, possivelmente, ao fato do cobre ser utilizado como agente antimicrobiano (MULLIGAN et al., 2003). Em relação aos outros íons analisados, como zinco, cálcio e magnésio, não foi observada nenhuma alteração significativa em relação ao número de células microbianas aderidas a ambas as superfícies.

A alteração na camada de biofilme formada mostrou-se dependente da concentração tanto de íons ferro quanto de íons cobre para ambos as superfícies. Entretanto, esse comportamento apresentou-se diferente quanto à classificação obtida pelas amostras, onde as fracamente formadoras sofrem uma redução com uma concentração de íons menor do que para as fortemente formadoras para as duas superfícies, sendo que essa diferença foi melhor observada em poliestireno.

O efeito redutor do cobre foi observado por Rogers et al. (1994) e Mulligan et al. (2003), onde este foi relatado para *Legionella pneumophila* e *Streptococcus sanguis*, respectivamente, sendo que, para o último, o efeito era dependente da concentração do íon utilizada. Quanto ao ferro, Briandet et al. (2001) observaram uma redução na formação de biofilme para microrganismos Gram positivos (*Staphylococcus sp.*, *Brevibacterium linens* e *Micrococcus sp.*), pois a sua presença alterava a superfície tanto microbiana quanto do substrato onde o biofilme seria formado. Outros íons futuramente poderão ser avaliados quanto à influência no processo de formação de biofilme, além disso, sabe-se que alguns íons podem exercer efeito na regulação gênica, e conseqüentemente interferir com o mecanismo de *quorum sensing* (LOW et al., 2003).

A hidrofobicidade é um fator essencial para o processo de adesão a componentes celulares ou mesmo a superfícies abióticas, pois interfere com as interações físico-químicas entre a superfície e o microrganismo, facilitando o processo de formação de biofilme (LJUNGH e WADSTRÖM, 1995; BUSSCHER e MEI, 1997; BOWDEN e LI, 1997; DOYLE, 2000; LAPPIN-SCOTT e BASS, 2001; BRIANDET et al., 2001; LI et al., 2003).

O resultado do ensaio de hidrofobicidade realizado em 15h, ou seja, no mesmo tempo de cultivo que o ensaio para a quantificação da camada de biofilme, mostrou que todas as amostras apresentaram-se hidrofílicas, o que poderia, em parte, explicar a maior formação na superfície de vidro. Porém, quando o experimento foi realizado em 8 h (fase exponencial), o resultado mostrou-se significativamente diferente, onde parte das amostras passou a apresentar-se hidrofóbica.

A proporção de amostras hidrofóbicas frente à classificação que as mesmas obtiveram quanto à formação de biofilme variou para ambos as superfícies, sendo que houve uma maior prevalência para as amostras moderadamente formadoras de biofilme em vidro. Enquanto que para a superfície de poliestireno, essa prevalência foi maior entre as amostras classificadas como fracamente formadoras de biofilme. Essa diferença quanto a hidrofobicidade pode ser explicada em parte por uma variação na expressão de determinadas adesinas, que conferem uma mudança na superfície microbiana.

A hipótese da alteração do grau de hidrofobicidade em função da variação na expressão gênica é sustentada por outros estudos que também sugerem que o meio utilizado para o ensaio possa influenciar (LJUNGH e WADSTRÖM, 1995; BONNER et al., 1997; BRIANDET et al., 2001; GALLARDO-MORENO et al., 2002; MARTINO et al., 2003; SANDOE et al., 2003), pois confere uma mudança na carga elétrica da superfície do microrganismo. Outros estudos (AKYAMA et al., 1998; LI et al., 2003) encontraram uma correlação positiva entre a formação de biofilme e a hidrofobicidade da superfície dos microrganismos utilizados, *S. aureus* e *C. albicans*, respectivamente.

O método de aglutinação em sulfato de amônio utilizado no estudo do grau de hidrofobicidade das amostras clínicas de *E. faecalis* indica uma possibilidade para tal diferença observada, pois este método apresenta resultados diferentes quando comparados a outros, como o teste de adesão a hidrocarbonetos (MATTOS-GUARALDI et al., 1999). Futuramente, neste caso, a influência do meio de cultivo na hidrofobicidade poderia ser avaliada, bem como averiguar em 15h a expressão de adesinas na superfície da célula microbiana e a sua interferência com a hidrofobicidade das amostras microbianas.

O mecanismo de *quorum sensing* é descrito como outro fator importante no processo de maturação do biofilme, pois é responsável pelo controle da densidade populacional dentro da comunidade microbiana existente no biofilme através da regulação da expressão gênica (KIEVIT e IGLEWSKI, 2000; LAZAZZERA, 2001; REDFIELD, 2002). Em relação à detecção deste fenômeno, o mesmo não foi observado durante a realização do experimento, possivelmente porque possa ser dependente do pH do meio, tempo de incubação e, principalmente, do tempo de cultivo, como observado no estudo de Byers et al. (2002). Neste estudo, realizado com amostras de *Erwinia carotovora*, mostra que a molécula de N-(3-oxo-hexanoil)-L-homoserina lactona (OHHL) tem sua síntese aumentada durante a fase exponencial da curva e que, quando sintetizada, a estabilidade da mesma é sensível a variações de pH e de temperatura. Para corroborar esta hipótese, são necessários testes para avaliar a influência de fatores, tais como tempo, pH, meio de cultivo, temperaturas e expressão de adesinas no mecanismo de *quorum sensing*.

Existe uma relação entre a expressão de adesinas, hidrofobicidade, mecanismo de *quorum sensing* e a formação de biofilme. Porém, em enterococos, esta relação ainda não está muito bem esclarecida, assim como a participação destes fatores no processo de patogenicidade. Existem apenas estudos relacionando a participação de fatores de virulência com o processo de patogenicidade enterocócica (LIBERTIN et al., 1992; JETT et al., 1998; SCHLIEVERT et al., 1998; COBURN et al., 1999; RAKITA et al., 1999; WELLS et al., 2000; ISENMANN et al., 2000; SARTINGEN et al., 2000; SÜBMUTH et al., 2000; ROZDZINSKI et al., 2001; SHANKAR et al., 2001; SHANKAR et al., 2002; VERGIS et al., 2002) e outros relatando a frequência destes determinantes em amostras de enterococos, principalmente em *E. faecalis* e *E. faecium* (COQUE et al., 1995; HUYCKE e GILMORE, 1995; ELSNER et al., 2000; EATON e GASSON, 2001; FRANZ et al., 2001; ARCHIMBAUD et al., 2002; WAAR et al., 2002; HAMMERUM e JENSEN, 2002; COQUE et al., 2002; DUPRÈ et al., 2003; SEMEDO et al., 2003; CRETI et al., 2004). Neste ensaio procurou-se averiguar a possível correlação de determinantes de virulência no processo de formação de biofilme em ambas as superfícies, bem como a frequência dos mesmos. Foram utilizados nove determinantes descritos na literatura (*cyIMBA*, *gelE*, *esp*, *eep*, *efaA*, *aggA*, *enIA*) para o ensaio de

reação em cadeia da DNA polimerase (PCR), sendo este estudo o primeiro a ser realizado no Brasil.

Os genes *cyIMBA* estão relacionados com a produção de uma citolisina, um dos fatores mais estudados, onde a sua presença está associada a infecções em modelo animal, pois pode lisar eritrócitos, macrófagos e neutrófilos polimorfonucleares (GILMORE et al., 1994; HASS e GILMORE, 1999; SEMEDO et al., 2003). Segundo os resultados obtidos, a frequência dos genes *cyIMBA* foi baixa se comparada com os outros genes e com os dados de outros estudos que relatam uma frequência de 50-60% (HUYCKE e GILMORE, 1995; EATON e GASSON, 2001; ARCHIMBAUD et al., 2002; SEMEDO et al., 2003; CRETÍ et al., 2004). Essa alta frequência é observada em experimentos com um grande número de amostras, de origens e espécies distintas. Archimbaud et al. (2002) mostrou uma frequência de positividade de citolisinas semelhante à encontrada neste estudo.

