

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

Caracterização genética de factores de virulência e análise de perfis proteicos de estirpes de *Enterococcus* spp. isoladas de gaivotas (*Larus cachinnans*)

Dissertação de Mestrado em Genética Molecular, Comparativa e Tecnológica

Selma Gomes Vieira



Vila Real, 2011

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

**Caracterização genética de factores de virulência e análise de perfis
proteicos de estirpes de *Enterococcus* spp. isoladas de gaivotas (*Larus
cachinnans*)**

**Dissertação de Mestrado em Genética Molecular, Comparativa e
Tecnológica**

Orientador: Professora Doutora Patrícia Poeta

Co-orientador: Professor Doutor Gilberto Igrejas

Selma Gomes Vieira



Vila Real, 2011

Agradecimentos

Ao terminar esta etapa, gostaria de manifestar o meu reconhecimento a diversas pessoas pelo auxílio prestado, sem as quais este trabalho não teria sido possível.

Ao Professor Doutor Carlos Alberto Sequeira, Reitor da UTAD, pela disponibilidade e facilidades concedidas durante a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Patrícia Poeta pela oportunidade concedida e pela orientação, dedicação e disponibilidade.

Ao Professor Doutor Gilberto Igrejas pelo apoio prestado e pela disponibilidade que sempre mostrou.

Aos colegas de trabalho Alex, Sónia, Rui e Susana por toda a ajuda prestada durante a execução deste trabalho. Em particular à Hajer, por toda a ajuda, pelo seu altruísmo, generosidade e pela paciência em responder todas as minhas questões.

Ao meu namorado Zé, que está sempre ao meu lado. Obrigada por me incentivares, dares força e também por todo o teu carinho e amor.

Aos meus pais e irmã, que sempre me ajudaram e apoiaram as minhas escolhas.

Ao meu irmão Duarte, que, apesar de já não estar comigo, continua a estar nos meus pensamentos todos os dias.

Resumo

A crescente detecção de bactérias resistentes a antibióticos conduziu ao uso prudente destes fármacos em medicina humana e veterinária, e à criação de uma rede de sistemas para a sua vigilância. As bactérias comensais *Enterococcus* spp. são muitas vezes eleitas como “indicadoras de resistência”, uma vez que estão presentes na microflora intestinal animal, e por isso sujeitas à acção dos antibióticos. Estas bactérias constituem um reservatório de genes, capazes de serem transferidos a outras bactérias comensais ou mesmo patogénicas.

A interacção das bactérias com o hospedeiro é muitas vezes mediada pela secreção de factores de virulência. As bactérias desenvolveram mecanismos para a secreção destes factores para o interior das células do hospedeiro, de forma a potenciar a colonização bacteriana. Estes conferem uma vantagem selectiva às bactérias que os possuem.

Compreender os mecanismos de patogenicidade das bactérias é fundamental para investigar doenças infecciosas, uma vez que, estes, muitas vezes estão pouco evidenciados. A avaliação dos perfis proteicos de bactérias em situações de stress pode representar uma abordagem integrada para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e agentes antimicrobianos.

Este estudo teve como objectivos a caracterização, através de PCR com recurso a primers específicos, de 12 genes codificadores de factores de virulência em 63 estirpes de enterococos isolados de amostras fecais de gaivotas (*Larus cachinnans*) e a análise dos perfis proteicos monodimensionais de 29 destes isolados. Foi ainda analisada a produção de gelatinase e actividade hemolítica dos isolados.

O gene *cylL_L* foi encontrado em 41 dos isolados, seguido do gene *cpd*, presente em 39. Os genes *gelE* e *cylM* foram encontrados em 25 isolados, o gene *hyl* em 22, os genes *esp* e *ace* foram detectados em 19, o gene *cylB* foi encontrado em 10 e o gene *cylA* estava presente em apenas 5 estirpes. Nenhum isolado apresentou os genes *agg*, *fsr* e *cylL_S*. Apenas 4 isolados não apresentaram qualquer gene codificante de factor de virulência. Foi detectado um número máximo de 8 genes em dois isolados (1 isolado *Enterococcus* spp. apresentou os genes *gelE*, *hyl*, *cpd*, *ace*, *cylA*, *cylB*, *cylL_L* e *cylM* e o outro isolado pertencente à espécie *E. faecium* apresentou os genes *gelE*, *hyl*, *esp*, *ace*, *cylA*, *cylB*, *cylL_L* e *cylM*).

Nenhum dos isolados apresentou actividade β -hemolítica, sendo que também nenhum apresentou a totalidade do operão *cyl*. Relativamente à produção de gelatinase, foi observado que a grande maioria dos isolados apresentou actividade gelatinase positiva. Nem todos os isolados onde foi detectado o gene *gelE* foram capazes de degradar a gelatina.

Foram obtidos padrões proteicos através de electroforese monodimensional onde foi possível distinguir bandas proteicas características das espécies estudadas. Foi observada um elevado polimorfismo, sendo que os perfis proteicos de isolados pertencentes a uma dada espécie eram muito similares entre si. Foi, no entanto, possível determinar algumas bandas apenas presentes num dos isolados.

A análise proteómica de bactérias portadoras de genes de resistência a antibióticos e de virulência é muito importante para a identificação de proteínas, com vista à construção de mapas proteicos para comparação de proteomas e ao desenvolvimento de novos antibióticos para combate às infecções multirresistentes, actualmente de difícil terapêutica.

Complementarmente a monitorização da presença de genes codificantes de factores de virulência, assim como da correlação destes com a multi-resistência a antibióticos em estirpes de enterococos é importante para a análise dos padrões de disseminação destes determinantes. Isto é particularmente importante em animais migratórios, como as gaivotas, uma vez que ao percorrerem longas distâncias e entrarem em contacto com humanos e outros animais, funcionam como um veículo de transmissão destes genes.

