

Universidade de Lisboa  
Faculdade de Ciências  
Departamento de Biologia Vegetal



**Análise da expressão génica em estirpes de  
*Enterococcus* como resposta a diferentes condições  
ambientais**

Ana Rita Cabral Martins Carlos

Mestrado em Biologia Molecular e Genética

Universidade de Lisboa  
Faculdade de Ciências  
Departamento de Biologia Vegetal



**Análise da expressão génica em estirpes de  
*Enterococcus* como resposta a diferentes condições  
ambientais**

Ana Rita Cabral Martins Carlos

Mestrado em Biologia Molecular e Genética

Dissertação orientada pela Doutora Teresa Maria Leitão Semedo Lemsaddek (Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Centro de Biodiversidade, Genómica Integrativa e Funcional, BioFIG, Campus da FCUL, 1749-016 Lisboa, Portugal) e pela Prof. Doutora Lélia Mariana Marcão Chambel (Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Departamento de Biologia Vegetal, Campus da FCUL, 1749-016 Lisboa, Portugal).

2008

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho em particular à Doutora Teresa Semedo Lemsaddek, orientadora desta tese de Mestrado, por me ter acolhido neste grupo, me ter orientado e apoiado ao longo deste ano e por todos os ensinamentos e críticas. Gostaria também de agradecer à Prof. Doutora Lélia Chambel, por ter aceite ser minha co-orientadora, por se ter mostrado sempre disponível para me ajudar neste trabalho e por tudo o que com ela aprendi ao longo deste ano.

Gostaria ainda de agradecer ao Jorge Santos por me ter ajudado na fase inicial das curvas de crescimento, à Tânia Tenreiro, à Prof. Doutora Ana Tenreiro, à Catarina Baptista, ao João Nascimento, ao Abdelhak Lemsaddek, à Ana Paula Marques, à Inês Gato e a todos os elementos do laboratório que sempre se mostraram disponíveis para me ajudar e responder às minhas dúvidas, ao Prof. Doutor Rogério Tenreiro pela disponibilidade para esclarecer as minhas dúvidas e pela revisão do meu trabalho e a todos aqueles que de uma forma ou de outra contribuíram para que este trabalho fosse possível.

No presente trabalho estão incluídos os resultados dos seguintes artigos já submetidos ou em fase final de redacção:

Carlos, A. R., Santos, J., Semedo-Lemsaddek, T., Barreto-Crespo, T., Tenreiro, R., Enterococci from artisanal dairy products show high level of adaptability.

Artigo submetido ao International Journal of Food Microbiology (FOOD-D-08-00738).

Carlos, A. R., Semedo-Lemsaddek, T., Barreto-Crespo, T., Tenreiro, R., Protein Differential-Display Analysis in Enterococci from Portuguese Ewe's Artisanal Cheeses.

Artigo submetido para a edição especial do Congresso Food Micro 2008 do International Journal of Food Microbiology (FOOD-D-08-00697).

Carlos, A. R., Semedo-Lemsaddek, T., Barreto-Crespo, T., Tenreiro, R., Transcriptional analysis of virulence-related genes in enterococci from distinct origins.

Artigo em fase final de redacção.

Os resultados incluídos nesta Dissertação foram ainda apresentados nas seguintes reuniões científicas:

(Comunicações sob a forma de painel)

Santos, J., Carlos, A. R., Semedo- Lemsaddek, T., Barreto-Crespo, T., Tenreiro, R. (2007) Enterococci: is their high environmental adaptability a risk to food safety?" Microbiotec 2007 Congress, Food Microbiology, Lisboa, Portugal.

Semedo- Lemsaddek, T., Carlos A. R., Santos J., Vale de Gato, I., Chambel, L., Barreto-Crespo, T., Tenreiro, R. (2008) Environmental adaptability: are clinical and food enterococci so much different? IUMS 2008, International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, Istanbul, Turkey.

(Comunicações orais)

Carlos, A. R., Semedo-Lemsaddek, T., Barreto-Crespo, T., Tenreiro, R. (2008) Protein Differential-Display Analysis in Enterococci from Portuguese Ewe's Artisanal Cheeses. Food Micro 2008, Dairy Microbiology, Aberdeen, Scotland.

## RESUMO

Os membros do género *Enterococcus* são organismos ubíquos presentes no solo, água e alimentos, constituindo também uma parte significativa da microflora do tracto gastrointestinal de humanos e animais. Embora sejam organismos comensais, são também responsáveis por infecções graves em humanos e a sua frequência em amostras clínicas tem vindo a aumentar. Neste estudo, 16 enterococos isolados de leites e queijos de ovelha provenientes de Regiões de Origem Demarcada Portuguesas foram comparados com estirpes clínicas (veterinárias e humanas) e de colecções internacionais. Tal foi realizado por crescimento em meios simulando colonização ambiental e locais de infecção: 2YT, BHI, 'skim milk', urina e soro de coelho a diferentes pHs (6,0, 7,0 e 7,4), osmolaridades (concentração 'standard', 2,5%, 5,0% e 6,5%) e temperaturas (30 e 37 °C). Procedeu-se à análise da cinética de crescimento, dos perfis proteicos totais e da transcrição de genes de virulência. Todas as estirpes analisadas cresceram nas diferentes condições sem que tenham sido detectadas diferenças significativas entre o crescimento de estirpes clínicas e alimentares ( $P > 0,05$ ). Os dendrogramas construídos com base nos perfis proteicos totais revelaram que as estirpes se agrupam independentemente da espécie ou origem. A análise desses perfis revelou ainda a existência de diferenças na presença/ausência, bem como na intensidade relativa, de algumas bandas proteicas. Por último, a análise da expressão de oito genes de virulência (codificantes para a citolisina e diferentes adesinas) sugere que as estirpes clínicas activam a sua expressão em função da condição a que são expostas, enquanto as estirpes alimentares apresentam uma expressão menos dependente do meio. Em conclusão, o conjunto dos resultados sugere que os enterococos apresentam um comportamento estirpe-específico e uma elevada capacidade de adaptação, o que evidencia a necessidade de estudos posteriores de modo a avaliar o verdadeiro potencial patogénico dos enterococos em produtos alimentares tais como os queijos artesanais.

Palavras-chave: *Enterococcus*; estirpes alimentares; estirpes clínicas; cinética de crescimento; perfis proteicos totais; genes de virulência.

## ABSTRACT

Enterococci are ubiquitous microorganisms that can be found in soil, water, raw and fermented food. Although they are commonly viewed as commensal bacteria, constituting a significant part of the gastrointestinal microflora of humans and animals, they are also capable of causing life-threatening infections in humans and their frequency in clinical samples is increasing. In this study, 16 enterococcal strains from ewe's milk and cheese from Portuguese Registered Designation of Origin areas were compared to clinical strains (human and veterinarian) and to enterococci from international culture collections by growth in media simulating environmental colonization and infection sites: 2YT, BHI, skim milk, urine and rabbit serum at different pHs (6.0, 7.0 and 7.4), osmolarities (standard concentration, 2.5%, 5.0% and 6.5%) and temperatures (30 and 37 °C). Growth kinetics analysis was accomplished and revealed that all strains were able to grow in the analysed conditions and no significant differences could be detected between the growth kinetics of clinical and food strains ( $P>0.05$ ). Dendrograms based on the whole-cell protein profiles showed that all strains under analysis clustered regardless their origin or species allocation. Differences of presence/absence, as well as of relative intensity, were also detected for some bands of these profiles. The expression analysis of eight virulence-related genes (coding for cytolysin and different adhesins) was also accomplished and suggested that the clinical strains activate gene expression in response to a particular condition, whereas food strains showed a wider expression. The overall results point to a strain-specific behaviour and a high degree of environmental adaptability of the strains under analysis. Further studies are required in order to correctly evaluate the true pathogenic potential of enterococci present in food products such as artisanal cheeses.

Keywords: *Enterococcus*; food strains; clinical strains; growth kinetics; whole-cell protein profiles; virulence-related genes.

# ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1. BREVE CARACTERIZAÇÃO DO GÉNERO <i>ENTEROCOCCUS</i>                    | 1         |
| 1.2. OS ENTEROCOCOS NOS ALIMENTOS E COMO PROBIÓTICOS                       | 2         |
| 1.3. OS ENTEROCOCOS COMO PATOGÉNIOS  | 2         |
| 1.4. ESTIRPES ALIMENTARES VS. ESTIRPES CLÍNICAS                            | 4         |
| 1.5. ENQUADRAMENTO DO TEMA E OBJECTIVOS DO ESTUDO                          | 5         |
| <b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b>  | <b>6</b>  |
| 2.1. MICRORGANISMOS  | 6         |
| 2.2. MEIOS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO                                      | 6         |
| 2.3. ANÁLISE DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO EM ESTIRPES DE <i>ENTEROCOCCUS</i> | 7         |
| 2.3.1 <i>Ensaio de crescimento</i>   | 7         |
| 2.3.2 <i>Análise de dados</i>  | 8         |
| 2.4. RECOLHA DE CÉLULAS EM FASE EXPONENCIAL TARDIA                         | 9         |
| 2.5. ANÁLISE DE PERFIS DIFERENCIAIS DE PROTEÍNAS TOTAIS                    | 9         |
| 2.5.1 <i>Extracção de proteínas totais</i>                                 | 9         |
| 2.5.2 <i>Determinação da concentração de proteínas</i>                     | 9         |
| 2.5.3 <i>Análise dos extractos proteicos totais por SDS-PAGE</i>           | 9         |
| 2.5.4 <i>Análise de dados</i>  | 10        |
| 2.6. PESQUISA DA PRESENÇA E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA    | 10        |
| 2.6.1 <i>Extracção de DNA e RNA, quantificação e tratamento com DNase</i>  | 10        |
| 2.6.2 <i>Amplificação por RT-PCR</i>                                       | 11        |
| 2.6.3 <i>Amplificação por PCR</i>  | 12        |
| 2.6.4 <i>Análise de dados</i>  | 12        |
| <b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>   | <b>13</b> |
| 3.1. ANÁLISE DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO EM ESTIRPES DE <i>ENTEROCOCCUS</i> | 13        |
| 3.2. ANÁLISE DE PERFIS DIFERENCIAIS DE PROTEÍNAS TOTAIS                    | 16        |
| 3.3. PESQUISA DA PRESENÇA E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA    | 19        |
| <b>4. CONCLUSÕES</b>   | <b>26</b> |
| <b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                                       | <b>27</b> |

## **ÍNDICE DE TABELAS**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Tabela Suplementar 1</b> Estirpes utilizadas neste estudo         | <b>31</b> |
| <b>Tabela Suplementar 2</b> 'Primers' utilizados nas reacções de PCR | <b>32</b> |
| <b>Tabela Suplementar 3</b> Análise por PCR dos genes de virulência  | <b>32</b> |



## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Figura 1. 1</b> Dendrograma obtido a partir dos Índices Relativos  | <b>16</b> |
| <b>Figura 2. 1</b> Gráficos circulares comparando a intensidade relativa das bandas presentes no meio e respectivo controlo para a estirpe clínica H1881 e a estirpe alimentar LA78 | <b>18</b> |
| <b>Figura 3. 1</b> Expressão relativa de genes de virulência no soro e respectivo controlo (2YT pH 7,0 a 37 °C)   | <b>23</b> |
| <b>Figura Suplementar 1</b> Condições de crescimento utilizadas no presente trabalho  | <b>33</b> |
| <b>Figura Suplementar 2</b> Curvas de crescimentos em meios que simulam colonização ambiental e meios que simulam locais de infecção  | <b>33</b> |
| <b>Figura Suplementar 3</b> Dendrograma baseado nos perfis proteicos totais obtidos para todas as estirpes após crescimento em 2YT com 2,5% NaCl pH 7,0 a 30 °C                     | <b>34</b> |
| <b>Figura Suplementar 4</b> Análise da expressão da proteína de ~32kDa no soro e no respectivo controlo (2YT pH 7,0 a 37 °C) por SDS-PAGE   | <b>34</b> |
| <b>Figura Suplementar 5</b> Níveis de expressão dos genes de virulência comparando cada condição com a condição controlo  | <b>35</b> |
| <b>Figura Suplementar 6</b> Expressão relativa de genes de virulência no 'skim milk' com 2,5% NaCl a 30 °C e respectivo controlo (2YT 2,5% NaCl a 30 °C)                            | <b>36</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Breve caracterização do género *Enterococcus*

As bactérias do género *Enterococcus* pertenciam inicialmente ao género *Streptococcus*, mais precisamente aos estreptococos do grupo D de Lancefield, também conhecido como grupo dos “estreptococos fecais”. Evidências filogenéticas obtidas por sequenciação de rDNA 16S, juntamente com estudos serológicos, levaram à divisão dos estreptococos do grupo D em três géneros distintos: *Streptococcus*, *Lactococcus* e *Enterococcus* (13, 31, 63). Os “estreptococos fecais” que se encontravam associados à flora gastrointestinal de mamíferos e outros animais de sangue quente, a diversos produtos alimentares (como queijos e fumados, especialmente os de fabrico artesanal), mas também a uma grande variedade de outros habitats, tais como plantas, solo e água (1, 16, 21) tornaram-se parte integrante do género *Enterococcus*. Desde 1984 que o número de espécies pertencentes ao género *Enterococcus* tem vindo a aumentar e conta até à data com 40 espécies taxonomicamente validadas (<http://www.bacterio.cict.fr/e/enterococcus.html>). Para além de serem organismos comensais, os enterococos são patogénios oportunistas estando associados a uma grande variedade de infeções no Homem e também noutros animais. Por apresentarem esta grande capacidade de adaptação e resistência a várias condições de stress são utilizados como um dos principais indicadores de qualidade, em particular do leite e da água.

Os membros do género *Enterococcus* são bactérias gram-positivas com baixa percentagem G+C (varia entre os 37 e os 45 mol%), não esporuladas, catalase-negativas, anaeróbias facultativas e apresentam forma de cocos que podem surgir isolados ou organizados em pares ou pequenas cadeias. São quimiorganotróficos e produzem ácido L-láctico a partir de hexoses por fermentação ácido-láctica homofermentativa (pertencem ao grupo das bactérias lácticas ou LAB – ‘lactic acid bacteria’). Os enterococos distinguem-se de outras bactérias gram-positivas, catalase-negativas e cocos homofermentativos devido à sua capacidade de crescer a temperaturas entre os 10 e os 45 °C, sendo a temperatura óptima de crescimento 35 °C, de crescer em concentrações salinas até 6,5% NaCl, de hidrolisar esculina na presença de 40% de sais biliares e de tolerarem valores de pH entre pH 4,6 e pH 9,6. Adicionalmente, foi comprovado que com a entrada em fase estacionária *E. faecalis* se torna particularmente resistente a outras formas de stress tais como calor, ácido, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hiperosmolaridade, NaOCl e até irradiação com luz ultra-violeta (20). A presença de aminopeptidase de leucina é também uma característica comum nas espécies de enterococos, sendo que a maioria dos enterococos é igualmente capaz de hidrolizar pirrolidonil-β-naftilamida (PYR).

## 1.2. Os enterococos nos alimentos e como probióticos

Os enterococos desempenham um importante papel na área alimentar, nomeadamente, na maturação de determinados queijos e produtos fumados artesanais produzidos especialmente nos países mediterrâneos. No que diz respeito aos queijos e fumados tradicionais portugueses este género, juntamente com o género *Lactobacillus*, são as bactérias predominantes (37).

O papel dos enterococos na maturação do queijo e produtos fumados deve-se às suas actividades proteolítica e estereolítica, bem como à produção de diacetil, o que leva ao amadurecimento e desenvolvimento de aroma nestes produtos (17). Os enterococos que possuam características tecnológicas e metabólicas desejáveis poderão ter uma aplicabilidade futura como culturas 'starter' para diferentes queijos europeus.

Outra característica importante dos enterococos nos queijos e nos produtos fumados é o facto destes produzirem bacteriocinas que inibem patógenos potencialmente presentes nos alimentos, tais como *Listeria monocytogenes*. Uma das bacteriocinas produzida, AS-48, apresenta um largo espectro antimicrobiano (17, 18). Enterococos que produzem esta bacteriocina já foram identificados em leite e outros produtos lácteos (42, 43).

É ainda de realçar o papel que os enterococos podem desempenhar como probióticos, tendo algumas estirpes propriedades que permitem a inibição de microrganismos patogénicos, que reforçam as barreiras mucosas, que estimulam o sistema imunitário e que diminuem os níveis de colesterol (17, 23). A estirpe *E. faecium* SF68 e produtos como Causido® (consiste em duas estirpes de *S. thermophilus* e uma de *E. faecium*) ou FECINOR® (*E. faecium* CECT 4515) são probióticos correntemente utilizados (17). No entanto, a utilização de enterococos como probióticos tem sido posta em causa devido ao aumento de estirpes que apresentam resistências a antibióticos e à crescente associação dos enterococos com doenças em humanos. A razão de tal controvérsia assenta essencialmente no facto de genes de resistência ou que codificam para factores de virulência poderem ser transferidos para estirpes probióticas no tracto gastrointestinal do Homem.

## 1.3. Os enterococos como patogénios

Desde o final do século XIX têm sido descritos casos de infecções associadas a enterococos (78) e a partir dos anos 70 e 80 do século XX estabeleceram-se como importantes patogénios oportunistas provocando infecções em indivíduos mais susceptíveis (e.g. com doenças graves ou imunocomprometidos) (28). Actualmente, encontram-se entre os mais preocupantes patogénios nosocomiais, sendo responsáveis por uma panóplia de doenças tais como infecções do tracto urinário (49), bacterémia (67), endocardite (15), infecções abdominais (74), infecções em feridas resultantes do pós-operatório ou de

queimaduras (30) e outras infecções menos frequentes como meningites (27), infecções oculares (76) e infecções do tecido periodontal (57). Cerca de 80% das infecções provocadas por enterococos devem-se à espécie *Enterococcus faecalis*, sendo que das restantes a maioria se deve a *E. faecium* (46, 59). No entanto, outras espécies tais como *E. avium* (51), *E. casseliflavus* (27, 58), *E. durans* (48), *E. gallinarum* (58), *E. hirae* (55), *E. mundtii* (26) e *E. raffinosus* (61), são também responsáveis por infecções (28, 56).