Quanto à origem das amostras que albergam tais genes, todos os três apresentaram-se praticamente presentes somente em amostras urinárias, podendo de certa forma contribuir para o aparecimento de infecções urinárias devido à capacidade citolítica desta toxina. Porém, segundo a análise estatística, não houve correlação entre a presença de *cyIA* e a origem das amostras, diferentemente dos genes *cyIMB* que apresentaram uma correlação significativa ($p < 0,05$) com as amostras oriundas de material urinário. Semedo et al. (2003) também encontrou uma associação entre a presença dos genes *cyI* e a origem das amostras clínicas de enterococos. De acordo com este mesmo estudo, a maior frequência dos genes constituintes do operon está relacionada com a presença de *cyIMBA*, sendo que a detecção dos três genes é a associação mais frequente entre as amostras clínicas.

A participação da substância de agregação no processo invasivo da mucosa colônica ocorre através do aumento da aderência e da internalização de enterococos nas células epiteliais intestinais, além disso, a presença desta proteína também está relacionada com a adesão a células tubulares renais e ao aparecimento de endocardite em modelo animal (SCHLIEVART et al., 1998; ISENMANN et al., 2000; SARTINGEN et al., 2000). A aderência a macrófagos e leucócitos polimorfonucleares

tem a capacidade de facilitar o processo de translocação e evasão do sistema imune (VANEK et al., 1999; RAKITA et al., 1999; SÜBMUTH et al., 2000).

Neste estudo, a frequência encontrada de amostras que albergaram o gene *aggA* foi relativamente baixa se comparada a outros estudos que utilizam um maior número de amostras, de espécies e origens diferentes, além de diferentes substâncias de agregação, já que estas podem ser codificadas por uma variedade de plasmídeos e que recebem denominações diferentes de acordo com o plasmídeo que a codificou (COQUE et al., 1995; HUYCKE e GILMORE, 1995; ELSNER et al., 2000; EATON e GASSON, 2001; FRANZ et al., 2001; ARCHIMBAUD et al., 2002; WAAR et al., 2002; DUPRÈ et al., 2003; SEMEDO et al., 2003; CRETÍ et al., 2004). Duprè et al. (2003), encontrou que 33,3% das amostras clínicas de *E. faecalis* albergaram genes que codificam para a substância de agregação, sendo este resultado semelhante ao encontrado neste estudo.

A frequência de *eep*, que codifica para uma metaloprotease com a função de processamento de feromônio cAD1 (AN et al., 1999; LAZAZZERA, 2001), apresentou-se uma das mais altas deste estudo, porém não existem outros estudos que relatam a prevalência deste gene em enterococos.

O gene *gelE* codifica para uma metaloendopeptidase com capacidade hidrolítica para gelatina, colágeno, caseína, hemoglobina e outros pequenos peptídeos, sendo que sua atividade também aparece relacionada a processos inflamatórios (JETT et al., 1994; FRANZ et al., 1999; ELSNER et al., 2000). A frequência de amostras que albergam o gene *gelE*, em relação a outros estudos (COQUE et al., 1995; ELSNER et al., 2000; EATON e GASSON, 2001; FRANZ et al., 2001; ARCHIMBAUD et al., 2002; VERGIS et al., 2002; WAAR et al., 2002; DUPRÈ et al., 2003; SEMEDO et al., 2003; CRETÍ et al., 2004), mostrou-se divergente, pois a grande parte destes são realizados para a detecção fenotípica de gelatinase, onde a prevalência é menor, já que este gene muitas vezes pode apresentar-se silencioso em estudos fenotípicos. A frequência obtida no estudo de Franz et al. (2001), onde 48,9% das amostras de *E. faecalis* oriundas de alimento apresentavam tal gene, foi semelhante à encontrada para as amostras clínicas deste estudo, porém as origens das amostras são diferentes.

Neste estudo a frequência encontrada do gene *enlA* que codifica para uma bacteriocina foi baixa (9,5%) se comparada aos outros determinantes analisados, contudo não existem outros estudos no Brasil reportando a prevalência deste gene em enterococos.

O gene *esp* é responsável pela expressão de uma proteína que auxilia no processo de evasão do sistema imune pelo alto grau de variantes protéicas e também está relacionado com o aparecimento de infecções urinárias (SHANKAR et al., 2001). A frequência de tal gene foi semelhante à encontrada para amostras clínicas de *E. faecalis* no estudo realizado por Duprè et al. (2003), 60,0%. Em outros estudos, (SHANKAR et al., 1999; FRANZ et al., 2001; EATON e GASSON, 2001; TOLEDO-ARANA et al., 2001; WAAR et al., 2002; ARCHIMBAUD et al., 2002; HAMMERUM e JENSEN, 2002; COQUE et al., 2002; DUPRÈ et al., 2003; SEMEDO et al., 2003; CRETI et al., 2004) as frequências apresentam-se variáveis, pois são utilizadas espécies de *E. faecium* onde foi relatada a presença de clones deste gene, o que não estaria sendo detectada neste estudo, explicando em parte a frequência relativamente baixa (COQUE et al., 2002).

O gene *efaA* codifica para o componente lipoprotéico de um transportador de membrana responsável pelo fluxo de manganês na célula (LOW et al., 2003). A frequência do gene encontrada neste estudo foi baixa frente aos resultados de outros estudos (EATON e GASSON, 2001; SEMEDO et al., 2003; DUPRÈ et al., 2003; CRETI et al., 2004), onde a prevalência é de aproximadamente 80,0%. Esta alta distribuição pode estar atribuída à uma variedade no número de espécies utilizadas nestes estudos, principalmente de *E. faecalis* e *E. faecium*, onde, nesta espécie, já foi detectada uma variante da proteína (*efaA_{fm}*) (SINGH et al., 1998).

Quanto à quantidade de determinantes detectados por amostras, houve uma maior prevalência para a associação de 2 ou 3 genes, onde os perfis gênicos mais frequentes foram *efaA⁺, esp⁺*; *esp⁺, eep⁺*; *efaA⁺, gelE⁺* e *efaA⁺, esp⁺, gelE⁺*, respectivamente. No presente estudo, nenhuma das amostras albergou todos os nove determinantes analisados, assim como no estudo realizado por Waar et al. (2002). A presença de mais de um determinante também foi encontrada por Coque et al. (1995), onde cerca de 70% das amostras analisadas albergaram mais de um gene. Contudo,

na análise estatística, não foi encontrada nenhuma correlação entre a quantidade de determinantes analisados e a origem das amostras.

Verificou-se, porém, que houve uma associação entre alguns destes determinantes analisados e a formação de biofilme em vidro e em poliestireno. Em relação ao vidro, houve uma associação significativa entre as amostras moderadamente formadoras de biofilme e a presença dos genes *cylMA*, *enlA*, *efaA*, *esp*, *aggA*, *gelE* e *eep* ($p < 0,05$). Para o poliestireno, a associação foi significativa entre as amostras fracamente formadoras de biofilme e os genes *cylA*, *efaA*, *esp*, *aggA* e *eep* ($p < 0,05$). Nota-se que a presença somente de um gene não está associada com a formação de biofilme em superfícies abióticas como foi observado por Toledo-Arana et al. (2001).

Todos os genes apresentaram uma grande diversidade quanto à distribuição pelas diferentes amostras clínicas e alguns destes, uma associação com a formação de biofilme. Contudo essa formação mostrou-se influenciada também por outros fatores, como a concentração de cátions divalentes, as diferentes fases da curva de crescimento e a hidrofobicidade da superfície microbiana. Seria necessário avaliar a expressão destes genes, frente à presença de íons que podem estar relacionados com a regulação gênica (LOW et al., 2003). Sendo que a expressão destes determinantes poderia estar associada ao processo de formação de biofilme, seja influenciando no mecanismo de *quorum sensing* ou na hidrofobicidade da superfície celular e, conseqüentemente, no tempo de maturação deste biofilme. Estudos posteriores devem ser realizados também para avaliar a importância desta variabilidade de determinantes no processo de patogenicidade causada por esta espécie de microrganismo.

Enfim, os dados obtidos neste estudo abrem novos rumos para a pesquisa de fatores que possam interferir na formação de biofilme que, uma vez descobertos, poderão ser utilizados na prevenção de infecções nosocomiais por este microrganismo, na redução de casos de infecções reincidentes resultantes de instrumentação cirúrgica ou mesmo na avaliação da antibioticoterapia.