Palavras-Chave: *Enterococcus* spp.; Factores de virulência; Antibióticos; Gaivotas; SDS-PAGE; Electroforese monodimensional.

Abstract

The increasing detection of antibiotic resistant bacteria has led to the prudent use of these drugs in medicine and veterinary, and to the creation of a network for its surveillance. The commensal bacteria of the genus *Enterococcus* spp. are often chosen as resistance indicators, since they are present in the animal intestinal microflora, and therefore are subject to the action of antibiotics. These bacteria constitute a gene reservoir, capable of being transferred to other commensal and also pathogenic bacteria.

The bacteria-host interaction is often mediated by the secretion of virulence factors. The bacteria have developed mechanisms for the secretion of these factors on to the interior of the host cells, in a way to expand bacterial colonization. These factors give a selective advantage to the bacteria that possess them.

Understanding the mechanisms of bacterial pathogenicity is fundamental to further investigate infectious diseases, since these mechanisms are, on many cases, poorly understood. The analysis of protein profiles of bacteria in stress situations can represent an integrated approach for the development of new therapeutic strategies and antimicrobial agents.

The goals of the present study were the characterization of 12 virulence factor genes, using PCR with specific primers, in 63 isolates of *Enterococcus* spp., obtained from fecal samples of seagulls (*Larus cachinnans*), and the analysis of the monodimensional protein profiles of 29 of these isolates. It was also analyzed the production of gelatinase and the haemolytic activity of the isolates.

The *cylL_L* gene was found in 41 of the isolates, followed by the *cpd* gene, present in 39. The *gelE* and *cylM* genes were found in 25 of the isolates, the *hyl* gene was found in 22, the *esp* e *ace* genes were detected in 19, the *cylB* gene was found in 10 and the *cylA* gene was present in only 5 of the cases. None of the isolated presented the *agg*, *fsr* and *cylL_S* genes. Only 4 isolates didn't present any virulence factor gene. It was detected a maximum number of 8 genes in two isolates (1 *Enterococcus* spp. presented the *gelE*, *hyl*, *cpd*, *ace*, *cylA*, *cylB*, *cylL_L* and *cylM* genes, and the other isolated of the *E. faecium* species presented the *gelE*, *hyl*, *esp*, *ace*, *cylA*, *cylB*, *cylL_L* and *cylM* genes).

None of the isolates displayed β -haemolytic activity or had the totality of the *cyl* operon present. In relation to the production of gelatinase, it was observed that the great majority of the isolates presented positive gelatinase activity. Some of the isolates where the *gelE* gene was detected weren't capable of degrading gelatin.

Through proteomic analysis, reproducible monodimensional protein profiles were obtained, where it was possible to distinguish protein bands characteristic of the species studied. It was observed a great polymorphism of bands, and the protein profiles of isolates of a certain species were very similar between themselves. It was also possible to pinpoint some bands present in only one isolate.

The proteomic analysis of bacteria carrying resistance and virulence genes, is very important for the identification of proteins, to later build protein maps for proteome comparison, and also for the development of new antibiotics for treatment of multiresistant infections, currently which have problematic therapeutics.

Complementarily, the monitorization of the presence of virulence factor genes, as well as the correlation between these and antibiotic multi-resistance in enterococci isolates it's important for the determination of the dissemination patterns of these determinants. This is particularly important in migratory animals, as in the case of seagulls, since they travel long distances and contact humans and other animals during migration, functioning as a vehicle of transmission of these genes.

Keywords: *Enterococcus* spp.; Virulence Factors; Antibiotics; Seagulls; SDS-PAGE; Monodimensional electrophoresis.

Índice geral

1 – Revisão Bibliográfica	1
1.1 – <i>Enterococcus</i> spp.	1
1.1.1 – Caracterização e identificação do género	1
1.1.2 – Taxonomia	2
1.1.3 – Importância dos estudos de resistência a antibióticos em <i>Enterococcus</i> spp.	3
1.2 – Elementos genéticos de transferência de genes de resistência	6
1.2.1 – Plasmídeos	7
1.2.2 – Transposões e sequências de inserção	8
1.2.3 – Integções	9
1.3 – Factores de Virulência	11
1.3.1 – Citolisina	12
1.3.2 – Gelatinase	14
1.3.3 – Factor de agregação	15
1.3.4 – Proteína de superfície extracelular	16
1.3.5 – Hialuronidase	17
1.3.6 – Factor acessório de colonização	17
1.3.7 – Feromonas sexuais	18
1.3.8 – Superóxido extracelular	19
1.3.9 – Ácido lipoteicóico	19
1.4 – Importância das gaivotas como veículos de transmissão de resistências a antibióticos e factores de virulência	20
1.5 - Importância da abordagem proteómica	20
1.6 – Proteómica aplicada ao estudo de factores de virulência e resistência a antibióticos em bactérias	25
1.6.1 – Análise proteómica em <i>Enterococcus</i> spp.	27
1.7 - Técnicas utilizadas em análise proteómica	28
2 - Objectivos	30
3 – Material e Metodologia	31
3.1 – Isolados de enterococos obtidos de gaivotas	31
3.2 – Determinação da actividade da gelatinase	32
3.3 – Determinação da actividade hemolítica	32