Existem várias características que tornam os enterococos importantes patogénios. Uma dessas características é a resistência intrínseca a um grande número de antibióticos tais como cefalosporinas,  $\beta$ -lactâmicos, sulfonamidas e baixos níveis de aminoglicósidos. Para além desta resistência intrínseca, os enterococos apresentam resistência adquirida, ou seja, tornam-se resistentes a determinados antibióticos (e.g. cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina e vancomicina) através de genes presentes em plasmídios ou transposões. A resistência à vancomicina é uma questão extremamente preocupante, uma vez que este antibiótico tem sido considerado como uma forma de tratamento de último recurso para infecções que envolvem enterococos multi-resistentes (17).

Para além da resistência a antibióticos existem outros factores que tornam os enterococos patogénicos, factores esses que estão envolvidos na colonização, adesão e invasão dos tecidos e também na resistência aos mecanismos de defesa específicos e não específicos do hospedeiro. Entre estes factores encontra-se a citolisina ou hemolisina, a qual se pensa contribuir para a severidade das infecções causadas por enterococos (7, 29). Esta é codificada pelo operão *cyLL<sub>L</sub>MBAI*, sendo que os genes *cyLL<sub>L</sub>* e *cyLL<sub>S</sub>* codificam para as subunidades estruturais que constituem a citolisina, enquanto que os restantes genes codificam para proteínas envolvidas em modificações pós-traducionais (*cyIM*), transporte (*cyIB*), activação (*cyIA*) e auto-protecção (*cyII*) (69). Outros importantes factores de virulência são as adesinas tais como AS, 'aggregation substance', presente com frequência em plasmídios conjugativos que codificam para feromonas, sendo essencial para o processo de conjugação e actuando também como factor de virulência durante o processo de infecção, facilitando a adesão e invasão dos tecidos (34, 80); Esp, 'enterococcal surface protein', a qual apresenta grandes variações estruturais que poderão contribuir para a evasão ao sistema imunitário do hospedeiro e se pensa estar associada com o aumento da virulência em *E. faecalis* e *E. faecium* (71, 81); e EfaA<sub>fs</sub> e EfaA<sub>fm</sub> (antígenos semelhantes a adesinas isolados no soro de pacientes com endocardite provocada por *E. faecalis* e *E. faecium*, respectivamente), tendo o primeiro sido já identificado como componente lipoproteico de um transportador putativo do tipo ABC (39). Outros factores que poderão favorecer a virulência incluem a presença de enzimas hidrolíticas, tais como gelatinase, lipase e hialuronidase e ainda características como a capacidade de formar biofilmes (conferem vantagens na adesão a tecidos e actuação de enzimas hidrolíticas) e a presença

de uma cápsula polissacarídica que confere protecção contra os mecanismos de defesa do hospedeiro (60, 82).

Estudos efectuados recentemente (35, 68) revelaram que alguns destes caracteres que potenciam a virulência (e.g. citolisina, substância de agregação e Esp) podem estar agrupados na mesma região do genoma juntamente com outros genes, alguns dos quais ainda sem função conhecida, constituindo ilhas de patogenicidade. Estas ilhas só foram descritas até ao momento em *E. faecalis* (68) e *E. faecium* (35), mas outras espécies poderão também conter estes elementos.

Devido à elevada promiscuidade dos enterococos, elementos genómicos, nomeadamente plasmídios, poderão ser transmitidos entre estirpes (8) o que pode conduzir a um aumento da sua virulência uma vez que alguns dos factores acima mencionados são frequentemente codificados por plasmídios (e.g. citolisina e substância de agregação). Apesar de inicialmente as tentativas para transferir a ilha de patogenicidade entre estirpes de enterococos terem fracassado (68), mais recentemente verificou-se que a transferência horizontal desta ilha era possível (9), sendo no entanto a frequência de transferência muito inferior à registada no caso dos plasmídios.

#### **1.4. Estirpes alimentares vs. estirpes clínicas**

Vários estudos têm sido realizados no sentido de comparar estirpes clínicas e alimentares com o intuito de perceber qual o risco que os enterococos representam na alimentação. Entre estes estudos encontram-se alguns que comparam a susceptibilidade a antibióticos em estirpes de diferentes origens (22, 38, 41), tendo-se verificado que as estirpes alimentares eram de um modo geral mais susceptíveis à maioria dos antibióticos testados (e.g. penicilina, ampicilina, vancomicina e tetraciclina). Por outro lado, outros estudos sugerem que, na Europa, os isolados clínicos resistentes à vancomicina apresentam o mesmo perfil de susceptibilidade que isolados alimentares resistentes à vancomicina (22). Tal pode ter tido origem no uso excessivo do antibiótico avoparcina como promotor de crescimento de vários animais que estão na base da alimentação humana, tornando assim estirpes provenientes destes animais mais resistentes a antibióticos.

Apesar da disseminação de enterococos com resistências a antibióticos estar muitas vezes associada ao ambiente hospitalar (5), já foram detectados, especialmente na Europa, diferentes casos de estirpes resistentes à vancomicina em indivíduos sem historial clínico de hospitalização ou tratamento com antibióticos (32, 41). Sugerindo assim que o desenvolvimento de estirpes resistentes a antibióticos não é um fenómeno restrito aos hospitais e que a cadeia alimentar pode desempenhar um papel importante na proliferação de enterococos resistentes a glicopéptidos. Esta proliferação pode ser potenciada pelo facto dos enterococos serem bactérias promíscuas com uma elevada frequência de transferência

génica e capazes de adquirir genes de resistência, provenientes de diferentes espécies bacterianas e até mesmo de géneros distintos. Tal pode levar a que a população residente no tracto gastrointestinal adquira resistências a antibióticos provenientes de bactérias enteropatogénicas (8).

Estudos que envolveram a pesquisa de factores de virulência em estirpes alimentares e/ou culturas 'starter' revelaram que estirpes destas origens também possuem factores de virulência, os quais podem ou não estar silenciados (14, 65, 66). A incidência destes factores é, no entanto, inferior à registada para estirpes de origem clínica. O facto de alguns destes factores de virulência se encontrarem em plasmídios aumenta a preocupação relativamente à segurança dos produtos alimentares, uma vez que laboratorialmente já foi demonstrada a capacidade de transferência de factores de virulência de estirpes clínicas para culturas 'starter' através do mecanismo natural da conjugação (14). Alguns factores de virulência estão envolvidos na formação de biofilmes (e.g. gelatinase e adesinas), estruturas estas que potenciam a patogenicidade das estirpes e as quais foram já detectadas em estirpes alimentares (4). Por outro lado, a presença de uma cápsula polissacarídica só se encontra descrita até à data em estirpes clínicas.

Para além da pesquisa dos genes de virulência, foram igualmente realizados estudos para avaliar a expressão destes mesmos genes em diferentes condições (25, 72), tendo-se verificado que a expressão dos genes de virulência é influenciada essencialmente pela fase e pelas condições de crescimento. Os resultados obtidos por Shepard e Gilmore (2002) sugerem que determinadas características presentes no soro e na urina (meios que simulam condições de infecção) poderão promover a activação destes genes (e.g. citolisina, adesinas e genes de resposta a condições de stress). No entanto, estes estudos foram levados a cabo apenas em estirpes clínicas da espécie *E. faecalis*, não havendo informação disponível relativamente a outras espécies e origens, o que impossibilita a comparação com estirpes alimentares. Aliás, esta escassez de informação faz-se também sentir, por exemplo, na análise do proteoma onde os estudos existentes foram também realizados em *E. faecalis* (20). Isto evidencia por um lado a importância de saber mais sobre as estirpes clínicas, especialmente *E. faecalis* que é o principal responsável pelas infecções provocadas por enterococos, mas também que existe ainda muito mais para saber, nomeadamente no que diz respeito ao modo como as estirpes alimentares se podem tornar patogénicas.

### **1.5. Enquadramento do tema e Objectivos do estudo**

Alves *et al.* (2004) analisaram 364 estirpes de enterococos isoladas a partir de leites e queijos pertencentes a Regiões de Origem Demarcada (ROD) portuguesas, juntamente com um grupo de estirpes provenientes de colecções de cultura internacionais (estirpes de referência), permitindo assim a identificação dos isolados ao nível de espécie através de

uma abordagem polifásica que utilizou métodos fenotípicos (e.g. testes bioquímicos e fisiológicos) e moleculares (e.g. ITS/ARDRA e ribotipagem). Estudos posteriores envolveram a análise de 96 enterococos, incluindo estirpes alimentares e de referência do estudo anterior, e ainda estirpes clínicas (humanas e veterinárias) a fim de pesquisar a presença de factores de virulência (65, 66). Assim, pesquisou-se a presença de genes associados à virulência (e.g. *cyiL<sub>L</sub>L<sub>S</sub>MBAI*, *esp*, *agg*, *efaA<sub>fs</sub>* e *efaA<sub>fm</sub>*), actividade hemolítica e produção de enzimas hidrolíticas (lipase, gelatinase, hialuronidase e desoxirribonuclease). A interpretação dos resultados obtidos nestes estudos levou à selecção de 16 estirpes (oito alimentares, seis clínicas e duas de referência) para estudos mais pormenorizados.

No presente estudo, pretende comparar-se estas estirpes, com especial incidência nas de origem clínica e alimentar, no que respeita à sua capacidade de adaptação a diferentes meios que simulam condições quer de colonização ambiental (leites e queijos) quer de colonização do hospedeiro (e.g. sangue e urina). A comparação será feita tanto ao nível dos parâmetros de crescimento, como da expressão génica, analisando o perfil proteico total e ainda qual (quais) do(s) gene(s) de virulência estão efectivamente a ser transcritos e em que condições. Pretende-se com isto aumentar o conhecimento do perigo real que os enterococos poderão representar devido à sua presença habitual em alimentos, especialmente para indivíduos cujo sistema imunitário possa estar de algum modo fragilizado.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Microrganismos

Dezasseis estirpes de enterococos foram seleccionadas com base em trabalhos anteriores (2, 65, 66), incluindo oito estirpes isoladas de leite (L) e queijo (Q) de ovelha provenientes de quatro ROD portuguesas, nomeadamente Azeitão (LA78, LA160, QA29a e QA40), Castelo Branco (QCB54), Nisa (LN9 e LN11) e Serra da Estrela (QSE123) e isolados de origem clínica humana (H1881) e veterinária (V95 e V434). Neste estudo, foram ainda incluídas duas estirpes provenientes de colecções de cultura internacionais (designadas estirpes de referência), *Enterococcus casseliflavus* DSMZ 20680<sup>T</sup> e *E. raffinosus* DSMZ 5633<sup>T</sup> e também os isolados clínicos *E. faecalis* MMH594 e V583 e *E. faecium* E300. A estirpe *E. faecium* F10 foi igualmente incluída neste trabalho como controlo positivo para o gene *efaA<sub>fm</sub>*. Na Tabela Suplementar 1 encontra-se a listagem das estirpes, a sua origem e classificação ao nível da espécie.

### 2.2. Meios e condições de crescimento

O meio 2YT [2 × 'yeast tryptone' – 1,6% (m/v) triptona, 1,0% (m/v) extracto de levedura e 0,5% (m/v) NaC] foi usado como meio controlo com o qual todos os meios em análise

foram comparados. 'Brain Heart Infusion', BHI (Biokar Diagnostics), foi utilizado devido à associação de estirpes de enterococos com endocardites e com infecções do sistema nervoso central (e.g. meningite). A urina foi seleccionada devido à grande percentagem de infecções do tracto urinário que estão associadas a enterococos tanto no Homem como nos animais. A presença destes microrganismos em bacterémias levou à inclusão de soro de coelho (referido a partir deste momento apenas como soro) neste estudo. Para o crescimento em urina, urina humana foi recolhida de indivíduos saudáveis (*i.e.* sem historial clínico recente de infecções ou doenças crónicas associadas ao tracto urinário ou utilização de antibióticos) e esterilizada por filtração utilizando uma membrana com 0,2 µm de dimensão do poro (Millipore Corporation, EUA). Para o crescimento em soro foi utilizado soro estéril de coelho de origem controlada (Invitrogen, Life Technologies). 'Skim milk' (AppliChem) foi utilizado para simular os leites e queijos artesanais de ovelha (colonização ambiental) e esterilizado por autoclavagem de 5 min a 121 °C seguido de um arrefecimento rápido em gelo. A esterilidade da urina e do 'skim milk' foi confirmada por inoculação em placa (2YT e BHI), seguida de incubação 'overnight' a 30 e 37 °C. Os diferentes valores de pH utilizados correspondem aos valores registados para BHI (7,4), urina (6,0), soro (7,0) e 'skim milk' (7,0). As concentrações salinas correspondem à concentração utilizada frequentemente na manufactura de queijos tradicionais de ovelha (2,5%) e à concentração salina máxima tolerada pelos enterococos (6,5%). No caso do 'skim milk', o sal não foi adicionado directamente, tendo-se preparado uma solução salina concentrada a qual foi esterilizada por autoclavagem a 121 °C durante 15 min. Esta adição *a posteriori* deveu-se ao facto da adição directa de sal ao 'skim milk' ter conduzido à coagulação durante o processo de esterilização. Em todos os casos foram adicionadas aproximadamente duas partes de 'skim milk' para uma parte de solução salina e/ou água estéril de forma a se obterem as diferentes concentrações de NaCl ('standard', 2,5% 5,0% e 6,5%). As diferentes temperaturas, 30 e 37 °C representam a temperatura à qual se procede à coagulação do leite no processo de manufactura do queijo e à temperatura corporal humana, respectivamente. Na secção de resultados e discussão a indicação da temperatura de incubação será apenas feita para condições realizadas a 30 °C. Um resumo das condições utilizadas e respectivos controlos encontra-se na Figura Suplementar 1.

## **2.3. Análise da cinética de crescimento em estirpes de *Enterococcus***

### **2.3.1 Ensaaios de crescimento**

A caracterização da cinética de crescimento para as diferentes condições (descritos na Figura Suplementar 1) foi realizada no aparelho 'Microbiology Workstation Bioscreen C®' (ThermoLabSystems).



Para garantir que os inóculos utilizados nos ensaios correspondiam a culturas em fase activa de crescimento as estirpes de enterococos foram incubadas 'overnight' a 37 °C em 2YT. As células foram recolhidas por centrifugação de modo a obter aproximadamente 10<sup>9</sup> UFC (unidades formadoras de colónias). Os 'pellets' foram lavados duas vezes com 1 ml de 'Phosphate Buffered Saline' (PBS) 10 mM pH 7,0 e ressuspendidos em 100 µl do mesmo tampão. Cada um dos meios seleccionados (2YT, BHI, soro, urina e 'skim milk') foi distribuído em placas com 100 poços, próprias do sistema Bioscreen C®, e posteriormente foram inoculados utilizando 1% (v/v) das suspensões bacterianas. Cada placa foi incubada à temperatura seleccionada, sem arejamento, por um período máximo de 2 dias. Todos os ensaios foram realizados em triplicado e os resultados apresentados correspondem a valores médios.

O Bioscreen C® monitoriza a turbidez das amostras gerando curvas de crescimento (turbidez vs. tempo) e faz automaticamente cálculo dos parâmetros de crescimento (e.g. tempo de geração e taxa máxima de crescimento).

No presente estudo, a leitura da densidade óptica (D.O.) foi realizada utilizando um filtro que abrange uma gama de comprimentos de onda (o filtro 'wide band' inclui os comprimentos de onda de 420 nm até 580 nm) e não um comprimento de onda único, uma vez que deste modo os resultados não são afectados por alterações da cor do meio de crescimento, traduzindo apenas o desenvolvimento da sua turbidez.

### 2.3.2 Análise de dados

Os parâmetros de crescimento foram utilizados para calcular Índices Relativos (IR) para cada estirpe em cada uma das condições testadas. Sendo que

$$IR_{\text{estirpe } x \text{ na condição } y} = \mu_{\text{max}} / \mu_{\text{MAX}} - \Delta A_{\text{max}} / \Delta A_{\text{MAX}} + [1 - lag / lag_{\text{MAX}}] \in [0,3] \quad (77)$$

$\mu_{\text{max}}$  – taxa específica de crescimento da estirpe  $x$  na condição  $y$  ( $h^{-1}$ );  $\mu_{\text{MAX}}$  – taxa específica de crescimento máxima considerando todas as estirpes e todas as condições ( $h^{-1}$ );  $A$  – densidade óptica (D.O.);  $\Delta A_{\text{max}}$  – variação máxima da D.O. da estirpe  $x$  na condição  $y$ ;  $\Delta A_{\text{MAX}}$  variação máxima da D.O. considerando todas as estirpes e todas as condições;  $lag$  – tempo de latência (h);  $lag_{\text{MAX}}$  – tempo de latência máximo considerando todas as estirpes e todas as condições (h).

Os resultados foram analisados utilizando o 'software' BioNumerics (versão 4.61; Applied Maths, Kortrijk, Bélgica, 1998) aplicando o coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) e o método de aglomeração 'Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean' (UPGMA) para a construção de um dendrograma que compara os índices relativos obtidos para todas as estirpes em todas as condições. A partir dos mesmos dados realizou-se ainda 'Principal Components Analysis' (PCA) utilizando o programa NTSYSpc (versão 2.20d; Exeter Software, EUA). Para testar a independência estatística entre os Índices Relativos

para cada condição e para cada estirpe ou para estirpes de diferentes origens foi aplicada a análise estatística 'Analysis of Variance' (ANOVA).