6 CONCLUSÕES

1. As amostras clínicas de *E. faecalis* apresentam comportamentos diferentes com relação ao material utilizado para o ensaio de quantificação de biofilme, onde há uma maior aderência das amostras clínicas de *E. faecalis* ao vidro em relação ao poliestireno.
2. As diferentes fases da curva influenciam na formação de biofilme em ambas as superfícies, sendo que há uma maior formação no início da fase estacionária (15h).
3. A formação de biofilme também é influenciada pela presença de íons, como o ferro e o cobre, sendo que este último é responsável por inibir completamente a formação de biofilme em ambas as superfícies analisadas.
4. A influência exercida para ambos os íons ferro e cobre na camada de biofilme formada nas duas superfícies é dependente da concentração destes no meio de cultura.
5. A hidrofobicidade da superfície microbiana é influenciada pelo tempo de cultivo, sendo que, em 8 h (fase exponencial), há uma alteração significativa desta característica, onde as amostras hidrofóbicas encontram-se em maior frequência.
6. O mecanismo de *quorum sensing* não é observado no tempo de 15 h (fase estacionária) utilizado durante a realização do experimento.
7. Há uma ampla distribuição dos determinantes de virulência entre as amostras clínicas de *E. faecalis*, sendo as maiores frequências observadas para os genes *efaA* e *eep*, seguidos por *esp*.
8. Os genes *cyIMB* estão associados com as amostras urinárias, porém não há correlação entre os outros genes analisados e a origem das amostras.

9. A maioria das amostras clínicas alberga de 2 a 3 genes, sendo que a associação destes genes apresenta-se diferente em relação as 95 amostras, porém sem nenhuma associação com a origem das mesmas.

10. Nenhuma das amostras clínicas alberga os nove determinantes analisados (*cyIMBA*, *enIA*, *efaA*, *esp*, *eep*, *aggA* e *gelE*), porém apenas uma amostra, oriunda de material urinário, alberga 8 dos 9 genes de virulência.

11. Existe uma associação significativa entre formação de biofilme em ambas as superfícies analisadas e alguns dos determinantes pesquisados, como *cyIMA*, *enIA*, *efaA*, *esp*, *aggA*, *gelE* e *eep*.

REFERÊNCIAS

AKYAMA, H. et al. Adherence characteristics of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from various skin lesions. **Journal of Dermatological Science**, n. 18, p.132-136, 1998.

AN, Florence Y.; SULAVIK, Mark C.; CLEWELL, Don B. Identification and characterization of a determinant (*eep*) on the *Enterococcus faecalis* chromosome that is involved in production of the peptide sex pheromone cAD1. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 19, p. 5915-5921, oct. 1999.

ARCHIMBAUD, Christine et al. In vitro adhesive properties and virulence factors of *Enterococcus faecalis* strains. **Research in Microbiology**, v. 153, p. 75-80, 2002.

BÉCHET, M., BLONDEAU, R. Factors associated with the adherence and biofilm formation by *Aeromonas caviae* on glass surfaces. **Journal of Applied Microbiology**, n. 94, p. 1072-1078, 2003.

BONNER, M.C. et al. Factors affecting in vitro adherence of ureteral stent biofilm isolates to polyurethane. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 151, p. 201-207, 1997.

BOWDEN, G.H.W.; LI, Y.H. Nutritional influences on biofilm development. **Advances in Dental Research**, v. 11, n. 1, p. 81-99, apr. 1997.

BRIANDET, R., HERRY, J. M., BELLON-FONTAINE, M. N. 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**, n. 21, p. 299-310, 2001.

BUSSCHER, H. J.; MEI, H. C. van der. Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. **Advances in Dental Research**, v. 11, n. 1, p. 24-32, apr. 1997.

BYERS, Joseph T. et al. Nonenzymatic turnover of an *Erwinia carotovora* quorum-sensing signaling molecule. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 4, p. 1163-1171, feb. 2002.

CLOETE, T.E. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, p. 277-282, 2003.

COBURN, Phillip S. et al. A novel means of self-protection, unrelated to toxin activation, confers immunity to the bactericidal effects of the *Enterococcus faecalis* cytolyisin. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 7, p. 3339-3347, jul. 1999.

COQUE, Teresa M. et al. High occurrence of *esp* among ampicillin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus faecium* clones from hospitalized patients. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, p. 1035-1038, 2002.

COQUE, Teresa M. et al. Incidence of hemolysin, gelatinase and aggregation substance among enterococci isolated from patients with endocarditis and other infections and from feces of hospitalized and community-based persons. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 171, p. 1223-1229, 1995.

COSTERTON, J. William et al. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Review of Microbiology**, v. 41, p. 435-464, 1987.

CRETI, R. et al. Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, p.13-20, 2004.

CHRISTENSEN, G.D. et al. Adherence of slime –producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. **Infection and Immunity**, v. 37, p. 318-326, 1982.

DAVEY, Mary Ellen; O'TOOLE, George, A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 847-867, dec. 2000.

DENNESEN, P. J.; BONTEN, M. J.; WEINSTEIN, R. A. Multiresistant bacteria as a hospital epidemic problem. **Ann. Med.**, v. 30, p.176-185, 1998.

DEVRIESE, L. A. et al. Enterococcal and streptococcal species isolated from faeces of calves, young cattle and dairy cows. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 72, p. 29-31, 1992.

DONLAN, Rodney M.; COSTERTON, J. William. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, apr. 2002.

DOYLE, Ron J. Contribution of the hydrophobic effect to microbial infection. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 391-400, 2000.

DUNNE, W. Michael Jr. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 155-166, apr. 2002.

DUNNY, Gary M.; LEONARD, Bettina A. B.; HEDBERG, Peter J. Pheromone-inducible conjugation in *Enterococcus faecalis*: interbacterial and host-parasite chemical communication. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 4, p. 871-876, feb. 1995.

DUPONT, H. et al. Disparate findings on the role of virulence factors of *Enterococcus faecalis* in mouse and rat models of peritonitis. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 6, p. 2570-2575, jun.1998.

DUPRÈ, I. et al. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, p. 491-498, 2003.

EATON, Tracy J.; GASSON, Michael J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 1628-1635, apr. 2001.

ELSNER, H.A. et al. Virulence factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* blood culture isolates. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 19, p. 39-42, 2000.

FACKLAM, R. R.; COLLINS, M. D. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by conventional test scheme. **Journal of Clinical Microbiology**, v.27, p. 731-734, 1989.

FAILLE, Christine et al. Adhesion of *Bacillus* spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces: role of surface hydrophobicity. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 728-738, 2002.

FOLEY, I.; GILBERT, P. In vitro studies of the activity of glycopeptide combinations against *Enterococcus faecalis* biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 40, p. 667-672, 1997.

FRANZ, Charles M.A.P. et al. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 9, p. 4385-4389, sep. 2001.

FRANZ, Charles M.A.P.; HOLZAPFEL, Wilhelm H.; STILES, Michael E. Enterococci at the crossroads of food safety? **International Journal of Food Microbiology**, v. 47, p. 1-24, 1999.

GALLARDO-MORENO, Amparo M. et al. Adhesion of *Enterococcus faecalis* 1131 grown under subinhibitory concentrations of ampicillin and vancomycin to a hydrophilic and a hydrophobic substratum. **FEMS Microbiology Letters**, v. 203, p. 75-79, 2001.

GALLARDO-MORENO, Amparo M. et al. Serum as a factor influencing adhesion of *Enterococcus faecalis* to glass and silicone. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 11, p. 5784-5787, nov. 2002.

GALLI, D.; LOTTSPREICH, F.; WIRTH, R. Sequence analysis of *Enterococcus faecalis* aggregation substance encoded by the sex pheromone plasmid pAD1. **Molecular Microbiology**, v. 4, n. 7, p. 895-904, 1990.

GHIGO, Jean-Marc. Are there biofilm-specific physiological pathways beyond a reasonable doubt? **Research in Microbiology**, v. 154, p. 1-8, 2003.

GIACOMETTI, A. et al. Epidemiology and microbiology of surgical wound infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 918-922, feb. 2000.

GIARD, J.C. et al. Glucose starvation response in *Enterococcus faecalis* JH2-2: survival and protein analysis. **Research in Microbiology** v. 148, p. 27-35, 1997.

GILBERT, P.; ALLISON, D. G.; McBAIN, A. J. Biofilms *in vitro* and *in vivo*: do singular mechanisms imply cross-resistance? **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, v. 92, p. 98S-110S, 2002.