3.4 – Determinação dos factores de virulência com recurso a primers específicos	32
3.4.1 – Extracção de DNA	32
3.4.2 – Preparação dos tubos de PCR	33
3.4.3 – Primers e condições de PCR	33
3.4.4 – Preparação dos géis para electroforese horizontal	35
3.4.5 – Corrida electroforética	36
3.5 – Preparação das amostras para SDS-PAGE	36
3.5.1 – Preparação dos meios de crescimento	36
3.5.2 – Crescimento e repicagem das bactérias	36
3.5.3 – Solubilização das proteínas	37
3.6 – SDS-PAGE	37
3.6.1 – Montagem das placas de electroforese	38
3.6.2 – Preparação dos géis	38
3.7 – Coloração dos géis de acrilamida	40
3.7.1 – Coloração com Azul de “Coomassie” R250	40
4 – Resultados	41
4.1 – Genes de factores de virulência	41
4.2 – Actividade gelatinase	43
4.3 – Actividade hemolítica	44
4.4 – Relação entre o fenótipo de resistência a antibióticos e a presença de genes codificantes de factores de virulência	44
4.5 – Perfis proteicos monodimensionais	47
5 – Discussão	50
5.1 – Factores de virulência de isolados de <i>Enterococcus</i> spp. de gaivota	51
5.2 – Análise SDS-PAGE dos perfis proteicos dos isolados de <i>Enterococcus</i> spp. de gaivotas	55
6 – Conclusão	60
7 – Bibliografia	62
Anexos	76

Índice de tabelas

Tabela 1 – Resistência intrínseca e adquirida a vários antibióticos em enterococos (Adaptado de Gold, 2001).	5
Tabela 2 – Funções dos factores de virulências presentes em <i>Enterococcus faecalis</i> (Adaptado de Kayaoglu & Orstavik, 2004).	12
Tabela 3 – Composição da reacção de PCR.	33
Tabela 4 – Sequências nucleotídicas de primers de PCR para genes codificantes de factores de virulência.	33
Tabela 5 - Modificações ao protocolo descrito por Laemmli, 1970.	38
Tabela 6 – Composição do gel de separação, com quantidades referentes a 2 géis.	39
Tabela 7 – Composição do gel de concentração, com quantidades referentes a 2 géis.	39
Tabela 8 – Genes codificantes de factores de virulência presentes em isolados de gaivota.	41
Tabela 9 – Número de genes de virulência presentes nos isolados estudados.	42
Tabela 10 - Espécies de enterococos distribuídas pelas combinações de factores de virulência detectadas em isolados não resistentes à vancomicina.	42
Tabela 11 – Espécies de enterococos distribuídas pelas combinações de factores de virulência detectadas em isolados resistentes à vancomicina (VRE).	43
Tabela 12 – Número de isolados com actividade α -hemolítica distribuídos por espécies.	44
Tabela 13 – Relação entre o fenótipo de resistência a antibióticos e os genótipos de factores de virulência nos isolados não resistentes à vancomicina.	45
Tabela 14 – Relação entre o fenótipo de resistência a antibióticos e os genótipos de factores de virulência nos isolados resistentes à vancomicina.	47

Índice de figuras

Figura 1 – Posição filogenética do género <i>Enterococcus</i> (adaptado de Klein, 2003).	3
Figura 2 – Organização do operão <i>cyl</i> (adaptado de Gaspar <i>et al.</i> , 2009).	13
Figura 3 – Modelo da maturação e regulação da citolisina (adaptado de Haas <i>et al.</i> , 2002).	14
Figura 4 – Organização do locus <i>fsr</i> e dos genes <i>gelE</i> e <i>sprE</i> (adaptado de Nakayama <i>et al.</i> , 2006).	15
Figura 5 – Estrutura da proteína Esp, da estirpe MMH594 de <i>Enterococcus faecalis</i> , evidenciando o péptido <i>signal</i> (SP), as regiões N- e C-terminal e as repetições A, B e C. (Adaptado de Toledo-Arana <i>et al.</i> , 2001).	17
Figura 6 - Mecanismos pelos quais um único gene pode dar origem a vários produtos (adaptado de Graves & Haystad, 2002).	22
Figura 7 – Áreas da proteómica e sua aplicação às ciências biológicas (adaptado de Graves & Haystad, 2002).	22
Figura 8 – Imagem do gel de electroforese resultante da amplificação por PCR do gene <i>gelE</i> . Poço 1 – controlo negativo; Poço2 – controlo positivo; Poços 3 a 24 – isolados 1 a 22.	41
Figura 9 – Imagem exemplificativa da actividade gelatinase positiva em colónias de enterococos.	44
Figura 10 – Gel monodimensional de estirpes de <i>Enterococcus</i> spp. Poço 1 – <i>Enterococcus</i> spp. Gv39; Poço 2 – Marcador; Poço 3 a 7 – <i>E. faecium</i> Gv24, Gv28, Gv20, Gv41VRE e Gv41; Poço 8 e 9 – <i>E. hirae</i> Gv31 e Gv43; Poço 10 e 11 – <i>E. faecium</i> Gv12 e Gv50VRE; Poço 12 a 15 – <i>E. durans</i> Gv56VRE, Gv01VRE, Gv02VRE e Gv03VRE. Legenda: Ef – <i>E. faecium</i> ; Eh – <i>E. hirae</i> ; Ed – <i>E. durans</i> .	48
Figura 11 – Gel monodimensional de estirpes de <i>Enterococcus</i> spp. Poço 1 e 2 – <i>E. faecium</i> Gv02e Gv53; Poço 3 – Marcador; Poço 4 – <i>E. faecalis</i> Gv49; Poço 5 a 11 – <i>E. faecium</i> Gv26, Gv05, Gv03, Gv04, Gv23, Gv27 e Gv07; Poço 12 – <i>E. hirae</i> Gv38; Poço 13 – <i>E. faecalis</i> Gv44; Poço14 – <i>E. durans</i> Gv56; Poço 15 – <i>E. faecium</i> Gv50. Legenda: Ef – <i>E. faecium</i> ; Eh – <i>E. hirae</i> ; Ed – <i>E. durans</i> ; Efa – <i>E. faecalis</i> .	49