## **2.4. Recolha de células em fase exponencial tardia**

Tal como descrito anteriormente (ver Materiais e Métodos, 2.3.1 *Ensaio de crescimento*), culturas num modo activo de crescimento e com concentração semelhante foram utilizadas para inocular os meios em análise (Figura Suplementar 1). Quando as culturas atingiram a fase exponencial tardia de crescimento, a qual foi determinada utilizando o Bioscreen C® para cada estirpe em cada condição, as células foram recolhidas por centrifugação e os 'pellets' lavados duas vezes com PBS pH 7,0 a 10 mM. Cada ensaio foi realizado em triplicado e cada um dos 'pellets' obtidos foi destinado, respectivamente, à extracção de proteínas, DNA e RNA.

## **2.5. Análise de perfis diferenciais de proteínas totais**

### 2.5.1 Extracção de proteínas totais

A partir dos 'pellets' anteriormente obtidos (ver Materiais e Métodos, 2.4. *Recolha de células em fase exponencial tardia*) procedeu-se à extracção de proteínas totais. A extracção foi realizada, essencialmente, como descrito anteriormente (54). Resumidamente, os 'pellets' foram ressuspensos em 900 µl de tampão de tratamento da amostra [0,062 M Tris-HCl pH 6,8; 10% (v/v) glicerol; 5% (v/v) mercaptoetanol; 0,05 M Na<sub>2</sub>.EDTA; pH 6,8] preparado com 10 mg/ml de lisozima e incubados 'overnight' a 37 °C. 'Sodium Dodecyl Sulfate' (SDS) foi adicionado, posteriormente, para uma concentração final de 2% (v/v) e a suspensão foi aquecida a 100 °C durante 10 min. Após centrifugação a 12 000 g durante 10 min a 4 °C, o sobrenadante foi recolhido para um novo tubo e conservado a -20 °C para posterior utilização.

### 2.5.2 Determinação da concentração de proteínas

As proteínas presentes numa alíquota de 100 µl foram precipitadas com 5% (v/v) de ácido tricloroacético, recolhidas por centrifugação e lavadas com acetona. Após secagem à temperatura ambiente, as proteínas foram ressuspensas em água ultra-pura contendo 2% (v/v) de SDS e aquecidas a 100 °C por 20 min. Foi determinada a absorvância de cada amostra a 260 nm utilizando o sistema Anthos Zenyth 3100 e comparada com uma curva de calibração com 'Bovine Serum Albumine' (BSA), obtida previamente utilizando diferentes concentrações de BSA em água ultra-pura com 2% (v/v) de SDS.

### 2.5.3 Análise dos extractos proteicos totais por SDS-PAGE

As proteínas foram analisadas por 'Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis' (SDS-PAGE) utilizando os géis Novex® de Tris-Glicina 12% (Invitrogen, Life Technologies), de acordo com as instruções do fabricante. A electroforese foi realizada em

condições desnaturantes, usando SDS como detergente aniónico, durante 1 h e 45 min a uma voltagem constante de 125 V. Os géis foram corados com a solução Coomassie® R-250. De modo a avaliar o conteúdo proteico de cada meio em análise, uma alíquota do meio não inoculado foi usada para extracção de proteínas e posterior análise via SDS-PAGE.

#### 2.5.4 Análise de dados

O 'software' BioNumerics (versão 4.61; Applied Maths, Kortrijk, Bélgica, 1998) foi utilizado para normalizar os perfis electroforéticos de proteínas e analisar as curvas densitométricas, utilizando o coeficiente de correlação de Pearson (r) e o método de aglomeração UPGMA. A reprodutibilidade do método foi determinada por cálculo da mediana da semelhança de 10% de réplicas. Este 'software' foi também utilizado para efectuar análise das bandas proteicas, sendo que a intensidade de cada banda foi determinada com base na altura máxima do pico da curva densitométrica. A intensidade relativa ( $I_{rel\ ij}$ ) de cada banda proteica foi determinada, usando uma folha de cálculo (Excel, Microsoft Corporation), do seguinte modo:

$$I_{rel\ ij} = a_{ij} / \sum_{i=1}^k a_{ij}$$

Sendo  $I_{rel\ ij}$  a intensidade relativa da banda  $i$  na 'lane'  $j$ ;  $a_{ij}$  a altura máxima do pico da curva

densitométrica da banda  $i$  na 'lane'  $j$ ;  $\sum_{i=1}^k a_{ij}$  a soma das alturas máximas dos picos da curva densitométrica das bandas  $i=1$  a  $i=k$  na 'lane'  $j$ . Cada 'lane' representa uma estirpe particular numa condição particular. Para testar a reprodutibilidade do método, os valores  $I_{rel\ ij}$  das amostras foram comparados com os valores das respectivas réplicas determinando-se o desvio padrão. Posteriormente, os valores de  $I_{rel\ ij}$  de um dado meio foram comparados com o mesmo valor na respectiva condição controlo e, de acordo com o desvio padrão determinado, esteleceram-se classes de regulação negativa, equivalente e positiva.

## 2.6. Pesquisa da presença e análise da expressão de genes de virulência

### 2.6.1 Extracção de DNA e RNA, quantificação e tratamento com DNase

Os 'pellets' das células recolhidas em fase exponencial tardia foram ressuspendidos em 250 µl Tris-EDTA ('Ethylenediamine tetra-acetic acid') contendo lisozima numa concentração de 10 mg/ml e incubados durante 1 h a 37 °C. O DNA total foi extraído pelo método do tiocianato de guanidina (53) e o RNA foi extraído utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen, Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de DNA e de RNA foram quantificadas por medição da absorvância a 260 nm utilizando o sistema Anthos

Zenyth 3100. Para calibração foram usadas amostras de DNA e RNA de concentrações conhecidas.

Para evitar a obtenção de resultados falsos positivos nas reacções de 'Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction' (RT-PCR), o DNA contaminante residual foi removido das amostras de RNA. Assim, cada 3 µg de RNA foram tratadas com 3 × 17 U DNase I (Invitrogen, Life Technologies) por incubação a 37 °C durante 45 min. A reacção foi terminada, após a adição de EDTA numa concentração final de 25 mM, por aquecimento a 65 °C durante 15 min. A eficiência do tratamento foi verificada por PCR dirigido para a amplificação do gene 'housekeeping' *rpoA*. A ausência de amplificação nas amostras de RNA confirma que o tratamento foi eficaz.

Após o tratamento com DNase, 2 µg de RNA de cada uma das amostras foi aplicada em gel de agarose 1% em tampão TBE (Tris Borato EDTA) a 0,5% e procedeu-se à electroforese a uma voltagem constante de 120 V durante 1 h e 30 min de modo a confirmar a integridade do RNA. O restante RNA tratado (1 µg) foi conservado a -80 °C para posterior utilização na síntese de cDNA.

#### 2.6.2 Amplificação por RT-PCR

Nas reacções de RT-PCR e de PCR todos os 'primers' e reagentes utilizados foram adquiridos à Invitrogen. As reacções de RT-PCR foram realizadas utilizando a enzima 'SuperScript™ III Reverse Transcriptase' de acordo com as instruções do fabricante, mas com modificações pontuais. Em suma, 210 ng de 'primers' aleatórios, 0,1 mM de desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) e água estéril tratada com 'Diethylpyrocarbonate' (DEPC) foram adicionados a 1 µg de RNA total para um volume final de 13 µl. A mistura foi aquecida a 65 °C durante 5 min, seguida da incubação em gelo durante pelo menos 1 min. Posteriormente, 4 µl de '5X First-Strand Buffer', 1 µl 0,1 M 'Dithiothreitol' (DTT), 1 µl 'RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor' (40 U/µl) e 0,5 µl de 'SuperScript™ III RT' (200 U/µl) foram adicionados à anterior mistura (volume final de 20 µl). É importante salientar que a concentração de enzima 'SuperScript™ III RT' utilizada neste trabalho é metade da recomendada pelo fabricante, pois estudos preliminares revelaram que nesta concentração os resultados obtidos eram idênticos aos obtidos com a concentração recomendada (dados não apresentados). As reacções de RT-PCR subsequentes foram realizadas no aparelho Thermo RoboCycler (Stratagene, La Jolla, EUA). As misturas foram colocadas a 25 °C durante 5 min seguido de um período de incubação a 50 °C durante 1 h. A enzima foi inactivada por aquecimento a 70 °C durante 15 min e a amostra de cDNA foi usada directamente para PCR. Foram efectuadas reacções controlo sem RNA ou sem 'SuperScript™ III RT' de modo a confirmar a especificidade do procedimento e em nenhuma destas reacções controlo se observou amplificação na reacção de PCR posterior.

### 2.6.3 Amplificação por PCR

DNA e cDNA foram posteriormente amplificados por PCR gene-específico. Os 'primers' usados para a amplificação dos genes de virulência, *cylB*, *cylA*, *cylI*, *agg*, *esp*, *efaA<sub>fm</sub>* e *efaA<sub>fs</sub>*, bem como os genes 'housekeeping', rDNA 16S and *rpoA*, estão indicados na Tabela Suplementar 2. Todos os 'primers' desenhados no decurso do presente estudo tiveram por base o genoma de *Enterococcus faecalis* V583 anteriormente publicado (GenBank, número de acesso AE016830) e a sequência completa da Ilha de Patogenicidade de *Enterococcus faecalis* MMH594 (GenBank, número de acesso AF454824). As reacções de PCR foram realizadas no aparelho Thermo RoboCycler (Stratagene, La Jolla, EUA) em tubos de 0,2 ml. As misturas de reacção continham tampão de PCR (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl; pH 8,4), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs), 0,5 µM de cada 'primer', 1 U de 'Taq DNA polymerase' e 1 µl de DNA ou cDNA. As amostras foram sujeitas a um ciclo de desnaturação inicial a 94 °C durante 5 min, seguido de 40 ciclos de: 94 °C durante 1 min, temperatura de 'annealing' durante um minuto (54 °C para *efaA<sub>fm</sub>*, 56 °C para *esp* e 57 °C para os restantes) e 72 °C durante 1 min; e uma etapa final de extensão de 72 °C durante 5 min. As amostras foram posteriormente conservadas a 4 °C. Controlos positivos e negativos foram sempre incluídos. Para visualização dos produtos de amplificação uma alíquota de 8 µl da mistura de PCR foi combinada com 2 µl de azul de bromofenol e a preparação foi sujeita a electroforese em gel de agarose 1% durante 1 h e 10 min a 85 V. O marcador de massa molecular '1 kb Plus DNA Ladder' foi aplicado em todos os géis de modo a confirmar a massa molecular dos produtos.

### 2.6.4 Análise de dados

As imagens dos produtos de amplificação de PCR presentes nos géis de agarose corados com brometo de etídio foram captadas fazendo uso do sistema 'Kodak 1D Image Analysis Software' (versão 3.5.2). Os amplicões foram posteriormente analisados com o 'software' ImageJ 1.40g (National Institutes of Health, EUA). Toda a área do fragmento foi seleccionada e o parâmetro da densidade integrada foi escolhido para posterior análise. Para comparar os efeitos produzidos pelas condições experimentais na expressão dos genes de virulência, cada valor da densidade integrada para estes genes foi normalizado usando o valor da densidade integrada obtida para os genes 'housekeeping' rDNA 16S ou *rpoA*. Todos os cálculos subsequentes foram efectuados numa folha de cálculo (Excel, Microsoft Corporation).

A análise da reprodutibilidade do trabalho experimental foi efectuada por cálculo dos desvios padrão considerando 10% de réplicas. O desvio padrão foi determinado para o conjunto de genes de virulência normalizados em relação aos genes rDNA 16S e *rpoA*. O desvio padrão foi igualmente determinado considerando cada gene individualmente

normalizado com rDNA 16S e com *rpoA*. A análise estatística ANOVA foi utilizada para testar a independência estatística entre valores de desvio padrão obtidos para os diferentes genes e entre os valores de expressão génica obtidos para as várias estirpes nas diferentes condições.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Análise da cinética de crescimento em estirpes de *Enterococcus*

Neste estudo utilizaram-se diversas condições com o intuito de simular a colonização de produtos alimentares e a infecção por estirpes de *Enterococcus*. Estas condições foram analisadas com recurso ao sistema 'Microbiology Workstation Bioscreen C®' de modo a caracterizar a cinética de crescimento destas estirpes (incluindo a variação da D.O., a taxa específica de crescimento e o tempo de latência). O método turbidimétrico do Bioscreen foi o seleccionado para o presente estudo visto ser uma boa alternativa à contagem de células viáveis, especialmente quando se pretende estudar o crescimento de várias estirpes nas diferentes condições e uma vez que o método tradicional (contagem de células viáveis) é muito moroso e exige um trabalho contínuo e intensivo (12, 45). Com os métodos turbidimétricos é possível acompanhar o crescimento da população bacteriana em tempo real através da medição da D.O. Apesar dos sistemas turbidimétricos não detectarem densidades celulares reduzidas (em geral inferiores a  $10^6$  bactérias/ml), eles têm grande importância prática quando se analisam suspensões com densidades celulares superiores a esse limite (11). Uma vez que a concentração celular utilizada ( $\sim 10^8$  UFC/ml) está acima do limiar de detecção do aparelho confirma-se uma vez mais a adequação do método do Bioscreen ao presente estudo. Devido à sua versatilidade, o Bioscreen tem sido utilizado em diversos estudos na área da microbiologia alimentar (10, 33), mas também noutras áreas (3, 36).

No presente estudo, a obtenção de parâmetros de crescimento através do Bioscreen C® revelou-se de grande importância pois permitiu a comparação directa entre estirpes e entre condições. Todas as estirpes analisadas apresentaram crescimento nas diferentes condições, independentemente da sua origem, embora os parâmetros de crescimento tenham variado de acordo com as condições estudadas. Não foi, no entanto, possível obter curvas de crescimento para 'skim milk' com adição de NaCl, uma vez que este sal promove a coagulação quase imediata do meio, tornando impossível a sua leitura no Bioscreen C®.

A análise global dos resultados sugere que o crescimento em cada uma das condições é estirpe-específico. Tal sucede uma vez que não parece existir uma relação entre a origem da estirpe e a melhor adaptação a uma dada condição de crescimento, não se tendo detectado diferenças significativas no crescimento de estirpes clínicas e alimentares quer

em meios que simulam ambientes de infecção (e.g. urina e soro), quer em meios que simulam colonização ambiental (e.g. 'skim milk') (ANOVA;  $P > 0,05$ ). Esta semelhança entre estirpes de enterococos está bem ilustrada nas condições analisadas, nomeadamente no que respeita à osmolaridade. As estirpes apresentam um crescimento semelhante até concentrações salinas de 2,5%, concentração usada frequentemente no fabrico de queijos tradicionais portugueses, mas esta capacidade de adaptação decresce cada vez mais em concentrações salinas mais elevadas (Figura Suplementar 2a e dados não apresentados). É importante destacar que o facto de uma estirpe ter origem alimentar não confere particular vantagem no crescimento em concentrações crescentes de sal ou em 'skim milk', quer a 30 quer a 37 °C (Figura Suplementar 2a e dados não apresentados). Considerando, como exemplo, o meio 2YT a 30 °C as estirpes que registaram maior crescimento foram, respectivamente, uma estirpe alimentar (QSE123, com  $\Delta A_{\max} = 0,92$ ;  $\mu_{\max} = 0,46 \text{ h}^{-1}$  e  $\text{lag} = 2,3 \text{ h}$ ) e uma clínica (V583, com  $\Delta A_{\max} = 0,84$ ;  $\mu_{\max} = 0,45 \text{ h}^{-1}$  e  $\text{lag} = 1,54 \text{ h}$ ). O mesmo sucedeu para os meios que simulam ambientes de infecção. Por exemplo na urina, a estirpe alimentar LA160 foi a estirpe que apresentou uma maior capacidade de adaptação ( $\Delta A_{\max} = 0,156$ ;  $\mu_{\max} = 0,196 \text{ h}^{-1}$  e  $\text{lag} = 0,167 \text{ h}$ ) (Figura Suplementar 2b). Curiosamente, para este meio apenas pequenas diferenças nos valores de IR foram detectadas considerando o conjunto das estirpes (valores entre 1,14 e 1,33), demonstrando que enterococos de origem alimentar apresentam uma capacidade de crescimento em urina semelhante à registada para as estirpes clínicas. A estirpe alimentar LA160 foi também uma das que apresentou parâmetros de crescimento mais elevados no soro ( $\Delta A_{\max} = 0,172$ ;  $\mu_{\max} = 0,087 \text{ h}^{-1}$  e  $\text{lag} = 0,0 \text{ h}$ ) (Figura Suplementar 2b), reflectindo assim uma grande capacidade de adaptação desta estirpe a meios relacionados com ambientes de infecção.

A semelhança entre as diversas estirpes de enterococos é também evidente quando se comparam os resultados obtidos nas diferentes temperaturas. As estirpes, tendencialmente, mostram uma maior capacidade de adaptação em 2YT ou 'skim milk' a 37 °C, o que foi demonstrado pela redução ou ausência de tempo de latência e uma maior taxa específica de crescimento. No entanto, uma vez adaptadas a uma temperatura inferior (30 °C), as estirpes mostraram-se capazes de alcançar valores máximos de D.O. semelhantes em ambas as temperaturas ou até mais elevadas a 30 °C ( $\Delta A_{\max}$  2YT a 37°C = 0,67 e  $\Delta A_{\max}$  2YT a 30°C = 0,75). Estes dados estão de acordo com os resultados anteriormente obtidos por Morandi *et al.* (2005), onde o tempo de geração das 21 estirpes analisadas num ensaio realizado em leite magro em pó variou entre 0,85 e 1,21 h a 25 °C e entre 0,44 e 0,67 h a 37 °C, evidenciando um aumento da taxa específica de crescimento a 37 °C.