GILMORE, Michael S. et al. Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolitic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 23, p. 7335-7344, dec. 1994.

GIRAFFA, Giorgio. Enterococci from foods. **FEMS Microbiology Reviews**, 26, p. 163-171, 2002.

GRAM, Lone et al. Possible quorum sensing in marine snow bacteria: production of acylated homoserine lactones by *Roseobacter* strains isolated from marine snow. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 8, p. 4111-4116, aug. 2002.

GUZMÁN, Carlos et al. Role of adherence in pathogenesis of *Enterococcus faecalis* urinary tract infection and endocarditis. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 6, p. 1834-1838, jun. 1989.

HABASH, Marc; REID, Gregor. Microbial biofilms: their development and significance for medical device-related infections. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 39, p. 887-898, 1999.

HAMMERUM, Anette Marie; JENSEN, Lars Bogs. Prevalence of *esp*, encoding the enterococcal surface protein, in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from hospital patients, poultry, and pigs in Denmark. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 11, p. 4396, nov. 2002

HASS, Wolfgang; GILMORE, Michael S. Molecular nature of a novel bacterial toxin: the cytolysin of *Enterococcus faecalis*. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 187, p. 183-190, 1999.

HASS, Wolfgang; SHEPARD, Brett D.; GILMORE, Michael S. Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction. **Nature**, v. 415, p. 84-87, jan. 2002.

HICKEY, Rita M. et al. Production of enterolysin A by a raw milk enterococcal isolate exhibiting multiple virulence factors. **Microbiology**, v. 149, p. 655-664, 2003.

HIGAKI, S.; MOROHASHI, M.; YAMAGISHI, T. Isolation of *Enterococcus* species from infectious skin lesions. **Drugs Exp. Clin. Res.**, v. 28, p.91-93, 2002.

HOOTON, T. M.; STAMM, W. E. Diagnosis and treatment of uncomplicated urinary tract infection. **Infect. Dis. North Am.**, v. 11, p. 551-581, 1997.

HUBBLE, T. S. et al. Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 18, p. 121-126, 2003

HUYCKE, M. M.; SAHM, D. F.; GILMORE, M. S. Multi-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 4, p.239-249, 1998.

HUYCKE, Mark M.; GILMORE, Michael S. Frequency of aggregation substance and cytolysin genes among enterococcal endocarditis isolates. **Plasmid**, v. 34, p. 152-156, 1995.

IKE, Y. et al. Genetic analysis of the pAD1 hemolysin/bacteriocin determinant in *Enterococcus faecalis*: insertional mutagenesis and cloning. **Journal of Bacteriology**, v. 172, p.155-163, 1990.

ISENMANN, R. et al. Aggregation substance promotes colonic mucosal invasion of *Enterococcus faecalis* in an *ex vivo* model. **Journal of Surgical Research**, v. 89, p. 132-138, 2000.

JETT, Bradley D.; ATKURI, Rajeshwari V.; GILMORE, Michael S. *Enterococcus faecalis* localization in experimental endophthalmitis: role of plasmid-encoded aggregation substance. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 2, p. 843-848, feb. 1998.

JETT, Bradley D.; HUYCKE, Mark M.; GILMORE, Michael S. Virulence of enterococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, n. 4, p. 462-478, oct. 1994.

JOHNSON, Alan P. The pathogenicity of enterococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 33, p. 1083-1089, 1994.

JONES, R. N. et al. Nosocomial enterococcal bloodstream infections in the SCOPE program: antimicrobial resistance, species occurrence, molecular testing results and laboratory testing accuracy. SCOPE Hospital Study Group. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 29, p. 195-102, 1997.

KIEVIT, Teresa R. de; IGLEWSKI, Barbara H. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationship. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 9, p. 4839-4849, sep. 2000.

KÜHN, I. et al. Epidemiology and ecology of enterococci, with special reference to antibiotic resistant strains, in animals, humans and the environment. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 14, p. 337-342, 2000.

LANDMAN, D.; QUALE, J. M. Management of infections due to resistant enterococci: a review of therapeutic options. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 40, p.161-170, 1997.

LAPPIN-SCOTT, Hilary M.; BASS, Catherine. Biofilm formation: attachment, growth and detachment of microbes from surfaces. **American Journal of Infection Control**, v. 29, p. 250-251, 2001.

LAUTENBACH, E.; BILKER, W. B.; BRENNAN, P. J. Enterococcal bacteremia: risk factors for vancomycin resistance and predictors of mortality. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v. 20, p.318–323, 1999.

LAZAZZERA, Beth. Quorum sensing and starvation: signals for entry into stationary phase. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, p. 177-182, 2000.

LAZAZZERA, Beth. The intracellular function of extracellular signaling peptides. **Peptides**, v. 22, p. 1519-1527, 2001.

LEROY, Frédéric; VUYST, Lue De. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* RZS C5 is cell density limited and occurs in the very early growth phase. **International Journal of Food Microbiology**, v. 72, p. 155-164, 2002.

LI, Xiaogang, YAN, Zhun, XU, Jianping. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 149, p. 353-362, 2003.

LIBERTIN, Claudia R.; DUMITRU, Rodica; STEIN, Daniel S. The hemolysin/bacteriocin produced by enterococci is a marker of pathogenicity. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 15, p. 115-120, 1992.

LJUNGH, Asa; WADSTRÖM, Torkel. Growth conditions influence expression of cell surface hydrophobicity of Staphylococci and other wound infection pathogens. **Microbiology and Immunology** v. 39, n. 10, p. 753-757, 1995.

LOW, Yuen L. et al. Manganese-dependent regulation of the endocarditis-associated virulence factor EfaA of *Enterococcus faecalis*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, p. 113-119, 2003.

LOWE, A. M.; LAMBERT, P. A.; SMITH, A. W. Cloning of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen: homology with adhesins from some oral streptococci. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 2, p. 703-706, feb. 1995.

MAKI, D. G.; AGGER, W. A. Enterococcal bacteremia: clinical features, the risk of endocarditis and management. **Medicine**, v. 67, p. 248-269, 1988.

MARSHALL, Kevin C. Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity and control at surfaces. **Features**, v. 58, n. 4, p. 202-207, 1992.

MARTINO, Patrick D. et al. *Klebsiella pneumoniae* type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. **Research in Microbiology**, n.154, p. 9-16, 2003.

MATTOS-GUARALDI, Ana Luiza; FORMIGA, Luiz Carlos Duarte; ANDRADE, Arnaldo Feitosa Braga. Cell surface hydrophobicity of sucrose fermenting and nonfermenting

Corynebacterium diphtheriae strains evaluated by different methods. **Current Microbiology**, v. 38, p. 37-42, 1999.

MOELLERING, R. C. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. **Clinical Infectious Diseases**, v. 14, p.1173-1178, 1992.

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

MULLER, T. et al. Identification of plant-associated enterococci. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 268-278, 2001.

MULLIGAN, A. M., WILSON, M., KNOWLES, J.C. The effect of increasing copper content in phosphate-based glasses on biofilms of *Streptococcus sanguis*. **Biomaterials**, n. 24, p. 1797-1807, 2003.

MURRAY, Barbara E. The life and times of the *Enterococcus*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, n. 1, p. 46-65, 1990.

MYLONAKIS, Eleftherios 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. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 8, p. 4678-4681, aug. 2002.

NAKAYAMA, Jiro et al. Gelatinase biosynthesis-activating pheromone: a peptide lactone that mediates a quorum sensing in *Enterococcus faecalis*. **Molecular Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 145-154, 2001.

NAKAYAMA, Jiro; KARIYAMA, Reiko; KUMON, Hiromi. 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. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 3152-3155, jun. 2002.

NALLAPAREDDY, Sreedhar R. et al. *Enterococcus faecalis* adhesin, Ace, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 9, p. 5218-5224, sep. 2000.

NALLAPAREDDY, Sreedhar R. et al. Diversity of *ace*, a gene encoding a microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules, from different strains of *Enterococcus faecalis* and evidence for production of Ace during human infections. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 9, p. 5210-5217, sep. 2000.

NEDER, Rahme Nelly. **Microbiologia**: manual de laboratório. São Paulo: Nobel, 1992. 138p.

NILSEN, Trine; NES, Ingolf F.; HOLO, Helge. Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 5, p. 2975-2984, may 2003.