Lista de abreviaturas

% - Percentagem

µL – Microlitro

2-D – Duas dimensões – *Two dimensions*

3-D – Três dimensões – *Three dimensions*

Ace – Factor acessório de colonização - *Accessory Colonization Factor*

ace – Gene codificante do factor acessório de colonização Ace

Agg – Factor de agregação – *Aggregation Substance*

agg – Gene codificante do factor de agregação Agg

agr – Gene acessório regulador em *Staphylococcus aureus* – *Acessory Gene Regulator*

AMP - Ampicilina

APS – Persulfato de amónia – *Ammonium persulfate*

asa1 – Gene codificante de factor de agregação

ATP – Adenosina Trifosfato

BHI – Infusão de cérebro e coração – *Brain-Heart-Infusion*

blaIMP – Gene cassette que confere resistência a carbapenemos

cad – Gene codificante de feromona sexual

CC17 – Complexo clonal 17 – *Clonal Complex 17*

ccf – Gene codificante de feromona sexual

CHL – Cloramfenicol

CIP – Ciprofloxacina

Cna – Proteína de ligação ao colagénio em *Staphylococcus aureus*

cob – Gene codificante de feromona sexual

cpd – Gene codificante de feromona sexual

cps – Polissacárido capsular – *Capsular Polysaccharid*

Cyl – Citolisina

cylA – Gene codificante da proteína CylA

CylA – Proteína responsável por modificações pós-traducionais à citolisina

cylB – Gene codificante da proteína CylB

CylB – Proteína responsável por modificações pós-traducionais à citolisina

cylII – Gene responsável pela imunidade celular da citolisina

cylL_L – Gene codificante da subunidade proteica CylL_L

CylL_L – Subunidade grande da citolisina

cylL₅ – Gene codificante da subunidade proteica CylL₅

CylL₅ – Subunidade pequena da citolisina

cylM – Gene codificante da proteína CylM

CylM – Proteína responsável por modificações pós-traducionais à citolisina

cylR1 – Gene codificante da proteína CylR1

CylR1 – Proteína reguladora da citolisina

cylR2 – Gene codificante da proteína CylR2

CylR2 – Proteína reguladora da citolisina

ddl – Gene codificante da enzima citoplasmática D-alanil-D-alanina ligase

DIGE – *Difference Gel Electrophoresis*

DNA – Ácido deoxirribonucleico – *Deoxyribonucleic acid*

DTT – Ditionietol - *Dithiothreitol*

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra acético – *Ethylenediamine tetraacetic acid*

ERY – Eritromicina

ESI – Ionização por electrospray – *Electrospray ionisation*

esp – Gene codificante da proteína de superfície extracelular de enterococos

Esp – Proteína de superfície extracelular de enterococos – *Enterococcal surface protein*

fsr – Locus regulador do gene *gelE*

FsrA – Factor de transcrição do péptido GBAP

fsrA – Gene codificante da proteína FsrA

FsrB – Cistina protease envolvida no processamento de FsrD

fsrB – Gene codificante da proteína FsrB

fsrC – Gene codificante da

FsrC – Histidina cinase membranar que activa FsrA

fsrD – Gene codificante da feromona activadora da biossíntese da gelatinase

g – Grama

GBAP – Feromona activadora da biossíntese da gelatinase - *Gelatinase Biosynthesis-Activating Pheromone*

gelE – Gene codificante da gelatinase

h – hora

HCl – Ácido clorídrico – *Hydrochloric acid*

HLGR – Resistência de alto nível à gentamicina – *High Level Gentamicin Resistance*

hyl – Gene codificante da hialuronidase

Hz – Hertz

IEF – Focalização isoelétrica – *Isoelectric focusing*

Inc – Grupo de incompatibilidade

intI – Gene codificante da integrase

IPG – Gradiente de pH imobilizado – *Immobilized pH gradient*

IS – Sequência de inserção – *Insertion sequence*

KAN - Canamicina

kb – Kilobases

kDa – Kilodaltons

l - Litro

LC – Cromatografia líquida – *Liquid chromatography*

M – Molar

mA – Miliampere

MALDI-TOF – Ionização/Dessorção de matriz assistida por laser – tempo de voo – *Matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight*

mg – Miligrama

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

min – Minuto

ml – Mililitro

mL – Mililitro

mm – Milímetro

mM – Milimolar

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro – *Messenger Ribonucleic acid*

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina – *Methicilin resistant Staphylococcus aureus*

MS – Espectrometria de massa – *Mass Spectrometry*

MS – Espectrometria de massa – *Mass Spectrometry*

MSCRAMM – *Microbial surface component recognizing adhesive matrix molecule*

NaCl – Cloreto de Sódio

ng – Nanograma

nm – Nanômetro

°C – Graus Celsius

ORF – *Open reading frame*

P1 – Promotor do integrão

PAI – Ilha de patogenicidade

pb – pares de bases

PBS – Solução salina fosfatada – *Phosphate buffered saline*

PCR – Reacção em cadeia da polimerase – *Polymerase Chain Reaction*

pI – Ponto isoeléctrico – *Isoelectric point*

POP – 2,4 diphenyloxazole

qacEA1 – Gene de resistência a sulfonamidas

QD – Quinupristina-Dalfopristina

rep-PCR – *Repetitive Extragenic Palindrome* – *Polimerase Chain Reaction*

Rib – Proteína que confere resistência a proteases em *Streptococcus* spp.