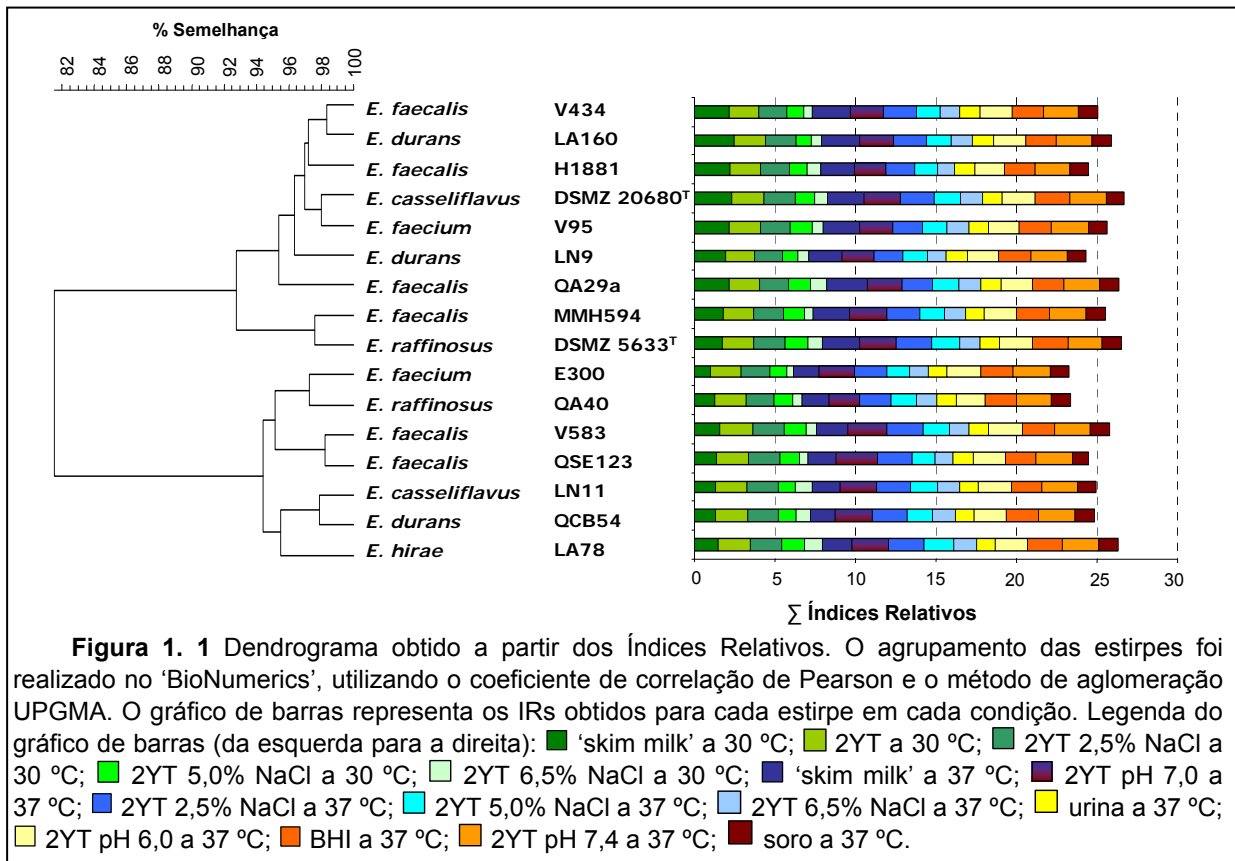
A análise global dos valores de IR obtidos (16 estirpes em 15 condições de crescimento em triplicado), permitiu concluir que as 16 estirpes seleccionadas crescem melhor em 2YT

pH 7,4 e pH 7,0 a 37 °C, com valores de IR de 2,23 e 2,18, respectivamente; o soro (pH 7,0 e 37 °C) e 2YT 6,5% NaCl pH 7,0 a 30 °C revelaram-se os meios com os valores de IRs mais baixos (1,18 e 0,74, respectivamente). A urina também apresentou um valor de IR reduzido (IR de 1,22), reflectindo a pouca diversidade de nutrientes presentes neste meio. Na verdade os valores mais baixos de D.O. ( $\Delta A_{max} < 0,15$ ) e taxa específica de crescimento ( $\mu_{max} < 0,14 \text{ h}^{-1}$ ) foram obtidos para o soro e para a urina. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores, em que se verificou que a estirpe *E. faecalis* MMH594 apresentava um valor de D.O. máximo, para o soro e urina, aproximadamente um *log* abaixo do registado após crescimento em 2YT (72).

Gardini *et al.* (2001) estudaram os efeitos das interacções da concentração salina, do pH e da temperatura nos parâmetros de crescimento de isolados de *E. faecalis*. Estes autores demonstraram que  $\mu_{max}$  era largamente afectado pela concentração salina, enquanto que a fase de latência era principalmente afectada pela temperatura. No presente estudo, tanto a temperatura como a concentração salina afectaram  $\mu_{max}$  e o período de latência (2YT a 30 °C:  $\mu_{max} = 0,45 \text{ h}^{-1}$  e *lag* = 1,51; 2YT a 37 °C:  $\mu_{max} = 0,61 \text{ h}^{-1}$  e *lag* = 0,02; 2YT 6,5% NaCl a 30 °C:  $\mu_{max} = 0,14 \text{ h}^{-1}$  e *lag* = 13,85; 2YT 6,5% NaCl a 37 °C:  $\mu_{max} = 0,21 \text{ h}^{-1}$  e *lag* = 4,19), embora as elevadas concentrações salinas tenham conduzido a maiores alterações nos dois parâmetros. As diferenças nos dois estudos poderão dever-se principalmente ao facto de neste estudo a amplitude de temperaturas testada (30 e 37 °C) ser inferior à realizada no estudo de Gardini e colaboradores (16 a 44 °C). Outros estudos realizados com *Listeria monocytogenes* (6) e *E. faecalis* (75), em que as estirpes foram expostas a condições de stress, tais como choque osmótico e aumento da concentração de sais biliares ou de SDS, também produziram alterações tanto no período de latência como na taxa específica de crescimento.

A totalidade dos dados foi ainda comparada com recurso a um dendrograma e à análise por PCA (Fig. 1.1 e dados não apresentados) e tornou óbvia a formação de 'clusters' de estirpes independentemente da sua origem e espécie, demonstrando uma vez mais que a adaptação a diferentes ambientes não está relacionada com estes parâmetros. No seu conjunto os resultados aqui obtidos indicam que no género *Enterococcus* existe um modo de crescimento estirpe-específico e comprovam uma vez mais a grande versatilidade destas bactérias, a qual lhes confere a capacidade de colonizar um vasto conjunto de nichos ecológicos.





**Figura 1. 1** Dendrograma obtido a partir dos Índices Relativos. O agrupamento das estirpes foi realizado no 'BioNumerics', utilizando o coeficiente de correlação de Pearson e o método de aglomeração UPGMA. O gráfico de barras representa os IRs obtidos para cada estirpe em cada condição. Legenda do gráfico de barras (da esquerda para a direita): ■ 'skim milk' a 30 °C; ■ 2YT a 30 °C; ■ 2YT 2,5% NaCl a 30 °C; ■ 2YT 5,0% NaCl a 30 °C; ■ 2YT 6,5% NaCl a 30 °C; ■ 'skim milk' a 37 °C; ■ 2YT pH 7,0 a 37 °C; ■ 2YT 2,5% NaCl a 37 °C; ■ 2YT 5,0% NaCl a 37 °C; ■ 2YT 6,5% NaCl a 37 °C; ■ urina a 37 °C; ■ 2YT pH 6,0 a 37 °C; ■ BHI a 37 °C; ■ 2YT pH 7,4 a 37 °C; ■ soro a 37 °C.

### 3.2. Análise de perfis diferenciais de proteínas totais

Para todas as estirpes crescidas nas diferentes condições em análise, foram obtidos perfis de proteínas totais com exceção para os crescimentos em 'skim milk'. Devido ao elevado conteúdo proteico e à coagulação do referido meio promovida pelas bactérias em estudo, as proteínas do leite eram muito mais abundantes do que as correspondentes aos perfis proteicos das estirpes, impedindo a análise posterior. Por este motivo, os ensaios realizados em 2YT com concentração salina de 2,5%, 5,0% e 6,5% a 30 °C foram comparados com 2YT (concentração 'standard') de forma a analisar a influência do aumento da concentração de NaCl nas proteínas expressas pelos enterococos em análise.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem uma vez mais a existência de semelhanças entre estirpes clínicas e alimentares. Os dendrogramas obtidos a partir dos perfis de proteínas totais revelaram que as estirpes se agrupam independentemente da sua origem ou espécie. Tal é bem ilustrado pelos dois 'clusters' (I e II) obtidos para a maioria das condições testadas (Figura Suplementar 3 e dados não apresentados). Cada 'cluster' inclui estirpes alimentares e clínicas assim como estirpes de diferentes espécies. No 'cluster' I as estirpes apresentam valores de semelhança entre 66% e 91%, enquanto no 'cluster' II se observam valores de semelhança superiores, entre 79% e 94%. A maior semelhança entre as estirpes do 'cluster' II é igualmente sugerida pela análise do conjunto dos

dendrogramas, uma vez que as estirpes agrupadas no 'cluster' I apresentam sempre semelhanças inferiores (entre 56% e 72%) às do 'cluster' II (73% e 89%).

Os isolados *E. faecalis* MMH594 e V583 apresentaram uma semelhança superior a 92% na maioria das condições (Figura Suplementar 3 e dados não apresentados). Estudos anteriores sugeriram que estas duas estirpes se encontram clonalmente relacionadas (50, 68) e a sua semelhante adaptação aos diferentes meios parece corroborar esta hipótese.

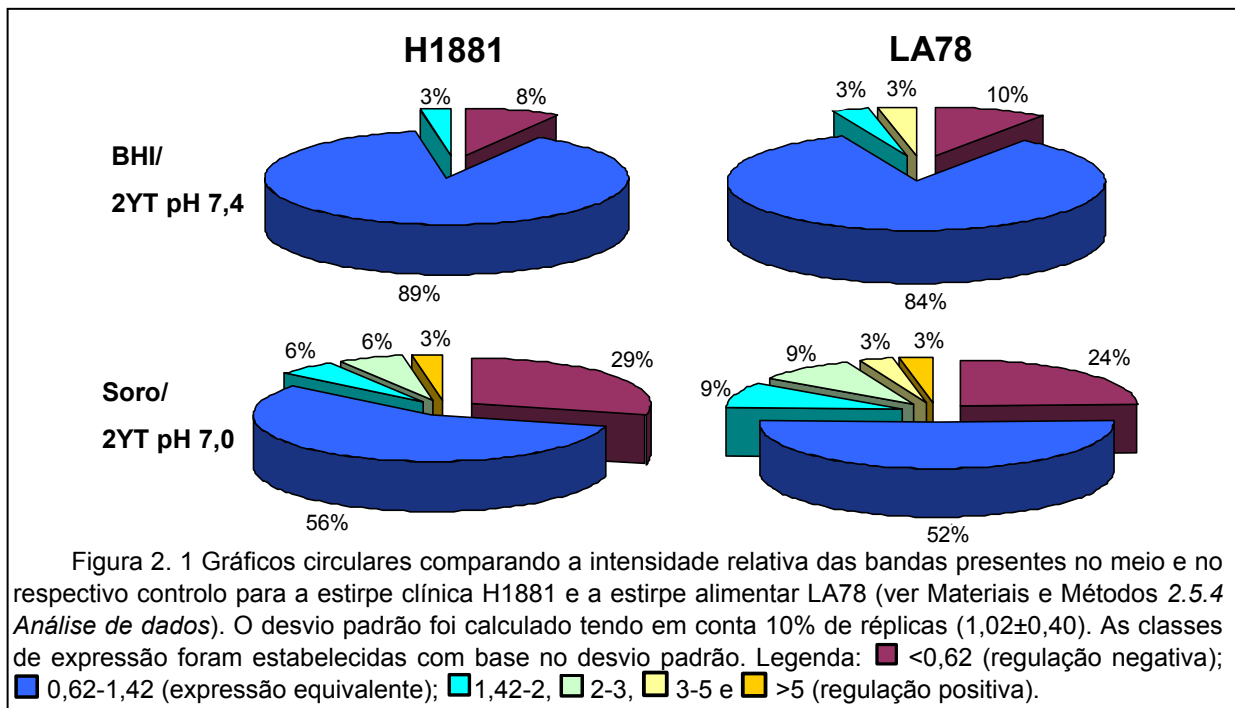
Tal como esperado, as diferenças nos perfis proteicos são mais evidentes quando se comparam as diversas estirpes após crescimento numa mesma condição, do que entre os perfis da mesma estirpe obtidos após crescimento nas diferentes condições em análise. Para este último caso, a semelhança entre os perfis referentes à maioria das condições foi superior a 80% (dados não apresentados). Estes resultados indicam que a adaptação de um isolado a diferentes ambientes envolve modificações subtis e particulares no seu proteoma, existindo um conjunto base de proteínas que são sempre expressas, independentemente do ambiente em questão. Os meios para os quais se registaram maiores diferenças nos perfis proteicos relativamente aos respectivos controlos foram o soro, a urina e 2YT com elevada concentração salina (Fig. 2.1 e dados não apresentados). Estas diferenças de expressão (aumento ou diminuição da expressão e presença/ausência de determinadas proteínas) sugerem uma resposta activa dos enterococos ao ambiente circundante, bloqueando a expressão de proteínas desnecessárias e expressando outras que de algum modo lhes conferem uma maior adaptabilidade ao novo ambiente.

Giard e colaboradores (2001) realizaram um estudo que visou a análise do proteoma de stress de *E. faecalis*. O estudo conduziu à identificação de quatro grupos distintos de proteínas que foram estabelecidos de acordo com a sua função e regulação. Um desses grupos era constituído por proteínas envolvidas em processos de resposta a stress, anteriormente caracterizados, e incluía as proteínas Gls62-67 'General stress proteins', as quais se verificou serem induzidas por pelo menos seis condições de stress (e.g. presença de 2,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou 0,08% de sais biliare). Outro dos grupos de proteínas identificado incluía proteínas que eram expressas em situações de escassez de glucose.

No presente estudo várias das condições analisadas constituem ambientes de stress para o crescimento dos enterococos, nomeadamente meios com elevado teor salino e urina. Sendo assim, essas condições deverão conduzir a uma expressão elevada de proteínas de stress, bem como de 'chaperones' e, na urina, a maquinaria envolvida na resposta à escassez de glucose também deverá estar activada. Para confirmar estes pressupostos será necessário realizar estudos adicionais que confirmem uma relação directa entre estes meios e a activação de proteínas associadas à resposta ao stress.

Num outro estudo, Hew *et al.* (2007) analisaram o nível de expressão do mRNA de vários genes associados à virulência em estirpes de *E. faecalis*. A análise foi feita em vários

meios de crescimento, incluindo LB com 6,5% NaCl e LB com pH 5,0. Nestas duas condições o gene *gls24*, envolvido na resposta à escassez de glucose e anteriormente identificado como codificante para uma proteína importante na resposta a diferentes condições de stress (20), encontrava-se sobreexpresso, sugerindo assim uma elevada expressão de proteínas de resposta geral ao stress em ambos os meios. Shepard e Gilmore (2002) também analisaram a expressão do gene *gls24* mas após o crescimento em soro e urina. Em ambos os meios, este gene encontrava-se sobreexpresso reflectindo que as características destes meios poderão constituir um stress para a célula. É de esperar que no presente estudo a proteína GlS24 seja expressa, tanto no soro e na urina como em 2YT com elevada concentração salina ou com pH 6,0. É necessário conduzir novos estudos utilizando a electroforese bidimensional (2-DE) de modo a avaliar o aumento da expressão desta proteína nas referidas condições.



Um estudo recente realizado por Solheim e colaboradores (2007) analisou o transcriptoma da estirpe *E. faecalis* V583 em resposta e diferentes concentrações de sais biliares bovinos e de SDS. Os resultados revelaram que diferentes mecanismos deverão estar envolvidos na resistência a estes dois detergentes, uma vez que cada composto induziu um perfil de expressão diferencial. Esta resposta específica para cada meio está de acordo com os resultados obtidos na presente análise uma vez que diferentes perfis proteicos foram obtidos após o crescimento de uma estirpe em diferentes condições. Apesar de neste estudo a técnica de electroforese bidimensional não ter sido aplicada, as diferenças encontradas por comparação de uma dada condição experimental e o seu respectivo controlo revelaram a presença de proteínas diferencialmente expressas que

poderão estar envolvidas quer na resposta a condições de stress quer em mecanismos de virulência.

No soro, as estirpes *E. faecalis* H1881 (estirpe clínica) e *E. raffinosus* QA40 (estirpe alimentar) apresentaram uma elevada expressão de uma proteína diferencial de ~32 kDa. No caso da estirpe H1881 a intensidade relativa desta proteína ( $I_{rel\ ij}$ ) foi de 8,1%, enquanto que a mediana da intensidade relativa das proteínas nesta condição foi inferior a 2,0%. Para a estirpe QA40 a intensidade relativa da proteína de ~32 kDa apresentou ainda níveis mais elevados (13,9%), sendo que a mediana da intensidade relativa por proteína foi semelhante à registada para a estirpe H1881. Através da análise da Figura Suplementar 4 é possível verificar que a expressão desta proteína não parece estar relacionada quer com a origem da estirpe quer com a sua espécie, uma vez que a proteína é expressa nalgumas estirpes clínicas (e.g. H1881) e alimentares (e.g. QA40), mas encontra-se igualmente ausente noutras estirpes com estas mesmas origens (e.g. MMH594 e QA29a). Adicionalmente, também não se verificou qualquer relação com a espécie, isto porque esta proteína foi detectada em apenas alguns isolados de uma dada espécie (e.g. *E. raffinosus* QA40 expressa a proteína e *E. raffinosus* DSMZ 5633<sup>T</sup> não expressa). De notar ainda que outra proteína de massa molecular próxima dos 32 kDa foi igualmente identificada tanto no soro como no controlo, mas a análise cuidada da Figura Suplementar 4, em particular da estirpe *E. faecalis* H1881, permite concluir que as proteínas são distintas.