PFALLER, M. et al. Development of the quantitative micro-test for slime production by coagulase-negative staphylococci. **European Journal of Clinical Microbiological & Infectious Diseases**, v. 7, p. 30-33, 1988.

PORTILLO, A. et al. Macrolide resistance genes in *Enterococcus* spp. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 44, p. 967-971, 2000.

PRATT, Leslie A.; KOLTER, Roberto. Genetic analysis of bacterial biofilm formation. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, p. 598-603, 1999.

PRATTEN, Jonathan et al. *Staphylococcus aureus* accessory regulators: expression within biofilms and effect on adhesion. **Microbes and Infection**, n. 3, p. 633-637, 2001.

QIN, Xiang et al. Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 5, p. 2579-2586, may 2000.

RABICH, W. L. et al. Prevalence and determinants of vaginal flora alterations in postmenopausal women. **Journal of Infectious Diseases**, v. 188, p.1054-1058, 2003.

RAKITA, Robert M. et al. *Enterococcus faecalis* bearing aggregation substance is resistant to killing by human neutrophils despite phagocytosis and neutrophil activation. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 11, p. 6067-6075, nov. 1999.

REDFIELD, Rosemary J. is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? **TRENDS in Microbiology**, v. 10, n. 8, p. 365-370, aug. 2002.

RICH, Rebecca, L. et al. Ace is a collagen-binding MSCRAMM from *Enterococcus faecalis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 38, p. 26939-26945, sep. 1999

ROGERS, Julie et al. Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 5, p. 1585-1592, may 1994.

ROZDZINSKI, Eva et al. Aggregation substance-mediated adherence of *Enterococcus faecalis* to immobilized extracellular matrix proteins. **Microbial Pathogenesis**, v. 30, p. 211-220, 2001.

RUPP, Mark E. et al. Characterization of the importance of polysaccharide intercellular adhesin/ hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis* in the pathogenesis of biomaterial-based infection in a mouse foreign body infection model. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 5, p. 2627-2632, may 1999.

SANDOE, Jonathan A. T. et al. Correlation between enterococcal biofilm formation *in vitro* and medical-device-related infection potential *in vivo*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, p. 547-550, 2003.

SARTINGEN, S. et al. Aggregation substance increases adherence and internalization, but not translocation, of *Enterococcus faecalis* through different intestinal epithelial cells in vitro. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 10, p. 6044-6047, oct. 2000.

SCHLIEFER, K.; KILPER-BÄLZ, R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 34, p. 31-34, 1984.

SCHLIEVERT, Patrick M. et al. Aggregation and binding substances enhance pathogenicity in rabbit models of *Enterococcus faecalis* endocarditis. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 1, p. 218-223, jan. 1998.

SEMEDO, Teresa et al. Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in enterococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 2569-2576, jun. 2003.

SEMEDO, Teresa et al. Virulence factors in food, clinical and reference enterococci: a common trait in the genus? **Systematic and Applied Microbiology**, v. 26, p. 13-22, 2003.

SHANKAR, Nathan et al. Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 7, p. 4366-4372, jul. 2001.

SHANKAR, Nathan; BAGHDAYAN, Arto S.; GILMORE, Michael S. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. **Nature**, v. 417, p. 745-750, jun. 2002.

SHANKAR, Viswanathan et al. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 1, p. 193-200, jan. 1999.

SHEPARD, Brett D.; GILMORE, Michael S. Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 215-224, 2002.

SHEPARD, Brett D.; GILMORE, Michael S. Differential expression of virulence-related genes in *Enterococcus faecalis* in response to biological cues in serum and urine. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 8, p. 4344-4352, aug. 2002.

SHIRTLIFF, Mark E.; MADER, Jon T.; CAMPER, Anne K. Molecular interactions in biofilms. **Chemistry & Biology**, v. 9, p. 859-871, aug. 2002.

SINGH, Kavindra V. et al. In vivo testing of an *Enterococcus faecalis* *efaA* mutant and use of *efaA* homologs for species identification. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 21, p. 323-331, 1998.

STEPANOVIC, Srdjan et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiology Methods**, v. 40, p. 175-179, 2000.

SU, Yan et al. Nucleotide sequence of the gelatinase gene (*gelE*) from *Enterococcus faecalis* subsp. *Liquefaciens*. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 1, p. 415-420, jan. 1991.

SÜBMUTH, Sigurd D. et al. Aggregation substance promotes adherence, phagocytosis, and intracellular survival of *Enterococcus faecalis* within human macrophages and suppresses respiratory burst. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 9, p. 4900-4906, sep. 2000.

TENG, Fang et al. Evidence that the enterococcal polysaccharide antigen gene (*epa*) cluster is widespread in *Enterococcus faecalis* and influences resistance to phagocytic killing of *E. faecalis*. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 4, p. 2010-2015, apr. 2002.

TOLEDO-ARANA, Alejandro et al. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4538-4545, oct. 2001.

VANEK, Natalie N. et al. *Enterococcus faecalis* aggregation substance promotes opsonin-independent binding to human neutrophils via a complement receptor type 3-mediated mechanism. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 26, p. 49-60, 1999.

VERGIS, Emanuel 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*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, p. 570-575, sep. 2002.

WAAR, Karola et al. *Enterococcus faecalis* surface proteins determine its adhesion mechanism to bile drain materials. **Microbiology**, v. 148, p. 1863-1870, 2002.

WAAR, Karola et al. Genogrouping and incidence of virulence factors of *Enterococcus faecalis* in liver transplant patients differ from blood culture and fecal isolates. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 185, p. 1121-1127, 2002.

WATNICK, Paula; KOLTER, Roberto. Biofilm, city of microbes. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 10, p. 2675-2679, may 2000.

WELLS, Carol L. et al. Inducible expression of *Enterococcus faecalis* aggregation substance surface protein facilitates bacterial internalization by cultured enterocytes. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 12, p. 7190-7194, dec. 2000.

WILLEMS, Rob J. L. et al. Variant *esp* gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. **The Lancet**, v. 357, p. 853-855, mar. 2001.

WILLEY, Barbara M. et al. Practical approach to the identification of clinically relevant *Enterococcus* species. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 34, p. 165-171, 1999.

XIAO, Jianguo et al. Conditional adherence of *Enterococcus faecalis* to extracellular matrix proteins. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 21, p. 287-295, 1998

YOST, C. K.; NATTRESS, F. M. The use of multiplex PCR reactions to characterize populations of lactic bacteria associated with meat spoilage. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.31, p.129-133, 2000.

YU, Jian-Lin; ANDERSSON, Roland; LJUNGH, Asa . Protein Adsorption and bacterial adhesion to biliary stent materials. **Journal of Surgical Research**, v. 62, p. 69-73, 1996.

ANEXO

Incidence of Virulence Genes Markers among Clinical Strains of *Enterococcus faecalis* in Londrina, Brazil

Elisa Bittencourt de Marques, Sérgio Suzart*

Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, Caixa Postal 6001, 86051-970, Londrina, Paraná, Brazil

Keywords: *Enterococcus faecalis*; Virulence Factors; Polymerase Chain Reaction; Clinical Sources

*Corresponding author. Phone: +55-4333714788; Fax: +55-4333714207.

E-mail address: ssuzart@uel.br (Dr. Sérgio Suzart).

Abstract

Epidemiological studies have reinforced the importance of *Enterococcus faecalis* in causing serious infections, and to date, our understanding of how certain virulence factors are involved in the pathogenesis of enterococcal infections is still limited. The aim of the present study was to examine the occurrence of known virulence determinants in a group of *E. faecalis* strains isolated from different clinical sources in Brazil. PCR was used for the detection of nine genes encoding virulence factors commonly associated with *E. faecalis*. The clinical strains carried at least one and concomitantly up to as many as 8 virulence markers, with 2 or 3 being the most common pattern. The distribution of the virulence determinants among *E. faecalis* strains studied is compared to results reported by others. The pathogenic role of several virulence factors identified in *E. faecalis* is still questionable and the meaning of their presence in clinical specimens remains to be better elucidated.