RNA – Ácido ribonucleico – *Ribonucleic acid*

rpm – Rotações por minuto

rRNA – Ácido ribonucleico ribossomal

RT-PCR – *Reverse Transcriptase* – *Polimerase Chain Reaction*

SDS – Dodecil sulfato de sódio – *Sodium dodecyl sulfate*

SDS-PAGE – Electroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio – *Sodium dodecyl sulfate polyacrilamye gel electrophoresis*

SI – Super integrões

sodA – Gene codificante da superóxido dismutase

sprE – Gene codificante de serina protease

STR – Estreptomicina

sul1 – Gene de resistência a sulfonamidas

TBE – Tris-Borato EDTA

TCA – Ácid tricloroacético – *Trichloroacetic acid*

TEMED – Tetrametiletilenodiamina – *Tetramethylethylenediamine*

TET – Tetraciclina

TNF- α – Factor de necrose tumoral alfa – *Tumor Necrosis Factor Alfa*

Tris – Hidroximetil aminometano – *Hidroxymethyl aminometane*

TSA – Trypticase Soy Agar

V – Volt

van – Genes de resistência à vancomicina

VAN – Vancomicina

VRE – Enterococos resistentes à vancomicina – *Vancomycin Resistant Enterococci*

W – Watts

1 – Revisão Bibliográfica

1.1 – *Enterococcus* spp.

1.1.1 – Caracterização e identificação do género

O género *Enterococcus* pertence a um grupo de microorganismos conhecidos como bactérias ácido lácticas e caracterizadas como sendo Gram-positivas, catalase-negativas, oxidase-negativas, anaeróbias facultativas e com forma de cocos individuais que se dispõem em pares (diplococos) ou em cadeia (Foulquié Moreno *et al.*, 2006).

Apesar de serem bactérias comensais que habitam o intestino de vários animais são encontradas, frequentemente, em alimentos, plantas, água e solos, provavelmente como resultado da disseminação a partir de matéria fecal (Giraffa, 2002). As espécies *E. faecalis* e *E. faecium* são as mais frequentes nos tractos intestinais dos humanos e de vários animais (sendo que a primeira está presente em maior número) e sendo as espécies *E. mundtii* e *E. casseliflavus* comumente encontradas em plantas (Klein, 2003; Devriese *et al.*, 2006).

As espécies de *Enterococcus* são capazes de crescer num espectro de temperaturas que varia de 5 a 50°C, sendo a temperatura óptima para o seu crescimento de 42,7°C em condições aeróbias (Fisher & Phillips, 2009). A maioria das bactérias deste género consegue crescer na presença de 6,5% NaCl, a 40% de bÍlis e a um pH de 9.6, conseguindo sobreviver a temperatura de 60°C durante 30 minutos. São excepções as espécies *E. avium*, *E. saccharominimus*, *E. cecorum* and *E. columbae*, as quais têm um fraco índice de crescimento na presença de 6,5% de NaCl. A maioria das espécies é capaz de hidrolisar a esculina e possui o antÍgénio D de Lancefield (são excepção *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. dispar*, *E. pseudoavium*, *E. saccharolyticus* e *E. sulfureus*). As espécies *E. mundtii*, *E. casseliflavus*, *E. flavescens* e *E. sulfureus* produzem um pigmento amarelo e *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* são móveis (Jay *et al.*, 2005; Foulquié Moreno *et al.*, 2006).

Não existem características fenotÍpicas que distingam as espécies de enterococos de outros cocos Gram-positivos e catalase-negativos, sendo a identificação usualmente feita através de testes bioquÍmicos (Fisher & Phillips, 2009). No entanto, as semelhanças entre algumas espécies tornam difícil a sua distinção.

Para uma identificação rápida e confiável é essencial o uso de métodos moleculares (Klein, 2003). A detecção dos genes 16S e 23S rRNA é precisa, mas é

incapaz de diferenciar algumas espécies, como é o caso de *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*, os quais têm uma homologia de 99,8% no gene 16S rRNA (Ogier & Serror, 2008).

Têm sido aplicados métodos alternativos, os quais usam *primers* para detectar espaçadores intergênicos de rRNA e genes específicos como *ddl*, *van*, *ace*, *sodA*. Também a amplificação do gene de regulação transcricional Ef0027, a sequenciação dos genes *ddl*, *cpn60* e *atpA*, e o uso de rep-PCR com o primer (GTG)₅ têm sido utilizados para discriminação das espécies do gênero *Enterococcus* (Ogier & Serror, 2008).

1.1.2 – Taxonomia

O termo enterococo foi empregue pela primeira vez em 1899 por Thiercelin e quatro anos mais tarde, este autor e Jouhaud propuseram o gênero *Enterococcus* para descrever diplococos Gram-positivos potencialmente patogênicos isolados do intestino (Klein, 2003; Hardie & Whiley, 1997). Este grupo foi posteriormente transferido para o gênero *Streptococcus*, tendo-lhe sido atribuído o epíteto *faecalis* por Andrewes e Horder em 1906 (Hardie & Whiley, 1997).

Em 1937, Sherman classificou as espécies de *Streptococcus* em quatro subgrupos: enterococci, lactic, viridans e pyogenic. O subgrupo enterococci era constituído por bactérias de origem fecal e incluía *Streptococcus faecalis*, *liquefaciens*, *zymogenes* e *durans*. Sherman notou que estas bactérias eram marcadamente diferentes das outras espécies devido a uma combinação de um espectro alargado de temperaturas de crescimento, grande tolerância a sal e alcalinidade, elevado ponto de morte térmica e resistência ao azul de metileno (Hardie & Whiley, 1997).

Em 1984, através de estudos de hibridação DNA-DNA e sequenciações do rRNA 16S foi demonstrado por Schleifer e Kilpper-Bälz que as espécies *Streptococcus faecium*, *faecalis*, *avium* e *gallinarum* eram suficientemente distintas das outras espécies de estreptococos e assim foi proposto a sua transferência para o gênero *Enterococcus* (Foulquié Moreno *et al*, 2006). Foi também criado o gênero *Lactococcus*, o qual inclui as bactérias do subgrupo lactic (Klein, 2003). A informação molecular obtida pela sequenciação do rRNA 16S permitiu a construção de um dendrograma (presente na Figura 1), o qual mostra a relação entre *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Lactococcus* (Fisher & Phillips, 2009).