Mais estudos serão necessários para identificar o papel desta proteína de ~32 kDa na adaptação dos enterococos ao soro e também para avaliar se existe ou não algum envolvimento da mesma na patogenicidade destas bactérias.

### 3.3. Pesquisa da presença e análise da expressão de genes de virulência

A expressão de oito genes associados à virulência foi analisada nas dezasseis estirpes de enterococos. Os genes de virulência seleccionados para este estudo já tinham sido anteriormente relacionados com a patogenicidade deste género bacteriano (29, 34, 40, 64, 69, 70, 73) e codificam para proteínas envolvidas no processo de adesão (crucial para o processo de infecção) e para proteínas do operão *cyl* que codifica para a citolisina (importante toxina celular). Apesar da expressão destes genes variar ao longo do ciclo de vida destas bactérias, foi anteriormente demonstrado que para a maioria destes genes os níveis de mRNA em 2YT, soro e urina decrescem, tendencialmente, da fase exponencial para a estacionária (72), razão pela qual no presente estudo a fase exponencial tardia foi a seleccionada para extracção de RNA.

De todos os meios analisados só não foi efectuada a extracção de RNA de 'skim milk' com adição de NaCl a 37 °C, uma vez que a rápida coagulação do meio dificultou a extracção do RNA e a obtenção de mRNA intacto.

Numa primeira fase a presença/ausência dos genes de virulência foi confirmada por PCR gene-específico. A dimensão dos diferentes produtos de amplificação foi confirmada e comparada com a dimensão do produto obtido para a estirpe *E. faecalis* MMH594 a qual possui todos os genes em análise ou numa ilha de patogenicidade (operão *cyl*, *agg* e *esp*) ou noutros locais do genoma (*efaA<sub>fs</sub>*) (68), com excepção do gene *efaA<sub>fm</sub>* cujo produto de amplificação obtido para cada uma das estirpes foi comparado com o da estirpe controlo *E. faecium* F10. Os resultados obtidos por PCR estão sumarizados na Tabela Suplementar 3. Em seis das estirpes analisadas houve amplificação de pelo menos seis genes. Destas seis estirpes três são alimentares (*E. casseliflavus* LN11, *E. faecalis* QA29a e QSE123), duas são clínicas (*E. faecalis* MMH594 e *E. faecium* V95) e uma é estirpe de referência (*E. casseliflavus* DSMZ 20680<sup>T</sup>). Considerando todos os genes de virulência analisados, para as estirpes clínicas obtiveram-se 54,2% de resultados positivos, com amplificação de pelo menos três genes, enquanto que para as alimentares foram obtidos 50,0% de resultados positivos, com amplificação de pelo menos dois genes, uma vez mais confirmando o potencial patogénico destas estirpes, o qual já tinha sido sugerido em estudos anteriores (65, 66).

Para cada estirpe a expressão dos genes de virulência presentes no seu genoma foi analisada por RT-PCR. A visualização dos fragmentos de amplificação no gel de agarose foi o limite seleccionado para considerar um valor positivo de expressão. A técnica de RT-PCR não é uma técnica quantitativa e neste estudo apenas se pretendeu fazer uma análise semi-quantitativa, com base nos limites de resolução do gel de agarose. Para a normalização da expressão foram utilizados dois genes 'housekeeping': rDNA 16S e *rpoA*, o primeiro revelou ser aquele cuja expressão se manteve mais constante para a maioria das estirpes considerando todas as condições analisadas. Tal poderá estar relacionado com o facto deste gene se encontrar em cópia múltipla no genoma e por isso ter uma elevada expressão, menos susceptível a variações do meio. Adicionalmente, o valor de desvio padrão obtido após normalização com rDNA 16S ( $s \pm 0,092$ ) foi também inferior ao registado após normalização com *rpoA* ( $s \pm 0,099$ ). O desvio padrão foi igualmente determinado considerando cada gene individualmente após a normalização com rDNA 16S (valores de desvio padrão entre  $\pm 0,000$  e  $\pm 0,216$ ) e com *rpoA* (valores de desvio padrão entre  $\pm 0,000$  e  $\pm 0,231$ ). Tendo em conta que se verificaram diferenças significativas entre os diferentes genes (ANOVA;  $P < 0,01$ ), foi adoptado um desvio padrão específico para cada gene.

Os valores de expressão génica obtidos para as estirpes em análise em cada meio foram comparados com os mesmos valores na respectiva condição controlo de modo a avaliar se as características de um dado meio promovem ou diminuem a expressão de um dado gene ou conjunto de genes. Um dos meios que mais parece estimular a expressão dos genes de virulência é o soro, tal é particularmente evidente para as estirpes clínicas (Figura

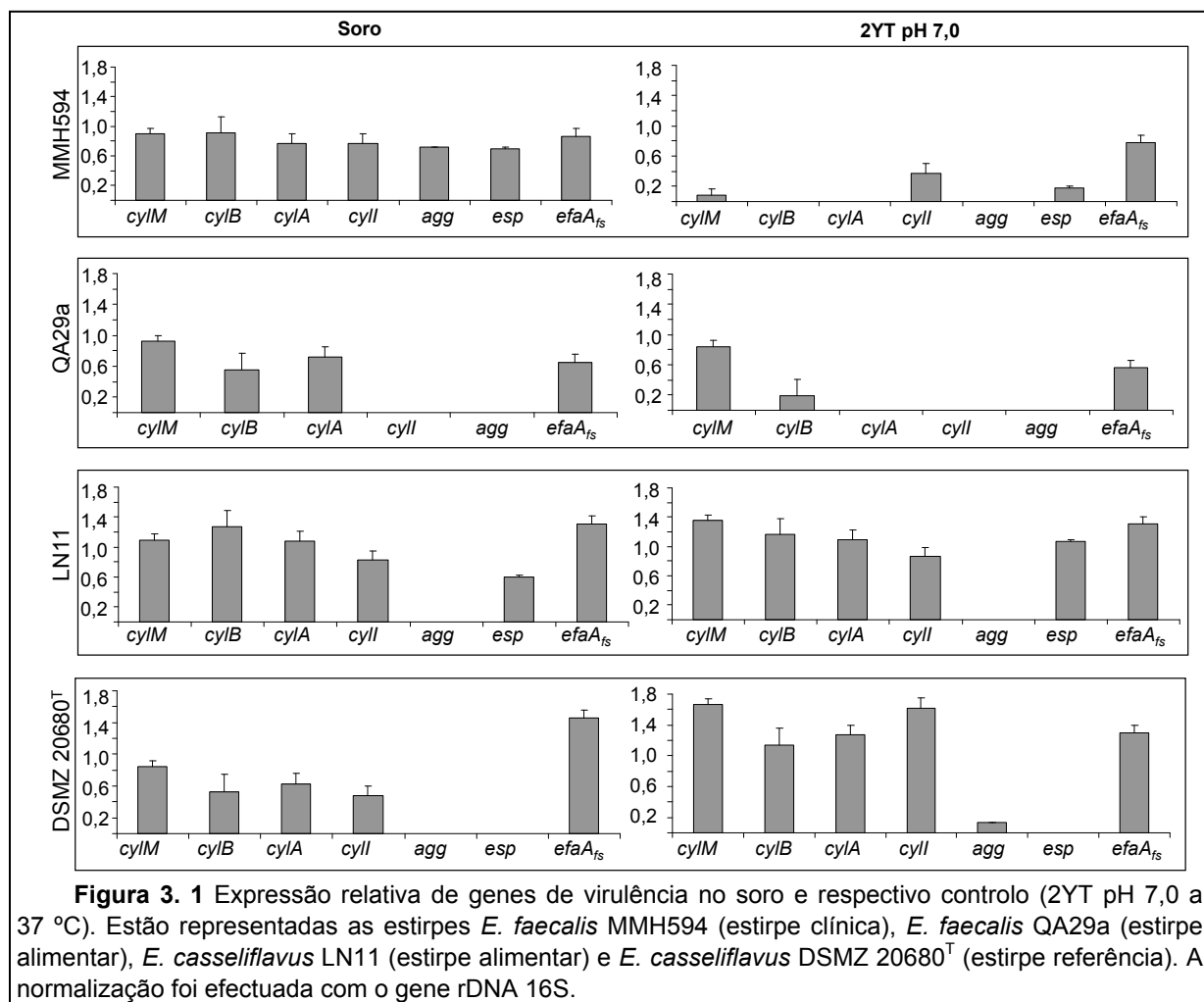
Suplementar 5) e está de acordo com os dados obtidos por Shepard e Gilmore (2002), os quais verificaram que, de algum modo, as propriedades do soro induziam a expressão de genes de virulência na estirpe *E. faecalis* MMH594. Estas propriedades do soro deverão induzir a activação quer dos genes que codificam para as adesinas quer os do operão *cyI*, promovendo assim, respectivamente, a adesão e lise das células do hospedeiro. No que diz respeito à urina, esta condição não parece promover uma maior expressão destes genes quando comparada com a condição controlo (2YT pH 6,0) (Figura Suplementar 5), considerando o conjunto das estirpes e ao contrário do que tinha sido anteriormente sugerido (72). Quando se procedeu à análise do efeito do pH na expressão génica, verificou-se que vários genes de virulência se encontravam sobreexpressos no meio 2YT pH 6,0 quando comparado com 2YT pH 7,0. Esta influência do pH poderá explicar o facto de não se terem observado diferenças evidentes entre a urina e o controlo (2YT pH 6,0) e também justificar as diferenças registadas entre o estudo aqui apresentado e o realizado por Shepard e Gilmore (2002), uma vez que a condição usada como controlo diferiu nos dois estudos. No presente estudo e ao contrário do estudo de Shepard e Gilmore (2002) o pH do meio 2YT foi ajustado para 6,0 para ser utilizado como controlo para a urina (pH 6,0). O outro meio que visava a simulação de condições de infecção (BHI) apresentou um baixo nível de expressão para a maioria dos genes e sempre relativamente próxima do controlo (2YT pH 7,4) (Figura Suplementar 5 e dados não apresentados). Tal poderá mais uma vez estar relacionado com o pH, uma vez que os genes de virulência em 2YT pH 7,4 se encontram subexpressos relativamente ao 2YT pH 7,0, ou poderá estar relacionado com a própria composição do meio.

A análise das condições que simulam ambientes de colonização ('skim milk' com diferentes concentrações de NaCl e a diferentes temperaturas), revelou que, para a maioria destas condições, os genes de virulência se encontravam subexpressos relativamente ao respectivo controlo (Figura Suplementar 5). Nas estirpes alimentares tal foi ainda mais evidente. Curiosamente, para o 'skim milk' a 37 °C tanto os genes do operão *cyI* como as adesinas se encontravam sobreexpressas relativamente ao controlo (2YT pH 7,0 a 37 °C). No seu conjunto, estes resultados sugerem que os meios que simulam ambientes de infecção têm maior capacidade de estimular a expressão dos genes de virulência do que o 'skim milk' a 30 °C. No entanto, quando o crescimento em 'skim milk' ocorre a 37 °C (temperatura corporal humana) a expressão dos factores de virulência parece aumentar. Quando se procedeu à análise do efeito da temperatura na expressão dos genes de virulência verificou-se que a maioria dos meios apresentava iguais níveis de expressão ou níveis superiores a 37 °C, em particular no que diz respeito ao nível de expressão das adesinas (Figura Suplementar 5). Tal poderá querer sugerir que alguns destes genes terão um mecanismo de expressão dependente da temperatura, constituído um mecanismo

evolutivo que leva ao aumento da expressão de factores de virulência quando estes microrganismos se encontram dentro do hospedeiro, como é o caso do Homem. Relativamente ao efeito da osmolaridade verificou-se que a adição de NaCl ao meio 2YT parece promover o aumento da expressão dos genes de virulência, especialmente das adesinas, no caso das estirpes clínicas (Figura Suplementar 5). A análise do 'skim milk' para estas mesmas estirpes revelou que a adição de NaCl leva a uma sobreexpressão, embora reduzida, no caso das adesinas. Curiosamente, para as estirpes alimentares a adição de NaCl parece ter um efeito distinto uma vez que as adesinas se encontram subexpressas, apresentando apenas valores de expressão mais elevados para 2YT com 6,5% de NaCl (30 °C) e 'skim milk' com 6,5% de NaCl. As estirpes alimentares poderão porventura estar mais adaptadas a alterações de osmolaridade e daí que a maquinaria de expressão destes genes não seja tão susceptível a estas variações.

Embora a análise relativa de um meio em comparação com o seu controlo permita sugerir que as estirpes alimentares apresentam uma menor capacidade de aumentar a expressão dos genes de virulência, através da análise do conjunto dos meios (condições em análise e controlos) verificou-se que o número de genes de virulência expressos na totalidade das condições e o seu nível de expressão, depois de normalizado com o gene 'housekeeping' rDNA 16S, foi maior para as estirpes alimentares do que para as estirpes clínicas (dados não apresentados). Estes resultados evidenciam a capacidade das estirpes alimentares para activar a maquinaria de expressão génica independentemente do meio de crescimento. Este comportamento das estirpes alimentares é bem ilustrado pela estirpe *E. casseliflavus* LN11 para a qual a expressão da maioria dos genes de virulência se encontra activada, tanto em meios que simulam ambientes de infecção (e.g. soro) como em meios que simulam colonização ambiental ('skim milk') (Fig. 3.1 e Figura Suplementar 6). A análise das duas estirpes da espécie *E. casseliflavus* representadas, LN11 e DSMZ 20680<sup>T</sup>, permite concluir que estas possuem um genótipo idêntico (Tabela Suplementar 3) e também um padrão de expressão muito semelhante (Fig. 3.1 e Figura Suplementar 6). As maiores diferenças entre estas estirpes residem na expressão dos genes *agg* e *esp*. Por comparação da expressão génica das quatro estirpes representadas na Figura Suplementar 6 é ainda possível observar que apenas a estirpe clínica *E. faecalis* MMH594 apresenta diferenças óbvias entre o meio 'skim milk' com 2,5% NaCl a 30 °C e a sua condição controlo (2YT com 2,5% NaCl a 30 °C), sendo que no 'skim milk' os genes de virulência se encontram negativamente regulados. A comparação entre o soro e o controlo (2YT pH 7,0) permite verificar que nem todas as estirpes alimentares têm igual capacidade de activar a maquinaria de expressão génica independentemente do meio (Fig. 3.1), uma vez que para a estirpe *E. faecalis* QA29a a expressão dos genes de virulência parece ser induzida na presença de soro, tal como sucede para a estirpe clínica *E. faecalis* MMH594. No entanto,

diferenças entre estas duas estirpes de *E. faecalis* podem ser observadas pela análise da Figura Suplementar 6. A globalidade dos resultados para o conjunto das 16 estirpes sugere que, apesar de poderem existir semelhanças pontuais, a expressão dos genes de virulência em resposta às diferentes condições parece não estar directamente relacionado com a origem ou espécie, mas sim ser estirpe-específico.



Para além de uma análise global, procedeu-se também a uma análise individual de cada gene. No que diz respeito ao operão *cyl<sub>L</sub>L<sub>S</sub>MBAI* foi avaliada a expressão de quatro dos seis genes. Este operão é transcrito a partir do promotor P<sub>L</sub> e pode originar dois transcritos diferentes: um mais curto, se a transcrição terminar na região do atenuador entre o gene *cyl<sub>L</sub>* e o gene *cyl<sub>M</sub>*, ou um transcrito mais longo, se ocorrer transcrição de todos os genes (69). Considerando todas as condições, incluindo os controlos, a expressão de *cyl<sub>M</sub>* e *cyl<sub>B</sub>* foi detectada em 88,0% e 88,1% dos casos, respectivamente, a expressão de *cyl<sub>A</sub>* foi detectada em 82,5% dos casos e a de *cyl<sub>L</sub>* só foi detectada em 68,1% dos casos, reflectindo a direcionalidade do operão. A análise dos resultados obtidos para a estirpe clínica *E. faecalis* MMH594 (Fig. 3.1 e dados não apresentados) mostra que não foram detectadas diferenças significativas entre a expressão dos genes *cyl* na urina e no respectivo controlo



(ANOVA;  $P > 0,1$ ), enquanto no soro a expressão destes genes aumentou significativamente (ANOVA;  $P < 0,001$ ), estando de acordo com os resultados apresentados na Figura Suplementar 5 para o conjunto das estirpes clínicas. No soro o gene *cyIM* apresenta um aumento da expressão génica de aproximadamente nove vezes em comparação com o controlo e os genes *cyIB* e *cyIA* apenas foram detectados neste meio (Fig. 3.1). Este aumento da expressão dos genes do operão *cyI* está de acordo com os resultados anteriormente obtidos (72), embora diferenças nos níveis de expressão tenham sido detectadas. Estudos posteriores que conduzam a um maior conhecimento sobre o modo como o mRNA do operão *cyI* é processado, sobre a sua estabilidade e degradação, são ainda necessários para que se possa compreender melhor os mecanismos que regulam a expressão génica deste operão.

Nesta análise, o gene que codifica para a substância de agregação, *agg* ou *asa*, foi o menos expresso, considerando o conjunto das condições em análise e os controlos, seguido do gene *esp* que codifica para uma proteína de superfície em *Enterococcus* (dados não apresentados). De acordo com os resultados anteriormente obtidos por Shepard e Gilmore (2002) para a estirpe *E. faecalis* MMH594, também no estudo por nós apresentado, o gene *agg* se encontra sobreexpresso tanto no soro como na urina (Fig. 3.1 e dados não apresentados). No entanto estes resultados não são extensíveis a todas as estirpes incluídas neste estudo (Fig. 3.1 e dados não apresentados). Por sua vez, Hew e colaboradores (2007) verificaram que o gene *agg* se encontrava subexpresso na generalidade das condições analisadas (e.g. BHI e LB com 6,5% NaCl) o que se assemelha aos resultados obtidos neste estudo, uma vez que este gene foi dos menos expressos no conjunto de todas as condições e controlos, tal como anteriormente referido (dados não apresentados). Para o gene *esp*, a estirpe MMH594 apenas apresentou sobreexpressão no soro, ao contrário dos dados obtidos por Shepard e Gilmore (2002), onde se verificou sobreexpressão deste gene tanto para o soro como para a urina. Tal como anteriormente mencionado, a condição controlo utilizada nos dois estudos foi diferente e os resultados aqui obtidos sugerem que existem diferenças na expressão dos genes de virulência induzidos por alterações no pH do meio (Figura Suplementar 5). A análise das condições que simulam a colonização de leites e queijos, por parte das estirpes de enterococos, sugere que nem a substância de agregação nem o gene *esp* se encontram sobreexpressos quando comparados com os controlos respectivos. Assim, estes genes não deverão conferir uma melhor capacidade de adaptação a estas condições (dados não apresentados).