1. Introduction

Enterococci are gram-positive facultative anaerobic cocci known for their ability to colonize the gastrointestinal tract of humans and animals, but are also found in other anatomic sites including the vagina and oral cavity, and in plants and insects [1, 2, 3]. The importance of enterococci as pathogens associated with hospital-acquired infections can be attributed to their intrinsic and acquired resistance to a broad range of antimicrobial agents, which has become a concern in the therapeutic use of antibiotics [4, 5, 6, 7]. Several reports have documented that *Enterococcus faecalis* is recognized as an opportunistic pathogen whose acquisition of resistance determinants to diverse antimicrobial agents has become an inconvenient problem in clinical

practice [5, 8, 9]. This commensal bacterium is the most prevalent enterococcal species capable of causing serious human infections, such as bacteremia, septicemia, endocarditis, urinary tract infections, wound infections, neonatal sepsis and meningitis [10, 11, 12, 13].

Numerous factors are associated with a greater risk of acquiring enterococcal infections. These factors including antimicrobial resistance and expression of virulence factors associated with infection-derived *E. faecalis* strains may account for the establishment and maintenance of this opportunistic pathogen as major community-acquired and nosocomial pathogens. A number of reports have shown that some clinical *E. faecalis* strains harboring virulence genes located on the chromosome and/or plasmids are able to produce enterococcal infections in animal models [14, 15, 16]. *E. faecalis* possesses several putative virulence determinants, including hemolysin/bacteriocin (also called cytolysin) [17], enterolysin A [18], aggregation substance (AS) [19], gelatinase [20], enterococcal surface protein (Esp) [21], adhesion-associated protein named EfaA (*E. faecalis* endocarditis antigen A) [22], enhanced expression of pheromone (Eep) [23], and other factors. Currently, our knowledge about the contribution of these virulence factors to the pathogenesis of enterococcal infections is still limited.

The purpose of the present study was to assess the occurrence of putative virulence factors in 95 *E. faecalis* strains isolated from different clinical specimens of ambulatory and hospitalized patients seen at the Regional University Hospital of Northern Paraná in Londrina, Paraná State, Brazil.

2. Materials and Methods

2.1. Bacterial strains, media and culture conditions

The *E. faecalis* strains used in this study were obtained from different clinical specimens including 50 from urine, 26 from purulent exudates (purulent umbilical cord, abdominal secretion, secretion of renal fistula, tracheal secretion, bone fragment, splenic aspirate and peritoneal fluid), and 19 from rectal swabs. These strains were obtained from ambulatory and hospitalized patients at the Regional University Hospital of Northern Paraná in Londrina, Paraná State, Brazil between July, 1999 and July, 2000. Species identification of the clinical strains was performed using an automated MicroScan WalkAway 96 Instrument (Dade MicroScan, West Sacramento, CA) according to the manufacturer's instructions. Concomitantly, all strains were also confirmed by the conventional biochemical identification scheme of Facklam and Collins [24]. After isolation and identification, the bacterial strains were stored both in slant nutrient agar at room temperature and in cryogenic vials containing 15% glycerol at -20°C until use. All clinical strains were routinely grown on brain heart infusion (BHI) agar plates or in BHI broth (Acumedia, Neogen Co, MI, USA) and then incubated under aerobic conditions, without agitation, at a constant temperature of 37°C for 18 h.

2.2. Bacterial DNA extraction

DNA from clinical strains was extracted by a small-scale DNA extraction method described by Yost and Nattress (2000) [25] with minor modifications. For bacterial DNA extraction, bacterial strains were first streaked onto BHI agar and incubated at 37°C for 18 h. A

single bacterial colony grown on an agar plate was picked up, inoculated in 3 ml BHI broth, and incubated overnight at 37°C. Afterwards, the late logarithmic phase culture was centrifugated at 12,000 rpm for 10 min at 4°C and the resultant bacterial pellet suspended in 500 µl sterile MilliQ water. After the second centrifugation under the same conditions described above, the bacterial cells were resuspended in 200 µl sterile Milli-Q water and then heated at 100°C in boiling water bath for 30 min to lyse cells. The cellular debris was removed by centrifugation and the supernatant was transferred to a sterile 1.5-ml microcentrifuge tube. Finally, the extracted DNA was stored at -20°C until subsequent PCR amplification.

2.3. Oligonucleotide primers

The primers were selected to allow the amplification of putative virulence markers in clinical *E. faecalis* strains. Most of oligonucleotide primers used in this study were previously reported elsewhere [26], except for the *eep*, *gelE*, and *enlA* virulence genes, for which primers were designed on based on published DNA sequences from the NCBI database using the program Primer3 (http://www.broad.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi). The primer sequences and expected sizes of amplicons for each PCR assay are shown in Table 1.

2.4. PCR amplification and analysis of amplified product

PCR reactions were performed in a final volume of 25 µl containing 10 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 50 pmol of each forward and reverse primer, 200 µM of each deoxynucleoside triphosphate (dATP, dGTP, dCTP, and dTTP), 2.0 U of Taq polymerase

(Biosystems Ltda, Curitiba, Brazil), and 10 µl template DNA-containing supernatant (prepared as described above). The reaction mixtures were amplified in a Hybaid PCR Sprint Thermal Cycler (ThermoHybaid, UK) with an initial denaturation at 94°C for 5 min, followed by 30 cycles of 94°C for 45 s, annealing at temperature specific (52 to 62°C) for each primer pair (see Table 1) for 1 min, 72°C for 1 min, and a final extension step at 72°C for 3 min. The negative control was performed for each set of PCR reactions containing all reagents but no DNA template. All amplifications reactions were carried out in duplicate.

After amplification reactions, the analysis of the amplicons was performed in 1% agarose gel electrophoresis in 0.5x TBE (Tris-borate-EDTA) buffer at 80 V and 40 mA for approximately 50 min. The gels were stained with ethidium bromide (5 mg ml⁻¹) for 15 min, washed twice in distilled water, analyzed under UV light (Hoefer UV-25, Pharmacia Biotech) and photographed using a Polaroid camera system. The size of amplified products was estimated by comparison with a 1-kb DNA ladder marker (Amersham Pharmacia Biotech).

3. Results and Discussion

Various species belonging to the genus *Enterococcus* spp. can be found in a variety of habitats such as in humans, animals and foods. Epidemiological studies have reinforced the importance of *E. faecalis* as a nosocomial pathogen capable of causing serious human infections, including bacteremia, endocarditis and meningitis, among others. To date, our understanding of the involvement of certain virulence factors in the pathogenesis of enterococcal infections is still limited. Various studies have identified and characterized a variety of determinants of virulence in *E. faecalis* strains [17-23]; however, a limited number of these factors have been shown to

contribute effectively to enterococcal pathogenicity in animal models. To our knowledge, no report has been published so far concerning the occurrence of known virulence determinants in an important number of *E. faecalis* strains isolated from different clinical sources in Brazil. PCR was used for the detection of nine genes encoding virulence factors commonly associated with *E. faecalis* strains, which were *aggA* (aggregation substance), *cylA* (activation of cytolysin), *cylB* (secretion of cytolysin), *cylM* (posttranslation modification of cytolysin), *eep* (enhanced expression of pheromone), *efaA* (*E. faecalis* endocarditis antigen A), *enlA* (enterolysin A), *esp* (enterococcal surface protein), and *gelE* (gelatinase). Each virulence marker was amplified with virulence gene-specific primer pairs described in Table 1.

As shown in the Table 2, *efaA* and *eep* gene markers were distributed equally among all clinical *E. faecalis* strains investigated in this study. Eaton and Gasson (2001) [26] and Creti et al. (2004) [27] found the *efaA* gene (which encodes endocarditis antigen A) in all the clinical *E. faecalis* strains investigated, whereas we found this gene in 56 (58.9%) of 95 strains tested. In our study, 55 (57.9%) strains carried *esp* gene, and 43 (45.3%) were positive for *gelE* gene and 35 (36.8%) for *aggA* gene. The remaining virulence determinants were detected in less than 17.0% of the strains tested. Indeed, we found a low rate of positivity (9.5%) for enterolysin A-encoding gene among clinical *E. faecalis* strains, with a tendency for it to be present more often among urinary strains than in purulent exudates and rectal swab strains. To our knowledge, this is the first study that investigates the occurrence of the *enlA* gene in different clinical sources. In examining the distribution of the genes comprising the cytolysin operon (*cylA*, *cylB*, *cylM*,) in all the strains studied, we found that the genes *cylA*, *cylB* and *cylM*, whose products are involved in the activation, secretion and posttranslational modification of cytolysin, respectively, are distributed equally in all bacterial strains. Data from recent studies [26-29], are contradictory with regard to the presence of these virulence markers in *E. faecalis* strains due probably to the

presence of strains isolated only from endocarditis, bacteremia and/or feces of volunteers, or in some cases from a bacterial specimen of animal, food or human origin.