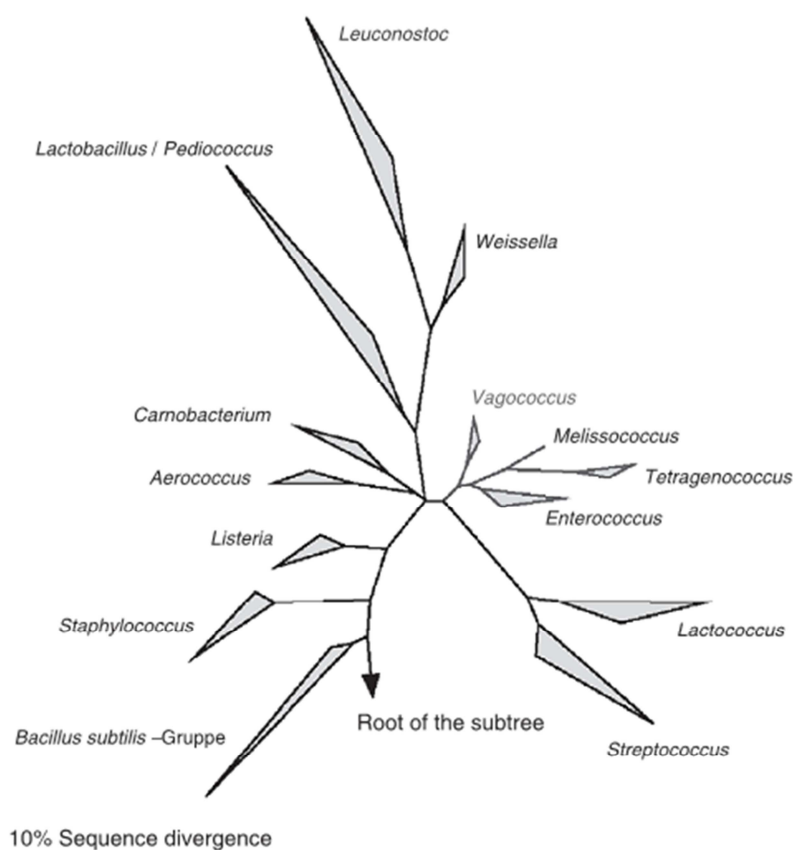


Figura 1 - Posição filogenética do género *Enterococcus* (adaptado de Klein, 2003).

1.1.3 – Importância dos estudos de resistência a antibióticos em *Enterococcus* spp.

Os enterococos foram, durante séculos, reconhecidos como organismos comensais comuns e não particularmente virulentos (Upadhyaya *et al*, 2009). Nas últimas décadas porém, têm vindo a emergir como uma das maiores causas de infecções nasocomiais em todo o mundo (Ogier & Serror, 2008).

Inofensivos em indivíduos adultos, os enterococos são patógenos oportunistas, especialmente em unidades de cuidados intensivos e em pessoas idosas e pacientes hospitalizados com doenças graves ou com um sistema imunitário deficiente (Gold, 2001; Ogier & Serror, 2008).

Estas bactérias foram reconhecidas como a segunda e a terceira causa mais comum de infecções do tracto urinário e bacteremia, respectivamente. Outras infecções vulgarmente causadas por enterococos são a sépsis hepatobiliar, endocardite, infecções pós-operatórias e sépsis neonatal (Fisher & Phillips, 2009).

As infecções são predominantemente causadas pelas espécies *E. faecalis* e *E. faecium*, as quais estão presentes em cerca de 80% e 20% dos isolados clínicos, respectivamente (Ogier & Serror, 2008). A razão para a predominância da espécie *E. faecalis* deverá estar ligada aos factores de virulência associados a esta espécie (Fisher & Phillips, 2009). Estudos efectuados por Coque e colaboradores e também por Treitman e colaboradores, ambos em 2005, indicam que a proporção de infecções por *E. faecium* tem vindo a aumentar, maioritariamente devido ao aumento do número de isolados resistentes a antibióticos nesta espécie.

As espécies de enterococos como *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* e *E. raffinosus* não são frequentes causas de infecção (Ogier & Serror, 2008).

As infecções provocadas por enterococos são, portanto, uma preocupação importante, e, como patógenos nasocomais, estas bactérias têm um impacto económico directo e significativo, prolongando a estadia dos doentes nos hospitais e requerendo uma terapêutica adicional (Wenzel & Edmond, 2001).

A resistência intrínseca, mediada por cromossomas, a alguns antibióticos é uma característica do género *Enterococcus* spp., apesar de algumas espécies, como *E. faecium*, serem mais resistentes que outras (Gold, 2001). Estas bactérias têm uma tolerância a baixas concentrações de várias classes de antibióticos, incluindo aminoglicosídeos, β -lactâmicos (cefalosporinas de terceira geração) e quinolonas (ver Tabela 1). Em particular, a espécie *E. faecium* é intrinsecamente resistente a altas concentrações de penicilina, a espécie *E. gallinarum* é resistente à vancomicina (tipo VanC) e a espécie *E. faecalis* é resistente a estreptograminas (Foulquié Moreno *et al.*, 2006; Ogier & Serror, 2008).

Tabela 1 – Resistência intrínseca e adquirida a vários antibióticos em enterococos (Adaptado de Gold, 2001).