O gene *efaA<sub>fs</sub>* (antigénio semelhante a adesinas isolado a partir do soro de indivíduos com endocardite provocada por *E. faecalis*) foi detectado no genoma de todas as estirpes analisadas, independentemente da origem ou da espécie. Estudos anteriores já tinham descrito a elevada incidência deste gene nos isolados de enterococos (14, 66), sugerindo

que este gene não é específico da espécie *E. faecalis*. Por outro lado, o gene *efaA<sub>fm</sub>* (antígeno semelhante a adesinas isolado a partir do soro de indivíduos com endocardite provocada por *E. faecium*) foi apenas detectado em duas estirpes, pertencentes a *E. faecium* e *E. durans*, evidenciando que nem todas as estirpes de *E. faecium* apresentaram o gene (Tabela Suplementar 3). Estes resultados já se tinham verificado em estudo anteriores (14, 66). Futuramente, será necessário proceder à sequenciação dos genes *efaA<sub>fs</sub>* e *efaA<sub>fm</sub>* de modo a poder avaliar a semelhança destes genes entre diferentes isolados de *Enterococcus*.

A análise da expressão do gene *efaA<sub>fs</sub>* para a estirpe *E. faecalis* MMH594 revelou um aumento de 1,1 vezes e 1,4 vezes quando se compara, respectivamente, o soro e a urina com as suas condições controlo (2YT pH 7,0 e pH 6,0). Num estudo anterior (72) verificou-se que a expressão de *efaA<sub>fs</sub>* na estirpe MMH594 era dependente do meio e foi observado um aumento de 66 vezes e 89 vezes para o soro e urina, respectivamente, quando comparados com 2YT. As diferenças entre os dois estudos poderão estar relacionadas com o tipo de técnica utilizada, uma vez que no presente estudo foi utilizada a estratégia de RT-PCR, a qual é menos sensível que a técnica de 'Real-Time' PCR utilizada por Shepard e Gilmore (2002). É de salientar que em ambos os estudos o aumento na expressão relativa de *efaA<sub>fs</sub>* para a estirpe MMH594 foi maior na urina do que no soro, quando comparados com a condição controlo. No estudo de Hew *et al.* (2007), os autores mostraram que o gene *efaA<sub>fs</sub>* se encontrava sobreexpresso no meio BHI e subexpresso em LB com 6,5% NaCl a 37 °C. Tal não sucedeu no presente estudo uma vez que a expressão de *efaA<sub>fs</sub>* em 2YT com 6,5% NaCl a 37 °C foi para algumas estirpes mais elevada do que a expressão deste gene em 2YT com concentração 'standard' de NaCl (dados não apresentados). O contrário se verificou para BHI em que o gene *efaA<sub>fs</sub>* se encontrava subexpresso para a maioria das estirpes quando comparado com o controlo. Hew e colaboradores (2007), tal como Shepard e Gilmore (2002), utilizaram a técnica de 'Real Time' PCR. Nesta técnica os fragmentos amplificados estão na ordem dos 100-150 bp, enquanto que os fragmentos amplificados neste estudo têm entre os 444 e os 907 bp. A detecção de fragmentos de menor dimensão poderá ser mais fácil e justificar algumas das diferenças encontradas entre o presente estudo e os estudos anteriormente mencionados. De acordo com os resultados aqui obtidos, o gene *efaA<sub>fs</sub>* parece ser amplamente expresso entre as estirpes de enterococos apesar deste ter sido inicialmente identificado como um factor de virulência associado a endocardites e induzido pelo crescimento em soro (40). Na verdade, durante o presente estudo a expressão do gene *efaA<sub>fs</sub>* foi detectada em 98,8% dos casos, considerando todas as estirpes e condições (meios e controlos). Não se observaram diferenças relevantes entre as condições em análise e os respectivos controlos. Low e colaboradores (2003) mostraram que a expressão do operão *efaCBA* (transportador putativo

do tipo ABC) é regulada por manganésio ( $Mn^{2+}$ ). Na presença de pequenas quantidades de  $Mn^{2+}$  (inferiores a 10 mM), pensa-se que o complexo EfaCBA actue como uma permease de manganésio de alta afinidade (39). Assim, ou a composição dos meios utilizados neste estudo é sempre suficientemente baixa para despoletar a expressão do complexo EfaCBA ou este complexo tem um papel mais abrangente no funcionamento da célula. Relativamente ao soro, sabe-se que neste meio a concentração de  $Mn^{2+}$  é muito reduzida, daí a activação deste gene (40). O mesmo sucede para o BHI, para o qual já foi demonstrado que, apesar da concentração de  $Mn^{2+}$  rondar os 26 mM, apenas cerca de 5 mM se encontra livre (79). No que diz respeito à urina, ao 'skim milk' e ao 2YT, não foi possível obter informação sobre o conteúdo de  $Mn^{2+}$  destes meios. Será necessário determinar a composição destes meios de modo a avaliar se o conteúdo de manganésio é igualmente inferior a 10 mM e assim poder conduzir à activação da expressão do operão *efaCBA*.

#### 4. CONCLUSÕES

Vários estudos anteriores tiveram por objectivo comparar estirpes clínicas e alimentares em termos de propriedades bioquímicas, factores de virulência ou resistência a antibióticos e os resultados revelaram que estirpes clínicas e alimentares poderão apresentar algumas semelhanças (14, 38, 52, 62, 65, 66). No presente estudo, pretendeu comparar-se estirpes alimentares e clínicas em termos de parâmetros de crescimento, perfis de proteínas totais e expressão de genes de virulência. A globalidade dos resultados obtidos aponta mais uma vez para uma semelhança entre estirpes clínicas e alimentares e mais do que isso evidenciam que o comportamento dos enterococos é estirpe-específico e por isso independente quer da origem quer da espécie. No entanto, a análise da expressão génica revelou que as estirpes alimentares e clínicas poderão ter formas diferentes de activação da maquinaria de expressão génica em resposta ao meio. Enquanto as estirpes clínicas parecem activar a expressão dependendo do tipo de meio, as estirpes alimentares parecem ter expressão de grande parte dos genes aqui analisados, independentemente da condição.

Embora outros estudos de expressão génica, tanto ao nível do RNA como das proteínas, já tenham sido anteriormente conduzidos (20, 24, 25, 72, 75), não é do nosso conhecimento que algum estudo, para além do que é aqui apresentado, tenha combinado tantas condições ambientais, origens e espécies de enterococos. Os estudos realizados anteriormente quer com RNA ou com proteínas visaram o estudo, quase exclusivo, de estirpes de *E. faecalis*, levando a que a informação sobre o comportamento de outras espécies seja ainda muito escassa. O presente estudo permitiu aumentar o conhecimento sobre a expressão génica dos enterococos e o modo como estes procariotas lidam com

alterações ambientais. Embora algumas das estirpes analisadas pareçam apresentar características que poderão promover a sua virulência, independentemente do seu nicho ecológico, são necessários estudos adicionais para comprovar a patogenicidade destas estirpes *in vivo*.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Aarestrup, F. M., P. Butaye, and W. Witte.** 2002. Nonhuman reservoirs of enterococci, p. 55–99. *In* M. S. Gilmore, D. B. Clewell, P. Courvalin, G. M. Dunne, B. E. Murray, and L. B. Rice (ed.), *The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
2. **Alves, P. I., M. P. Martins, T. Semedo, J. J. Figueiredo Marques, R. Tenreiro, and M. T. Barreto Crespo.** 2004. Comparison of phenotypic and genotypic taxonomic methods for the identification of dairy enterococci. *Antonie Van Leeuwenhoek* **85**:237-52.
3. **Antonov, V. S., T. A. Kulikova, L. A. Shestakova, and A. N. Shibarov.** 1991. [A method of determining the degree of bacteriuria and its detection using the Bioscreen system]. *Antibiot Khimioter* **36**:28-30.
4. **Barbosa, J., V. Ferreira, and P. Teixeira.** 2007. Biofilm development by *Enterococcus* spp. isolated from traditional fermented meat products and potential correlations with some virulence factors. *J Biotechnol* **131S**:S251
5. **Bonten, M. J., R. Willems, and R. A. Weinstein.** 2001. Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from? *Lancet Infect Dis* **1**:314-25.
6. **Cheroutre-Vialette, M., I. Lebert, M. Hebraud, J. C. Labadie, and A. Lebert.** 1998. Effects of pH or *a(w)* stress on growth of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* **42**:71-7.
7. **Chow, J. W., L. A. Thal, M. B. Perri, J. A. Vazquez, S. M. Donabedian, D. B. Clewell, and M. J. Zervos.** 1993. Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* **37**:2474-7.
8. **Clewell, D. B.** 1990. Movable genetic elements and antibiotic resistance in enterococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **9**:90-102.
9. **Coburn, P. S., A. S. Baghdayan, G. T. Dolan, and N. Shankar.** 2007. Horizontal transfer of virulence genes encoded on the *Enterococcus faecalis* pathogenicity island. *Mol Microbiol* **63**:530-44.
10. **Courtin, P., V. Monnet, and F. Rul.** 2002. Cell-wall proteinases PrtS and PrtB have a different role in *Streptococcus thermophilus/Lactobacillus bulgaricus* mixed cultures in milk. *Microbiology* **148**:3413-21.
11. **Dalgaard, P., and K. Koutsoumanis.** 2001. Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. *J Microbiol Methods* **43**:183-96.
12. **Dalgaard, P., T. Ross, L. Kamperman, K. Neumeyer, and T. A. McMeekin.** 1994. Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data. *Int J Food Microbiol* **23**:391-404.
13. **Devriese, L. A., B. Pot, and M. D. Collins.** 1993. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *J Appl Bacteriol* **75**:399-408.
14. **Eaton, T. J., and M. J. Gasson.** 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol* **67**:1628-35.
15. **Eliopoulos, G. M.** 1992. Enterococcal endocarditis, p. 209-223. *In* D. Kaye (ed.), *Infective endocarditis*. Raven Press, New York.
16. **Franz, C. M., A. B. Muscholl-Silberhorn, N. M. Yousif, M. Vancanneyt, J. Swings, and W. H. Holzappel.** 2001. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among Enterococci isolated from food. *Appl Environ Microbiol* **67**:4385-9.
17. **Franz, C. M., M. E. Stiles, K. H. Schleifer, and W. H. Holzappel.** 2003. Enterococci in foods - a conundrum for food safety. *Int J Food Microbiol* **88**:105-22.
18. **Gálvez, A., M. Maqueda, M. Martínez-Bueno, and E. Valdivia.** 1996. The broad spectrum antimicrobial peptide AS-48 from *Enterococcus faecalis* p. 135– 147. *In* G. Pandalai (ed.), *Recent Research Developments in Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Research Signpost, Trivandrum, India.

19. **Gardini, F., M. Martuscelli, M. C. Caruso, F. Galgano, M. A. Crudele, F. Favati, M. E. Guerzoni, and G. Suzzi.** 2001. Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *Int J Food Microbiol* **64**:105-17.
20. **Giard, J. C., J. M. Laplace, A. Rince, V. Pichereau, A. Benachour, C. Leboeuf, S. Flahaut, Y. Auffray, and A. Hartke.** 2001. The stress proteome of *Enterococcus faecalis*. *Electrophoresis* **22**:2947-54.
21. **Giraffa, G.** 2002. Enterococci from foods. *FEMS Microbiol Rev* **26**:163-71.
22. **Goossens, H.** 1998. Spread of vancomycin-resistant enterococci: differences between the United States and Europe. *Infect Control Hosp Epidemiol* **19**:546-51.
23. **Havenaar, R., and J. H. J. Huis in 't Veld.** 1992. Probiotics. A general view, p. 151– 171. *In* B. J. B. Wood (ed.), *The Lactic Acid Bacteria. The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*, vol. 1. Elsevier, London.
24. **Heim, S., M. M. Lleo, B. Bonato, C. A. Guzman, and P. Canepari.** 2002. The viable but nonculturable state and starvation are different stress responses of *Enterococcus faecalis*, as determined by proteome analysis. *J Bacteriol* **184**:6739-45.
25. **Hew, C. M., M. Korakli, and R. F. Vogel.** 2007. Expression of virulence-related genes by *Enterococcus faecalis* in response to different environments. *Syst Appl Microbiol* **30**:257-67.
26. **Higashide, T., M. Takahashi, A. Kobayashi, S. Ohkubo, M. Sakurai, Y. Shirao, T. Tamura, and K. Sugiyama.** 2005. Endophthalmitis caused by *Enterococcus mundtii*. *J Clin Microbiol* **43**:1475-6.
27. **Iaria, C., G. Stassi, G. B. Costa, R. Di Leo, A. Toscano, and A. Cascio.** 2005. Enterococcal meningitis caused by *Enterococcus casseliflavus*. First case report. *BMC Infect Dis* **5**:3.
28. **Jett, B. D., M. M. Huycke, and M. S. Gilmore.** 1994. Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev* **7**:462-78.
29. **Jett, B. D., H. G. Jensen, R. E. Nordquist, and M. S. Gilmore.** 1992. Contribution of the pAD1-encoded cytolysin to the severity of experimental *Enterococcus faecalis* endophthalmitis. *Infect Immun* **60**:2445-52.
30. **Jones, W. G., P. S. Barie, R. W. Yurt, and C. W. Goodwin.** 1986. Enterococcal burn sepsis. A highly lethal complication in severely burned patients. *Arch Surg* **121**:649-53.
31. **Kalina, A. P.** 1970. The taxonomy and nomenclature of enterococci. *Int J Syst Bacteriol* **20**:185-189.
32. **Klare, I., H. Heier, H. Claus, G. Bohme, S. Marin, G. Seltsmann, R. Hakenbeck, V. Antanassova, and W. Witte.** 1995. *Enterococcus faecium* strains with *vanA*-mediated high-level glycopeptide resistance isolated from animal foodstuffs and fecal samples of humans in the community. *Microb Drug Resist* **1**:265-72.
33. **Korkeala, H., T. Alanko, and T. Tiusanen.** 1992. Effect of sodium nitrite and sodium chloride on growth of lactic acid bacteria. *Acta Vet Scand* **33**:27-32.
34. **Kreft, B., R. Marre, U. Schramm, and R. Wirth.** 1992. Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. *Infect Immun* **60**:25-30.
35. **Leavis, H., J. Top, N. Shankar, K. Borgen, M. Bonten, J. van Embden, and R. J. Willems.** 2004. A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the *esp* virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. *J Bacteriol* **186**:672-82.
36. **Li, Y. H., P. C. Lau, N. Tang, G. Svensater, R. P. Ellen, and D. G. Cvitkovitch.** 2002. Novel two-component regulatory system involved in biofilm formation and acid resistance in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* **184**:6333-42.
37. **Lopes, M. F. S., C. I. Pereira, F. M. S. Rodrigues, M. P. Martins, M. C. Mimoso, T. C. Barros, J. J. Figueiredo Marques, R. P. Tenreiro, J. S. Almeida, and M. T. Barreto Crespo.** 1999. Registered designation of origin areas of fermented food products defined by microbial phenotypes and artificial neural networks. *Appl Environ Microb* **65**:4484–4489.
38. **Lopes, M. F. S., T. Ribeiro, M. Abrantes, J. J. Figueiredo Marques, R. Tenreiro, and M. T. Barreto Crespo.** 2005. Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci. *Int J Food Microbiol* **103** 191– 198.
39. **Low, Y. L., N. S. Jakubovics, J. C. Flatman, H. F. Jenkinson, and A. W. Smith.** 2003. Manganese-dependent regulation of the endocarditis-associated virulence factor EfaA of *Enterococcus faecalis*. *J Med Microbiol* **52**:113-9.
40. **Lowe, A. M., P. A. Lambert, and A. W. Smith.** 1995. Cloning of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen: homology with adhesins from some oral streptococci. *Infect Immun* **63**:703-6.