The distribution of the virulence determinants among *E. faecalis* strains isolated from different clinical sources is summarized in Table 2. When we examine carefully the results relative to the distribution of genetic markers of virulence in the different groups of clinical strains, we see that the virulence markers most frequently found among the urinary strains are *esp* (62.0%), *eep* (58.0%), *efaA* (54.0%), *gelE* (50.0%) and finally *aggA* (38.0%). The remainder of the virulence determinants represent less than 22.0% of the strains studied. In the present study, the high incidence of various virulence determinants in urinary strains permit the supposition that multiple factors can contribute to a certain extent to bacterial colonization and growth in the development of urinary infection.

Of the 26 strains derived from purulent exudate, the majority of the clinical strains possessed genes *efaA* (69.2%) and *eep* (53.8%), followed by the genetic markers *esp* (46.1%), *aggA* (38.5%), and *gelE* (34.6%). Moreover, it is important to mention that two (*cylM* and *cylB*) of the three genes essential for the expression of cytolysin are not present among the strains recovered from purulent exudates. Generally, the distribution of the virulence determinants among the 19 strains isolated from rectal swabs do not diverge much based on the results obtained for the urinary or purulent exudate strains. The majority of the strains have the following virulence determinants: *eep* (68.4%), *esp* (63.1%), *efaA* (57.9%), *gelE* (47.4%) and *aggA* (31.6%). The other virulence determinants showed less than 22% incidence among the strains examined.

Recently, Creti et al. (2004) [27] showed that *E. faecalis* strains derived from different sources possessed distinct patterns of virulence factors. In the present study, the results revealed that the clinical strains carried at least one and concomitantly up to as many as 8 virulence

markers (Table 3). The majority of the strains harbored between 2 and 3 virulence determinants, as can be seen from the results displayed in Table 3. Interestingly, the greater the number of virulence genes coexisting in the population, the lower was the number of strains in the strain that carried these determinants of virulence. None of the strains examined showed all of the virulence genes investigated in this study. In general, the urinary as well as the purulent exudate strains carried predominantly 3 virulence genes concomitantly. On the contrary, 2 virulence genes were found to coexist preferentially in strains derived from rectal swabs.

In our study, different virulence profiles were identified based particularly on the coexistence of 3 virulence genes (Table 4). Generally, the genotype *efaA*⁺ *esp*⁺ *gelE*⁺ predominated in 20 (21.0%) of the 95 clinical strains studied, where it was most prevalent in strains derived from rectal swabs (26.3%), followed by urinary strains (22.0%) and those derived from purulent exudate (15.4%). Therefore, in some manner it was observed that gene *efaA* is frequently associated with *esp* or *eep* and to a lesser extent with virulence markers *aggA* or *gelE*.

The pathogenic role of several virulence factors identified in *E. faecalis* is still questionable and the meaning of these determinants in strains recovered from clinical strains is uncertain. In the near future, various studies will be conducted in our research laboratory with the aim of ascertaining the role of these virulence determinants in the mechanism of microbial pathogenesis in animal models. We aim thereby to study a combination of clinical strains containing specific virulence factors capable of contributing to enterococcal infection in an animal model different from those reported in the literature to date.

Acknowledgments

This research was supported by grants from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and CPG/UEL (Coordenadoria de Pesquisa e Pós-graduação da Universidade Estadual de Londrina). We are grateful to Prof. Floristher Elaine Carrara of the Departamento de Patologia Aplicada, Legislação e Deontologia (PALD/UEL) for furnishing the clinical strains of *Enterococcus faecalis*. We thank Dr. Albert Leyva for helpful discussion and for critical reading of this manuscript.

References

- [1] Devriese, L. A., Laurier, L., De Herdt, P. and Haesebrouck, F. (1992) Enterococcal and streptococcal species isolated from faeces of calves, young cattle and dairy cows. *J. Appl. Bacteriol.* 72, 29-31.
- [2] Muller, T., Ulrich, A., Ott, E. M. and Muller, M. (2001) Identification of plant-associated enterococci. *J. Appl. Microbiol.* 91, 268-278.
- [3] Rabich, W. L., Fihn, S. D., Stamm, W. E., Scholes, D., Boyko, E. J. and Gupta, K. (2003) Prevalence and determinants of vaginal flora alterations in postmenopausal women. *J. Infect. Dis.* 188, 1054-1058.
- [4] Moellering, R. C. (1992) Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. *Clin. Infect. Dis.* 14, 1173-1178.
- [5] Huycke, M. M., Sahm, D. F. and Gilmore, M. S. (1998) Multi-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerg. Infect. Dis.* 4, 239-249.

- [6] Portillo, A., Ruiz-Larrea, F., Zarazaga, M., Alonso, A., Martinez, J. L. and Torres, C. (2000) Macrolide resistance genes in *Enterococcus* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 967-971.
- [7] Shepard, B. D. and Gilmore, M. S. (2002) Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. *Microb. Infect.* 4, 215–224.
- [8] Dennesen, P. J., Bonten, M. J. and Weinstein, R. A. (1998) Multiresistant bacteria as a hospital epidemic problem. *Ann. Med.* 30, 176-185.
- [9] Landman, D. and Quale, J. M. (1997) Management of infections due to resistant enterococci: a review of therapeutic options. *J. Antimicrob. Chemother.* 40, 161-170.
- [10] Higaki, S., Morohashi, M. and Yamagishi, T. (2002) Isolation of *Enterococcus* species from infectious skin lesions. *Drugs Exp. Clin. Res.* 28, 91-93.
- [11] Jones, R. N., Marshall, S. A., Pfaller, M. A., Wilke, W. W., Hollis, R. J., Erwin, M. E., Edmond, M. B. and Wenzel, R. P. (1997) Nosocomial enterococcal bloodstream infections in the SCOPE program: antimicrobial resistance, species occurrence, molecular testing results and laboratory testing accuracy. SCOPE Hospital Study Group. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 29, 95–102.
- [12] Lautenbach, E., Bilker, W. B. and Brennan, P. J. (1999) Enterococcal bacteremia: risk factors for vancomycin resistance and predictors of mortality. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 20, 318–323.
- [13] Giacometti, A., Cirioni, O., Schimizzi, A. M., Del Prete, M. S., Barchiesi, F., D’Errico, P. and Scalise, G. (2000) Epidemiology and microbiology of surgical wound infections. *J. Clin. Microbiol.* 38, p. 918-922.
- [14] Dupont, H., Montravers, P., Mohler, J. and Carbon, C. (1998) Disparate findings on the role of virulence factors of *Enterococcus faecalis* in mouse and rat models of peritonitis. *Infect. Immun.* 66, 2570-2575.

- [15] Jett, B. D., Atkuri, R. V. and Gilmore, M. S. (1998) *Enterococcus faecalis* localization in experimental endophthalmitis: role of plasmid-encoded aggregation substance. *Infect. Immun.* 66, 843-848.
- [16] Mylonakis, E., Engelbert, M., Qin, X., Sifri, C. D., Murray, B. E., Ausubel, F. M., Gilmore, M. S. and Calderwood, S. B. (2002) 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.* 70, 4678-4681.
- [17] Ike, Y., Clewell, D. B., Segarra, R. A. and Gilmore, M. S. (1990) Genetic analysis of the pAD1 hemolysin/bacteriocin determinant in *Enterococcus faecalis*: insertional mutagenesis and cloning. *J. Bacteriol.* 172, 155-163.
- [18] Nilsen, T., Nes, I. F. and Holo, H. (2003) Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2975-2984.
- [19] Galli, D., Lottspeich, F. and Wirth, R. (1990) Sequence analysis of *Enterococcus faecalis* aggregation substance encoded by the sex pheromone plasmid pAD1. *Mol. Microbiol.* 4, 895-904.
- [20] Su, Y. A., Sulavik, M. C., He, P., Makinen, K. K., Makinen, P-L., Fiedler, S., Wirth, R. and Clewell, D. B. (1991) Nucleotide sequence of the gelatinase gene (*gelE*) from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. *Infect. Immun.* 59, 415-420.
- [21] Shankar, V., Baghdayan, A. S., Huycke, M. M., Lindahl, G. and Gilmore, M. S. (1999) Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infect. Immun.* 67, 193-200.
- [22] Lowe, A. M., Lambert, P. A. and Smith, A. W. (1995) Cloning of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen: homology with adhesins from some oral streptococci. *Infect. Immun.* 63, 703-706.