Tipo de Resistência	Antibiótico
Intrínseca	β -lactâmicos (particularmente cefalosporinas e penicilinas resistentes às penicilases)
	Baixas concentrações de aminoglicosídeos
	Clindamicina
	Fluoroquinolonas
	Sulfametoxazol-Trimetoprim
Adquirida	Altas concentrações de β -lactâmicos (através de proteína de ligação à penicilina ou produção de β -lactamases)
	Altas concentrações de aminoglicosídeos
	Glicopéptidos (vancomicina e teicoplanina)
	Tetraciclina
	Eritromicina
	Fluoroquinolonas
	Rifampicina
	Cloranfenicol
	Ácido fusídico
	Nitrofurantoína

Para além da resistência intrínseca, os enterococos têm adquirido resistências, quer através de mutação ou da aquisição elementos genéticos (tais como transposões e plasmídeos), os quais lhes conferem resistência a vários antibióticos, especialmente glicopéptidos (vancomicina e teicoplanina) e à acção sinérgica dos β -lactâmicos e aminoglicosídeos (ver Tabela 1) (Marothi *et al*, 2005; Ogier & Serror, 2008).

O primeiro registo de enterococos resistentes a altas concentrações de antibióticos glicopéptidos foi publicado em 1989, quando Uttley e colaboradores reportaram um surto de *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina que infectavam pacientes na unidade renal de um hospital (Gold, 2001). Nessa altura o uso de vancomicina e teicoplanina tinha vindo a aumentar, em parte devido à presença de resistência à meticilina por parte de estafilococos. Também, a administração oral de vancomicina, era muito usada no tratamento de colite devido a *Clostridium difficile*. Na área animal, grandes quantidades de glicopéptidos, especificamente avoparcina, era utilizada como promotor do crescimento animal (Gold, 2001; Klein, 2003).

O uso descontrolado deste tipo de antibióticos conduziu à emergência de enterococos resistentes à vancomicina (VRE).

As infecções devidas a bactérias com este tipo de resistência são de difícil terapêutica, uma vez que a vancomicina é um antibiótico considerado de “último recurso” para o tratamento de infecções provocadas por bactérias Gram-positivas multirresistentes (como é o caso de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA)) e é, normalmente, utilizado quando as penicilinas se provam ineficazes (Cetinkaya *et al.*, 2000; Klein, 2003). Desde 2002 foram documentadas nos Estados Unidos da América, dez transferências de resistência à vancomicina de enterococos para estirpes de MRSA (Sievert *et al.*, 2008).

A resistência à vancomicina pode ser intrínseca (*vanC*) ou adquirida (*vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL* (Boyd *et al.*, 2008) e *vanN* (Leclercq *et al.*, 2009). O fenótipo mais frequentemente transmitido é o *vanA*, o qual está associado a um alto nível de resistência induzível à vancomicina e resistência cruzada à teicoplanina, resultado da aquisição do transposão Tn1546 ou de outros com este intimamente relacionados. O fenótipo *vanB* é o segundo mais frequente, o qual mostra níveis variados de resistência induzível à vancomicina. Estes dois fenótipos são mais frequentes nas espécies *E. faecalis* e *E. faecium* (Foulquié Moreno *et al.*, 2006; Ogier & Serror, 2008).

1.2 – Elementos genéticos de transferência de genes de resistência

Pouco tempo após a introdução de um novo antibiótico verifica-se a emergência de resistência a este. A magnitude deste problema é significativamente maior devido à capacidade das bactérias transferirem horizontalmente genes de resistência e devido ao uso desregulado de antibióticos, o qual criou uma enorme pressão selectiva que favorece as bactérias resistentes (Mathur & Singh, 2005).

Os enterococos funcionam como um reservatório de genes de resistência. Como residentes da flora intestinal humana e animal, estas bactérias são capazes de adquirir genes de resistência de outros comensais, os quais podem ser subsequentemente transmitidos a outras bactérias patogénicas (Hegstad *et al.*, 2010).

A localização dos genes de resistência em elementos móveis (plasmídeos, transposões e integroões) torna possível a sua transferência e acumulação, tornando as bactérias que as possuem, multirresistentes.

1.2.1 – Plasmídeos

Os plasmídeos são elementos extra-cromossômicos com um tamanho que varia entre os 1500pb e os 400000pb, e os quais se replicam autonomamente. Podem existir várias cópias numa mesma célula, caso este seja de pequeno tamanho, mas no caso de plasmídeos grandes é comum existir apenas uma cópia por célula. Os plasmídeos não são necessários à sobrevivência bacteriana mas normalmente conferem-lhe benefícios, como genes de resistência a antibióticos, funções metabólicas e factores de virulência (Davison, 1999).

Existem vários critérios para classificar plasmídeos, particularmente os relacionados com bactérias Gram-positivas. Os plasmídeos que não conseguem co-residir na mesma célula são agrupados em grupos de incompatibilidade (Inc) (Hegstad *et al.*, 2010). Os plasmídeos Inc18 constituem um grande grupo de plasmídeos com um largo espectro de hospedeiros, os quais se encontram frequentemente em bactérias do género *Enterococcus* spp., especialmente na espécie *E. faecium*. Dois dos plasmídeos tipo Inc18 mais bem caracterizados são o pAMb1 (originalmente identificado em *E. faecalis*), o qual codifica resistência a macrólidos, lincosamidas e estreptogramina B, e pIP501, o qual codifica, adicionalmente, resistência ao cloramfenicol (Palmer *et al.*, 2010).

Análises de sequência de plasmídeos mostram que estes não são estruturas estáticas, mas que se recombinam de modo a formar derivados com replicação híbrida e funções de manutenção, servindo de um meio de aquisição de múltiplas resistências a antibióticos (Palmer *et al.*, 2010). Um exemplo disto é o plasmídeo pRE25 de *E. faecalis* com 50kb, o qual contém genes de resistência a 12 antibióticos, sendo que 30,5kb da sua sequência parecem derivar do plasmídeo pIP501 e as restantes regiões parecem ser originárias de um plasmídeo de estafilococos (Schwarz *et al.*, 2001).