41. **Mannu, L., A. Paba, E. Daga, R. Comunian, S. Zanetti, I. Dupre, and L. A. Sechi.** 2003. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *Int J Food Microbiol* **88**:291-304.
42. **Maqueda, M., A. Galvez, M. Martinez-Bueno, and E. Valdivia.** 1998. Widespread production of AS-48-like bacteriocins in strains of *Enterococcus faecalis*? *Mol Microbiol* **29**:1318-9.
43. **Martinez-Bueno, M., E. Valdivia, A. Galvez, J. Coyette, and M. Maqueda.** 1998. Analysis of the gene cluster involved in production and immunity of the peptide antibiotic AS-48 in *Enterococcus faecalis*. *Mol Microbiol* **27**:347-58.
44. **Massol-Deya, A., D. A. Odelson, R. F. Hickey, and J. M. Tiedje.** 1995. Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA) p. 3.3.2: 1–8. *In* A. D. L. Akkermans, J. D. van Elsas, and F. J. de Bruijn (ed.), *Molecular Microbial Ecology Manual* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
45. **McClure, P. J., M. B. Cole, K. W. Davies, and W. A. Anderson.** 1993. The use of automated turbidimetric data for the construction of kinetic models. *J Ind Microbiol* **12**:277-285.
46. **Moellering, R. C., Jr.** 1992. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. *Clin Infect Dis* **14**:1173-6.
47. **Morandi, S., M. Brasca, P. Alfieri, R. Lodi, and A. Tamburini.** 2005. Influence of pH and temperature on the growth of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Lait*:181-192.
48. **Mordehai, J., E. Kurzbart, Z. Cohen, and A. J. Mares.** 1997. Necrotizing fasciitis and myonecrosis in early childhood: a report of three patients. *Pediatr Surg Int* **12**:538-40.
49. **Morrison, A. J., Jr., and R. P. Wenzel.** 1986. Nosocomial urinary tract infections due to *Enterococcus*. Ten years' experience at a university hospital. *Arch Intern Med* **146**:1549-51.
50. **Nallapareddy, S. R., H. Wenxiang, G. M. Weinstock, and B. E. Murray.** 2005. Molecular characterization of a widespread, pathogenic, and antibiotic resistance-receptive *Enterococcus faecalis* lineage and dissemination of its putative pathogenicity island. *J Bacteriol* **187**:5709-18.
51. **Pehlivan, Y., M. A. Toy, I. Karaoglan, M. Namiduru, and H. Buyukhatipoglu.** 2007. *Enterococcus avium* cerebral abscess. *Intern Med* **46**:1280.
52. **Perez-Pulido, R., H. Abriouel, N. Ben Omar, R. Lucas, M. Martinez-Canamero, and A. Galvez.** 2006. Safety and potential risks of enterococci isolated from traditional fermented capers. *Food Chem Toxicol* **44**:2070-7.
53. **Pitcher, D. G., N. A. Saunders, and R. J. Owen.** 1989. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters Applied Microbiology* **8**:151–156.
54. **Pot, B., P. Vandamme, and K. Kersters.** 1994. Analysis of electrophoretic whole-organism protein fingerprinting, p. 493-521. *In* M. Goodfellow and A. G. O'Donnell (ed.), *Chemical Methods in Prokaryotic Systematics*. Wiley, Chichester, UK.
55. **Poyart, C., T. Lambert, P. Morand, P. Abassade, G. Quesne, Y. Baudouy, and P. Trieu-Cuot.** 2002. Native valve endocarditis due to *Enterococcus hirae*. *J Clin Microbiol* **40**:2689-90.
56. **Prakash, V. P., S. R. Rao, and S. C. Parija.** 2005. Emergence of unusual species of enterococci causing infections, South India. *BMC Infect Dis* **5**:14.
57. **Rams, T. E., D. Feik, V. Young, B. F. Hammond, and J. Slots.** 1992. Enterococci in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* **7**:249-52.
58. **Reid, K. C., I. F. Cockerill, and R. Patel.** 2001. Clinical and epidemiological features of *Enterococcus casseliflavus/flavescens* and *Enterococcus gallinarum* bacteremia: a report of 20 cases. *Clin Infect Dis* **32**:1540-6.
59. **Ruoff, K. L., L. de la Maza, M. J. Murtagh, J. D. Spargo, and M. J. Ferraro.** 1990. Species identities of enterococci isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol* **28**:435-7.
60. **Sandoe, J. A., I. R. Witherden, J. H. Cove, J. Heritage, and M. H. Wilcox.** 2003. Correlation between enterococcal biofilm formation in vitro and medical-device-related infection potential in vivo. *J Med Microbiol* **52**:547-50.
61. **Sandoe, J. A., I. R. Witherden, and C. Settle.** 2001. Vertebral osteomyelitis caused by *Enterococcus raffinosus*. *J Clin Microbiol* **39**:1678-9.
62. **Sarantinopoulos, P., C. Andrighetto, M. D. Georgalaki, M. C. Rea, A. Lombardi, T. M. Cogan, G. Kalantzopoulos, and E. Tsakalidou.** 2001. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *Int Dairy J* **11**: 621– 647.
63. **Schleifer, K. H., and R. Kilpper-Bälz.** 1984. 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.* **34**:31–34.

64. **Schlievert, P. M., P. J. Gahr, A. P. Assimacopoulos, M. M. Dinges, J. A. Stoehr, J. W. Harmala, H. Hirt, and G. M. Dunny.** 1998. Aggregation and binding substances enhance pathogenicity in rabbit models of *Enterococcus faecalis* endocarditis. *Infect Immun* **66**:218-23.
65. **Semedo, T., M. Almeida Santos, P. Martins, M. F. Silva Lopes, J. J. Figueiredo Marques, R. Tenreiro, and M. T. Barreto Crespo.** 2003. Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in enterococci. *J Clin Microbiol* **41**:2569-76.
66. **Semedo, T., M. A. Santos, M. F. Lopes, J. J. Figueiredo Marques, M. T. Barreto Crespo, and R. Tenreiro.** 2003. Virulence factors in food, clinical and reference Enterococci: A common trait in the genus? *Syst Appl Microbiol* **26**:13-22.
67. **Shaked, H., Y. Carmeli, D. Schwartz, and Y. Siegman-Igra.** 2006. Enterococcal bacteraemia: epidemiological, microbiological, clinical and prognostic characteristics, and the impact of high level gentamicin resistance. *Scand J Infect Dis* **38**:995-1000.
68. **Shankar, N., A. S. Baghdayan, and M. S. Gilmore.** 2002. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature* **417**:746-50.
69. **Shankar, N., P. Coburn, C. Pillar, W. Haas, and M. Gilmore.** 2004. Enterococcal cytolysin: activities and association with other virulence traits in a pathogenicity island. *Int J Med Microbiol* **293**:609-18.
70. **Shankar, N., C. V. Lockett, A. S. Baghdayan, C. Drachenberg, M. S. Gilmore, and D. E. Johnson.** 2001. Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Infect Immun* **69**:4366-72.
71. **Shankar, V., A. S. Baghdayan, M. M. Huycke, G. Lindahl, and M. S. Gilmore.** 1999. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infect Immun* **67**:193-200.
72. **Shepard, B. D., and M. S. Gilmore.** 2002. Differential expression of virulence-related genes in *Enterococcus faecalis* in response to biological cues in serum and urine. *Infect Immun* **70**:4344-52.
73. **Singh, K. V., T. M. Coque, G. M. Weinstock, and B. E. Murray.** 1998. In vivo testing of an *Enterococcus faecalis* *efaA* mutant and use of *efaA* homologs for species identification. *FEMS Immunol Med Microbiol* **21**:323-31.
74. **Sitges-Serra, A., M. J. Lopez, M. Girvent, S. Almirall, and J. J. Sancho.** 2002. Postoperative enterococcal infection after treatment of complicated intra-abdominal sepsis. *Br J Surg* **89**:361-7.
75. **Solheim, M., A. Aakra, H. Vebo, L. Snipen, and I. F. Nes.** 2007. Transcriptional responses of *Enterococcus faecalis* V583 to bovine bile and sodium dodecyl sulfate. *Appl Environ Microbiol* **73**:5767-74.
76. **Tang, C. W., C. K. Cheng, and T. S. Lee.** 2007. Community-acquired bleb-related endophthalmitis caused by vancomycin-resistant enterococci. *Can J Ophthalmol* **42**:477-8.
77. **Tenreiro, R.** 1995. Análise taxonómica em *Leuconostoc oenos* - uma perspectiva polifásica. Tese de Doutoramento. Universidade de Lisboa.
78. **Thiercelin, E.** 1899. Sur un diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogene. *C R Soc Biol* **5**:269-271.
79. **Tseng, H. J., Y. Srikhanta, A. G. McEwan, and M. P. Jennings.** 2001. Accumulation of manganese in *Neisseria gonorrhoeae* correlates with resistance to oxidative killing by superoxide anion and is independent of superoxide dismutase activity. *Mol Microbiol* **40**:1175-86.
80. **Wells, C. L., E. A. Moore, J. A. Hoag, H. Hirt, G. M. Dunny, and S. L. Erlandsen.** 2000. Inducible expression of *Enterococcus faecalis* aggregation substance surface protein facilitates bacterial internalization by cultured enterocytes. *Infect Immun* **68**:7190-4.
81. **Willems, R. J., W. Homan, J. Top, M. van Santen-Verheuve, D. Tribe, X. Manziros, C. Gaillard, C. M. Vandembroucke-Grauls, E. M. Mascini, E. van Kregten, J. D. van Embden, and M. J. Bonten.** 2001. Variant *esp* gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. *Lancet* **357**:853-5.
82. **Yoshida, T., M. Endo, M. Sakail, and V. Inglis.** 1997. A cell capsule with possible involvement in resistance to opsonophagocytosis in *Enterococcus seriolicida* isolated from yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Dis Aquat Organ* **29**:233-235.

## 6. ANEXOS

Tabela Suplementar 1 Estirpes utilizadas neste estudo

| Estirpe                 | Espécie                           | Origem                                       |
|-------------------------|-----------------------------------|--|
| DSMZ 20680 <sup>T</sup> | <i>Enterococcus casseliflavus</i> | Plantas*                                     |
| DSMZ 5633 <sup>T</sup>  | <i>Enterococcus raffinosus</i>    | Cultura de sangue*                           |
| F10 <sup>†</sup>        | <i>Enterococcus faecium</i>       | Alimentar (queijo)                           |
| MMH594 <sup>‡</sup>     | <i>Enterococcus faecalis</i>      | Clínica humana (surto hospitalar)            |
| V583 <sup>§</sup>       | <i>Enterococcus faecalis</i>      | Clínica humana (surto hospitalar)            |
| E300 <sup>**</sup>      | <i>Enterococcus faecium</i>       | Clínica humana (surto hospitalar)            |
| H1881                   | <i>Enterococcus faecalis</i>      | Clínica humana (infecção urinária)           |
| V95                     | <i>Enterococcus faecium</i>       | Clínica veterinária (cão; infecção urinária) |
| V434                    | <i>Enterococcus faecalis</i>      | Clínica veterinária (cão; infecção urinária) |
| LA78                    | <i>Enterococcus hirae</i>         | Alimentar (leite de ovelha)                  |
| LA160                   | <i>Enterococcus durans</i>        | Alimentar (leite de ovelha)                  |
| LN9                     | <i>Enterococcus durans</i>        | Alimentar (leite de ovelha)                  |
| LN11                    | <i>Enterococcus casseliflavus</i> | Alimentar (leite de ovelha)                  |
| QA29a                   | <i>Enterococcus faecalis</i>      | Alimentar (queijo de ovelha)                 |
| QA40                    | <i>Enterococcus raffinosus</i>    | Alimentar (queijo de ovelha)                 |
| QCB54                   | <i>Enterococcus durans</i>        | Alimentar (queijo de ovelha)                 |
| QSE123                  | <i>Enterococcus faecalis</i>      | Alimentar (queijo de ovelha)                 |

\* estirpes referência obtidas na DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemanha)

<sup>†</sup> gentilmente cedida por Tracy Eaton (Division of Food Safety Sciences, Institute of Food Research, Norwich, Reino Unido)

<sup>‡</sup> gentilmente cedida por Pascale Serror (Unité des Bactéries Lactiques et Pathogènes Opportunistes, INRA, Jouy-en-Josas, França)

<sup>§</sup> gentilmente cedida por Johannes Huebner (Division of Infectious Disease, Children's Hospital, Harvard Medical School, Boston, EUA)

\*\* gentilmente cedida por Rob Willems (University Medical Center Utrecht, Utrecht, Holanda)

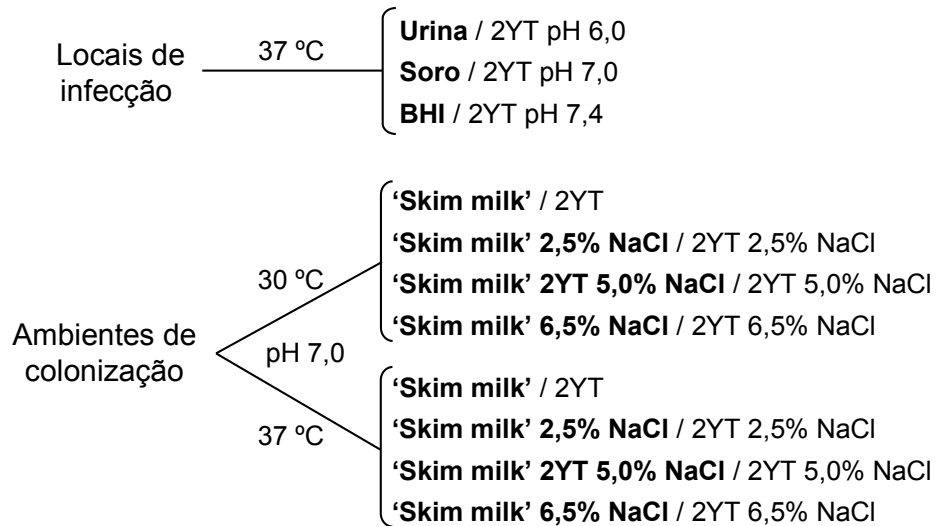


**Tabela Suplementar 2** 'Primers' utilizados nas reacções de PCR

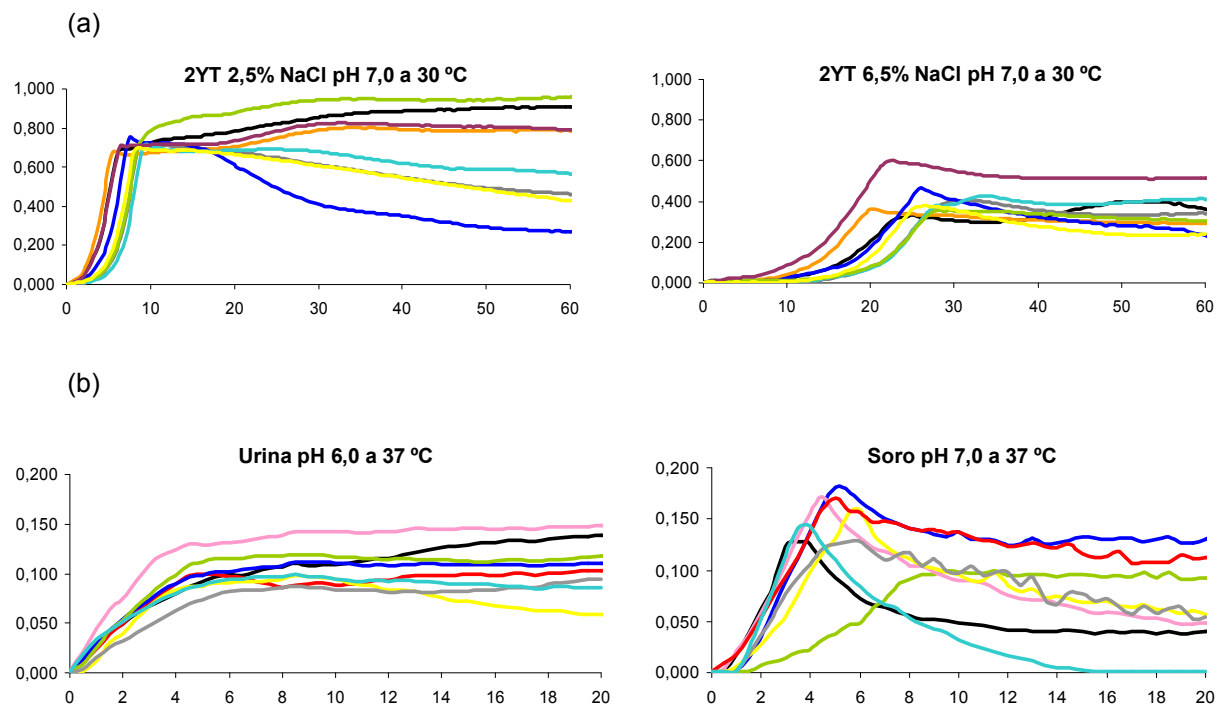
| Gene                     | Sequência (5' → 3')   | Dimensão do produto (bp) | Referência  |
|--------------------------|---|--------------------------|-------------|
| <i>cyIM</i>              | F - AGGGAAATGATAGTAGCAAGC<br>R - AAATATGGTACTAGCCCTGTCACC   | 694                      | Este estudo |
| <i>cyIB</i>              | F - TAATGGAACAAGGAAACGTCCAG<br>R - GTAAAGTAGATTTCCCTGACCCAC | 573                      | Este estudo |
| <i>cyIA</i>              | F - CGGGGATTGATAGGCTTCATCC<br>R - TAACCATCTGGAAAGTCAGCAG    | 628                      | Este estudo |
| <i>cyII</i>              | F - GTTGTTAACCGGAGGACCAA<br>R - TGGCTTATTTTCATCATCAGCA      | 597                      | Este estudo |
| <i>agg</i>               | F - CGGTACAGTTGGCAGTGTTCG<br>R - GGCTTGTGGGTCTTTGGCAGAG     | 518                      | Este estudo |
| <i>esp</i>               | F - TTGCTAATGCTAGTCCACGACC<br>R - GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA   | 933                      | (14)        |
| <i>efaA<sub>fm</sub></i> | F - AACAGATCCGCATGAATA<br>F - CATTTCATCATCTGATAGTA          | 735                      | (14)        |
| <i>efaA<sub>fs</sub></i> | F - GGCTTCTGGTGCGACGATTG<br>R - AAGCATGCGGATCTTCTGTTTG      | 534                      | Este estudo |
| <i>rpoA</i>              | F - CGCGGTTACGGAACTACTTTAG<br>R - GTTAACACGAAGAACGGGTGTG    | 444                      | Este estudo |
| rDNA16S                  | F - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG<br>R - CCGTCAATTCMTTTRAGTTT        | 907                      | (44)        |