- [23] An, F. Y., Sulavik, M. C. and Clewell, D. B. (1999) Identification and characterization of a determinant (*eep*) on the *Enterococcus faecalis* chromosome that is involved in production of the peptide sex pheromone cAD1. *J. Bacteriol.* 181, 5915-5921.
- [24] Facklam, R. R. and Collins, M. D. (1989) Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by conventional test scheme. *J. Clin. Microbiol.* 27, p. 731-734.
- [25] Yost, C. K. and Nattress, F. M. (2000) The use of multiplex PCR reactions to characterize populations of lactic bacteria associated with meat spoilage. *Lett. Appl. Microbiol.* 31, p.129-133.
- [26] Eaton, T. J. and Gasson, M. J. (2001) Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1628-1635.
- [27] Creti, R., Imperi, M., Bertuccini, L., Fabretti, F., Orefici, G., Rosa, R. D. and Baldassarri, L. (2004) Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. *J. Med. Microbiol.* 53, 13-20.
- [28] Archimbaud, C., Sankar, N., Forestier, C., Baghdayan, A., Gilmore, M. S., Charbonné, F. and Joly, B. (2002) In vitro adhesive properties and virulence factors of *Enterococcus faecalis* strains. *Res. Microbiol.* 153, 75-80.
- [29] Franz, C. M. A. P., Muscholl-Silberhorn, A. B., Yousif, N. M. K., Vancanneyt, M., Swings, J. and Holzappel, W. H. (2001) Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4385-4389.

Table 1. Oligonucleotide primers and conditions used to amplify different virulence marker genes in *E. faecalis* strains by PCR

Virulence gene ^a	Nucleotide sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	T _a (°C) ^b	Reference
<i>aggA</i>	TE3: AAGAAAAAGTAGACCAAC TE4: AACGGCAAGACAAGTAAATA	1,553	52	[26]
<i>cylA</i>	TE17: TGGATGATAGTGATAGGAAGT TE18: TCTACAGTAAATCTTTCGTCA	517	57	[26]
<i>cylB</i>	TE15: ATTCCTACCTATGTTCTGTTA TE16: AATAAACTCTTCTTTTCCAAC	843	55	[26]
<i>cylM</i>	TE13: CTGATGGAAAGAAGATAGTAT TE14: TGAGTTGGTCTGATTACATTT	742	56	[26]
<i>eep</i>	eepF1: GAGCGGGTATTTTAGTTCGT eepR1: TACTCCAGCATTGGATGCT	937	58	This study
<i>efaA</i>	TE5: GACAGACCCTCACGAATA TE6: AGTTCATCATGCTGCTGTAGTA	705	52	[26]
<i>enlA</i>	ENIEF1: TTCTTCTTATTCTGTCAACGCAGC ENIER1: GACTGTGAAATACCTATTTGCAAGC	960	59	This study
<i>esp</i>	Esp11: TTGCTAATGCTAGTCCACGACC Esp12: GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA	933	62	[21]
<i>gelE</i>	gelEF1: GTACAGGCATCTTTGTTGGA gelER1: GATTCATTCAAGGACCTGA	1004	54	This study

^a*aggA*, gene for aggregation substance involved in adherence to mammalian cells, and conjugation; *cylA*, activation of cytolysin (hemolysin/bacteriocin); *cylB*, transport of cytolysin; *cylM*, posttranslation modification of cytolysin; *eep* (enhanced expression of pheromone), membrane protein from *E. faecalis*; *efaA*, cell wall adhesin expressed in patient serum; *enlA*, enterolysin A belonging to class III bacteriocins which exhibits identity with cell wall-degrading enzymes produced by gram-positive bacteria; *esp*, enterococcal surface protein involved in evasion of the host immune system by *E. faecalis*; *gelE*, extracellular metalloendopeptidase produced by *E. faecalis*.

^bT_a, annealing temperature.

Table 2 Frequency of genetic virulence markers among *E. faecalis* strains isolated from different clinical sources

Virulence markers ^a	No. (%) of <i>E. faecalis</i> strains harboring virulence genes distributed according to the clinical sources:			
	Urine (n = 50)	Purulent exudates (n = 26)	Rectal swab (n = 19)	TOTAL (n = 95)
<i>cylA</i>	11 (22.0)	1 (3.8)	4 (21.0)	16 (16.8)
<i>cylB</i>	11 (22.0)	0 (0.0)	3 (15.8)	14 (14.7)
<i>cylM</i>	11 (22.0)	0 (0.0)	3 (15.8)	14 (14.7)
<i>enlA</i>	7 (14.0)	1 (3.8)	1 (5.3)	9 (9.5)
<i>efaA</i>	27 (54.0)	18 (69.2)	11 (57.9)	56 (58.9)
<i>esp</i>	31 (62.0)	12 (46.1)	12 (63.1)	55 (57.9)
<i>eep</i>	29 (58.0)	14 (53.8)	13 (68.4)	56 (58.9)
<i>aggA</i>	19 (38.0)	10 (38.5)	6 (31.6)	35 (36.8)
<i>gelE</i>	25 (50.0)	9 (34.6)	9 (47.4)	43 (45.3)

^a*agg*, aggregation substance; *cylA*, activation of cytolysin (hemolysin/bacteriocin); *cylB*, transport of cytolysin; *cylM*, posttranslation modification of cytolysin; *eep*, enhanced expression of pheromone; *efaA*, *E. faecalis* endocarditis antigen A; *enlA*, enterolysin A belonging to class III bacteriocins; *esp*, enterococcal surface protein; *gelE*, extracellular metalloendopeptidase produced by *E. faecalis*.

Table 3 Distribution of virulence markers profiles among clinical *E. faecalis* strains carrying concomitantly different known virulence determinants

No. of virulence markers per <i>E. faecalis</i> strain	No. (%) of <i>E. faecalis</i> strains isolated from:			
	Urine (n = 50)	Purulent exudate (n = 26)	Rectal swab (n = 19)	TOTAL (n = 95)
9	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
8	1 (2.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.0)
7	1 (2.0)	0 (0.0)	2 (10.5)	3 (3.2)
6	4 (8.0)	0 (0.0)	1 (5.3)	5 (5.3)
5	7 (14.0)	0 (0.0)	2 (10.5)	9 (9.5)
4	6 (12.0)	5 (19.2)	3 (15.8)	14 (14.7)
3	16 (32.0)	9 (34.6)	2 (10.5)	27 (28.4)
2	10 (20.0)	7 (26.9)	6 (31.6)	23 (24.2)
1	5 (10.0)	4 (15.4)	2 (10.5)	11 (11.6)
0	0 (0.0)	1 (3.8)	1 (5.3)	2 (2.1)

Table 4 Genetic linkage of virulence factor-related gene clusters among *E. faecalis* strains isolated from clinical sources

Virulence markers ^a	No (%) of <i>E. faecalis</i> strains harboring clusters of virulence genes distributed according to the clinical sources:			
	Urine (n = 50)	Purulent exudates (n = 26)	Rectal swab (n = 19)	TOTAL (n = 95)
<i>efaA, esp, eep</i>	8 (16.0)	4 (15.4)	5 (26.3)	17 (17.9)
<i>efaA, esp, gelE</i>	11 (22.0)	4 (15.4)	5 (26.3)	20 (21.0)
<i>efaA, esp, aggA</i>	6 (12.0)	4 (15.4)	3 (15.8)	13 (13.7)
<i>efaA, eep, aggA</i>	8 (16.0)	4 (15.4)	3 (15.8)	15 (15.8)
<i>efaA, aggA, gelE</i>	7 (14.0)	2 (7.7)	2 (10.5)	11 (11.6)
<i>esp, eep, gelE</i>	11 (22.0)	0 (0)	5 (26.3)	16 (16.8)
<i>esp, eep, aggA</i>	6 (12.0)	2 (7.7)	2 (10.5)	10 (10.5)
<i>cylA, cylB, cylM</i>	9 (18.0)	0 (0)	1 (5.3)	10 (10.5)

^aMultiple virulence determinants coexisting in the same clinical *E. faecalis* strain