**Tabela Suplementar 3** Análise por PCR dos genes de virulência

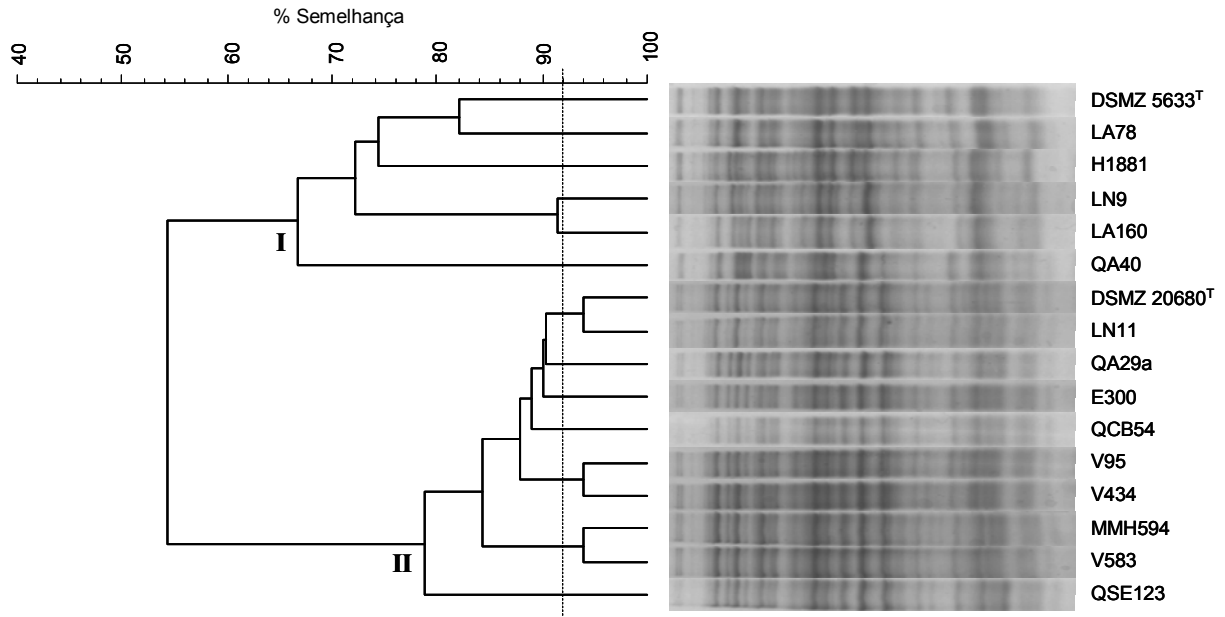
| Origem     | Estirpe                 | Espécie                 | Genótipo  |
|------------|-------------------------|-------------------------|---|
| Referência | DSMZ 5633 <sup>T</sup>  | <i>E. raffinosus</i>    | <i>cyII</i> <sup>+</sup> <i>esp</i> <sup>+</sup> <i>efaA<sub>fs</sub></i> <sup>+</sup>                            |
|            | DSMZ 20680 <sup>T</sup> | <i>E. casseliflavus</i> | <i>cyIMBAI</i> <sup>+</sup> <i>agg</i> <sup>+</sup> <i>esp</i> <sup>+</sup> <i>efaA<sub>fs</sub></i> <sup>+</sup> |
| Clínica    | V583                    | <i>E. faecalis</i>      | <i>cyIMI</i> <sup>+</sup> <i>agg</i> <sup>+</sup> <i>efaA<sub>fs</sub></i> <sup>+</sup>                           |
|            | E300                    | <i>E. faecium</i>       | <i>esp</i> <sup>+</sup> <i>efaA<sub>fs</sub></i> <sup>+</sup> <i>efaA<sub>fm</sub></i> <sup>+</sup>               |
|            | MMH594                  | <i>E. faecalis</i>      | <i>cyIMBAI</i> <sup>+</sup> <i>agg</i> <sup>+</sup> <i>esp</i> <sup>+</sup> <i>efaA<sub>fs</sub></i> <sup>+</sup> |
|            | V95                     | <i>E. faecium</i>       | <i>cyIMBAI</i> <sup>+</sup> <i>esp</i> <sup>+</sup> <i>efaA<sub>fs</sub></i> <sup>+</sup>                         |
|            | V434                    | <i>E. faecalis</i>      | <i>agg</i> <sup>+</sup> <i>esp</i> <sup>+</sup> <i>efaA<sub>fs</sub></i> <sup>+</sup>                             |
|            | H1881                   | <i>E. faecalis</i>      | <i>cyIM</i> <sup>+</sup> <i>agg</i> <sup>+</sup> <i>efaA<sub>fs</sub></i> <sup>+</sup>                            |
| Alimentar  | LN9                     | <i>E. durans</i>        | <i>cyIMBAI</i> <sup>+</sup> <i>efaA<sub>fs</sub></i> <sup>+</sup>   |
|            | LN11                    | <i>E. casseliflavus</i> | <i>cyIMBAI</i> <sup>+</sup> <i>agg</i> <sup>+</sup> <i>esp</i> <sup>+</sup> <i>efaA<sub>fs</sub></i> <sup>+</sup> |
|            | QSE123                  | <i>E. faecalis</i>      | <i>cyIMBAI</i> <sup>+</sup> <i>agg</i> <sup>+</sup> <i>efaA<sub>fs</sub></i> <sup>+</sup>                         |
|            | LA78                    | <i>E. hirae</i>         | <i>esp</i> <sup>+</sup> <i>efaA<sub>fs</sub></i> <sup>+</sup>   |
|            | LA160                   | <i>E. durans</i>        | <i>efaA<sub>fs</sub></i> <sup>+</sup> <i>efaA<sub>fm</sub></i> <sup>+</sup>                                       |
|            | QA29a                   | <i>E. faecalis</i>      | <i>cyIMBAI</i> <sup>+</sup> <i>agg</i> <sup>+</sup> <i>efaA<sub>fs</sub></i> <sup>+</sup>                         |
|            | QA40                    | <i>E. raffinosus</i>    | <i>esp</i> <sup>+</sup> <i>efaA<sub>fs</sub></i> <sup>+</sup>   |
|            | QCB54                   | <i>E. durans</i>        | <i>esp</i> <sup>+</sup> <i>efaA<sub>fs</sub></i> <sup>+</sup>   |



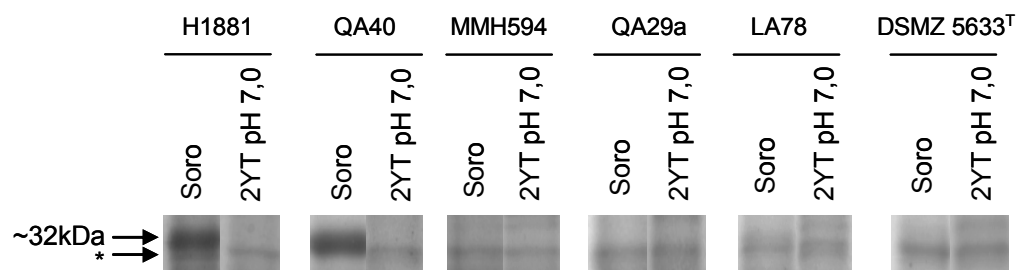
**Figura Suplementar 1** Condições de crescimento utilizadas no presente trabalho. À esquerda, a negrito estão representadas as condições em análise e à direita o respectivo controlo. Nota: Na análise da cinética de crescimento a adição de NaCl ao 'skim milk' levou à coagulação do meio impedindo posterior análise. Para a extracção de proteínas não foi possível obter resultados para nenhum dos 'skim milk'. A extracção de RNA não foi possível em nenhum 'skim milk' com NaCl a 37 °C.



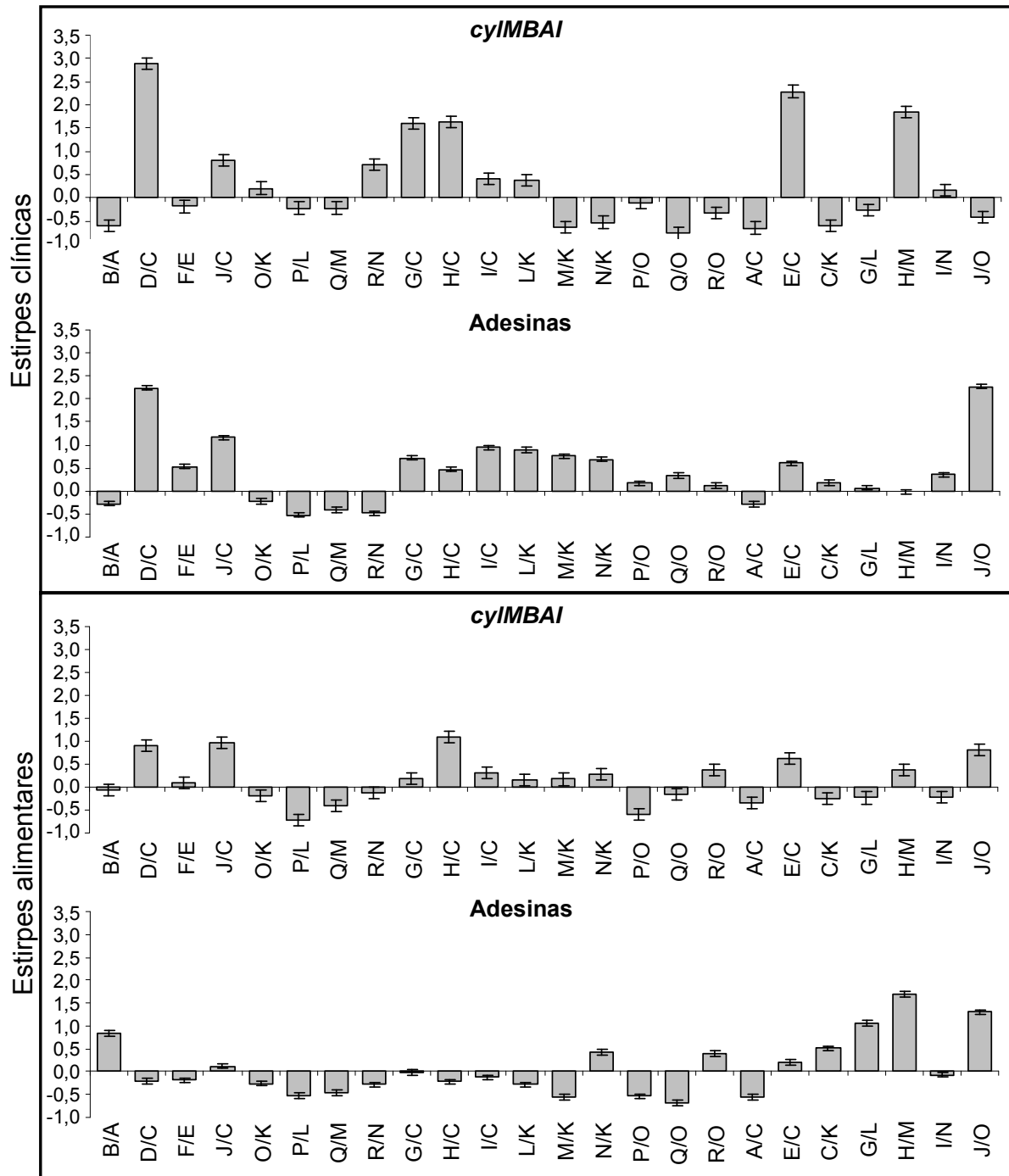
**Figura Suplementar 2** Curvas de crescimentos em meios que simulam colonização ambiental (a) e meios que simulam locais de infecção (b). Para cada condição apenas estão representadas oito estirpes. O eixo dos x indica o tempo (horas) e o dos y a D.O. ('wideband': 420 nm – 580 nm). As curvas foram obtidas com o Bioscreen C® e representam a média de três réplicas. Legenda: — V583; — E300; — V95; — V434; — DSMZ 20680<sup>T</sup>; — DSMZ 5633<sup>T</sup>; — LN11; — LA160; — QSE123; — QA40.



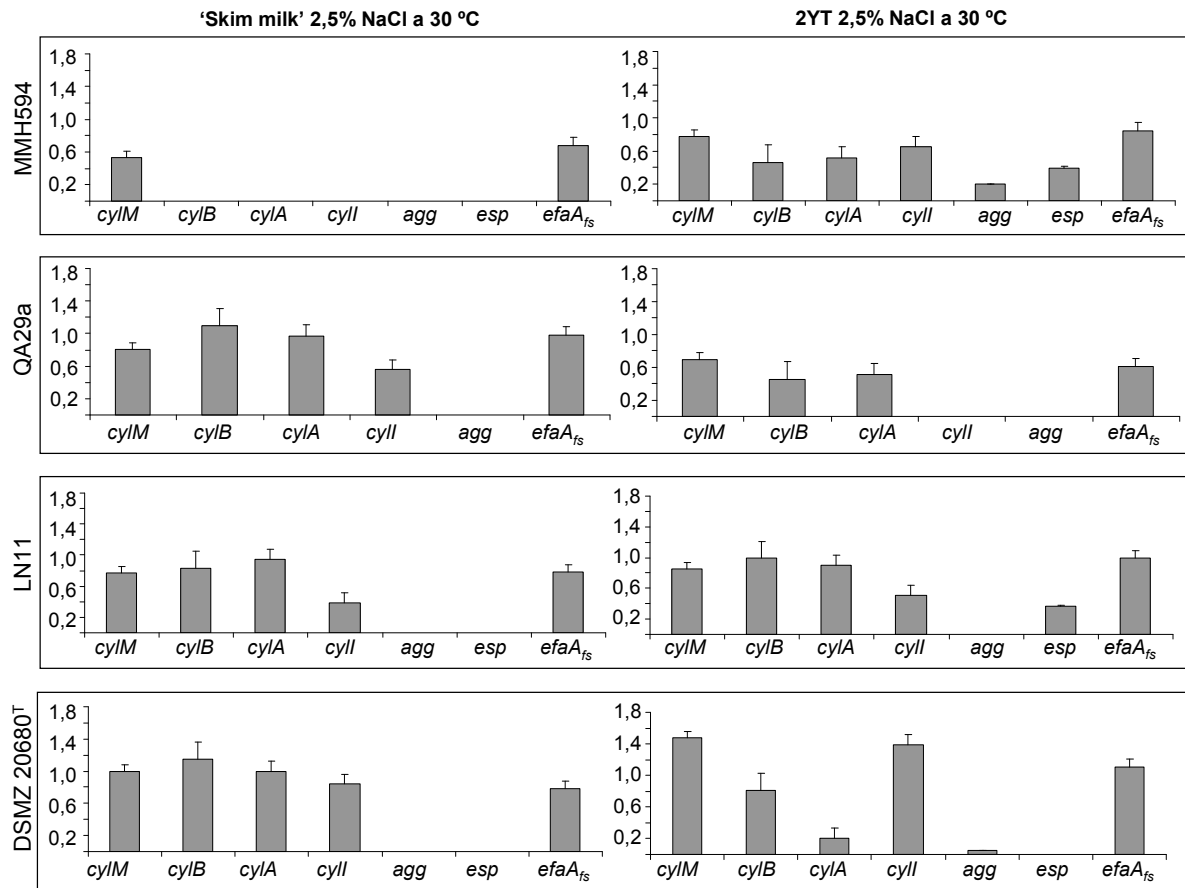
**Figura Suplementar 3** Dendrograma baseado nos perfis proteicos totais obtidos para todas as estirpes após crescimento em 2YT com 2,5% NaCl pH 7,0 a 30 °C. A linha a tracejado indica o valor de 'cut-off' de 92% semelhança, determinado com 10% de réplicas. O agrupamento das estirpes foi realizado no BioNumerics, utilizando o coeficiente de correlação de Pearson e o método de aglomeração UPGMA.



**Figura Suplementar 4** Análise da expressão da proteína de ~32kDa no soro e no respectivo controle (2YT pH 7,0 a 37 °C) por SDS-PAGE. Seis estirpes estão representadas, duas clínicas (*E. faecalis* H1881 e MMH594), três alimentares (*E. raffinosus* QA40, *E. faecalis* QA29a e *E. hirae* LA78) e uma estirpe de referência (*E. raffinosus* DSMZ 5633<sup>T</sup>). O asterisco indica a proteína de menor massa molecular presente tanto no soro como no controle.



**Figura Suplementar 5** Níveis de expressão dos genes de virulência comparando cada condição com a condição controlo. Foram constituídos dois grupos de genes, os genes *cyl* e as adesinas (*agg*, *esp*, *efaA<sub>fs</sub>* e *efaA<sub>fm</sub>*). Na análise para além dos controlos directos foram também efectuadas comparações de osmolaridade, pH e temperatura. Cada letra representa uma condição: **A** – 2YT pH 7,4; **B** – BHI; **C** – 2YT pH 7,0; **D** – soro; **E** – 2YT pH 6,0; **F** – urina; **G** – 2YT com 2,5% NaCl a 37 °C; **H** – 2YT com 5,0% NaCl a 37 °C; **I** – 2YT com 6,5% NaCl a 37 °C; **J** – ‘skim milk’ a 37 °C; **K** – 2YT a 30 °C; **L** – 2YT com 2,5% NaCl a 30 °C; **M** – 2YT com 5,0% NaCl a 30 °C; **N** – 2YT com 6,5% NaCl a 30 °C; **O** – ‘skim milk’ a 30 °C; **P** – ‘skim milk’ com 2,5% NaCl a 30 °C; **Q** – ‘skim milk’ com 5,0% NaCl a 30 °C; **R** – ‘skim milk’ com 6,5% NaCl a 30 °C. O desvio padrão está representado na figura ( $\pm 0,127$  para *cyIMBAI* e  $\pm 0,053$  para as adesinas).



**Figura Suplementar 6** Expressão relativa de genes de virulência no 'skim milk' com 2,5% NaCl a 30 °C e respectivo controlo (2YT 2,5% NaCl a 30 °C). Estão representadas as estirpes *E. faecalis* MMH594 (estirpe clínica), *E. faecalis* QA29a (estirpe alimentar), *E. casseliflavus* LN11 (estirpe alimentar) e *E. casseliflavus* DSMZ 20680<sup>T</sup> (estirpe referência). A normalização foi efectuada com o gene rDNA 16S.