Os principais mediadores da resistência à vancomicina em *E. faecalis* e *E. faecium* são plasmídeos como pHTb, os quais transportam o transposão Tn1546 (o qual por sua vez contém o operão *vanA*), e pMG1. O transposão Tn1546 está presente num vasto número de plasmídeos Inc18 (Palmer *et al.*, 2010).

Existe um grupo particular de plasmídeos conjugativos, com um pequeno espectro de hospedeiros, os quais respondem a feromonas. Este tipo de plasmídeos tem sido descrito em *E. faecalis*, sendo raro em outras espécies de enterococos (Hegstad *et*

al., 2010). O mecanismo de conjugação destes plasmídeos é baseado na existência de feromonas, as quais são produzidas por potenciais receptores desse plasmídeo. Este sistema de conjugação tem sido mais extensamente examinado nos plasmídeos pAD1, pAM373 e pCF10 (Wardal *et al.*, 2010).

Os plasmídeos que respondem a feromonas conferem características adicionais a *E. faecalis*, como genes codificantes de bacteriocinas, resistência a ultravioletas, resistência a antibióticos e produção de citolisina. A resistência à vancomicina é pouco comum neste tipo de plasmídeos, no entanto foi identificado por Zheng e colaboradores, em 2009, um plasmídeo que responde a feromonas *vanB* (pMG2200), isolado de uma infecção por *E. faecalis* no Japão (Palmer *et al.*, 2010).

As bactérias *E. faecalis* que contenham plasmídeos que respondem a feromonas podem detectar e responder a sinais (enviados sob a forma de feromonas) produzidos por outros géneros de bactérias, promovendo assim a disseminação de genes de resistência (Palmer *et al.*, 2010).

1.2.2 – Transposões e sequências de inserção

Estes elementos genéticos são sequências de DNA com capacidade de se moverem dentro do genoma. Como não possuem replicação autónoma necessitam de estar integrados num cromossoma ou plasmídeo (Bennett, 2002). Os elementos transponíveis são ubíquos no genoma bacteriano, sendo a transposição o fenómeno responsável por muitos dos rearranjos observados entre replicões bacterianos (Bennett, 2004).

As sequências de inserção (IS) são os elementos transponíveis mais simples, sendo constituídas apenas por genes que promovem e regulam a sua transposição (normalmente a enzima transposase). Estes elementos têm entre 700 e 2000pb e são flanqueados por extremos inversamente repetidos, os quais são reconhecidos pela transposase (Lee & Kim, 2003). As famílias de IS mais frequentemente encontradas em isolados clínicos de enterococos incluem *IS3*, *IS6*, *IS30*, *IS256* e *ISL3* (Hegstad *et al.*, 2010).

Os transposões são semelhantes às sequências de inserção, mas para além do gene que codifica a sua transposição contêm genes adicionais, como por exemplo, genes que codificam resistência a antibióticos. Estes elementos têm um tamanho que vai desde

3-4 kb, no caso de transposições com apenas um ou dois genes adicionais, a cerca de dez vezes mais (Bennett, 2004).

Os transposições podem ser classificados em três grupos: transposições compostos, transposições da família *Tn3* e transposições conjugativos (Hegstad *et al.*, 2010).

Os transposições compostos devem a sua mobilidade intracelular à presença de cópias de IS da mesma família que actuam conjuntamente para mover o DNA entre elas. Este tipo de transposições tem sido associado com resistência de alto nível à gentamicina (HLGR) ou resistência a glicopéptidos relacionada com *vanB1* (Hegstad *et al.*, 2010).

A família dos transposições *Tn3* move-se intracelularmente devido a um mecanismo replicativo promovido pela transposase (*TnpA*) e resolvase (*TnpR*). Este tipo de transposições medeia a resistência de alto nível a glicopéptidos (tipo *vanA*), macrólidos, lincosamida e estreptogramina B em enterococos (Hegstad *et al.*, 2010).

Os transposições conjugativos codificam toda a informação necessária à sua própria excisão, conjugação e integração num novo hospedeiro. Este tipo de transposições está associado à resistência à tetraciclina, glicopéptidos relacionados com *vanB2*, macrólidos, lincosamida e estreptogramina B (Hegstad *et al.*, 2010). Alguns destes transposições, para além de se poderem transferir, podem mobilizar plasmídeos ou segmentos de DNA de uma bactéria para outra (Roberts, 1998). São de salientar os transposições conjugativos da família *Tn916/Tn1545*, devido ao seu enorme espectro de hospedeiros (Mathur & Singh, 2005).

1.2.3 – Integrações

O integrão, primeiramente identificado por Stokes e Hall em 1989, é uma sequência genética, a qual se admite ser o mecanismo primário pelo qual as bactérias adquirem resistência aos antibióticos. A sequência génica do integrão consegue actuar como um sistema de recombinação sítio-específico, capaz de capturar ou excisar outros elementos génicos denominados de genes cassette (Roe & Pillai, 2003).

Um gene cassette é um elemento genético que existe sob a forma de DNA circular sem a capacidade de se replicar (uma vez que não possui promotor), quando se move de um integrão para outro. Quando se encontra inserido em cromossomas, plasmídeos ou transposições é uma estrutura linear. Os genes cassette têm usualmente 500pb a 1000pb, o que é suficiente para acomodar um gene, muitas vezes um que

confere resistência a antibióticos. Adicionalmente, possuem um local de recombinação de 59 bases, *attC* (Bennett, 2004). Os genes cassette podem ser transferidos entre bactérias e são linearizados por uma integrase (a qual reconhece o local *attC*) antes de serem inseridos no local de integração. Múltiplos genes cassette podem ser inseridos na sequência génica de um integrão de forma a conferir um fenótipo múltiplo de resistência a antibióticos (Bennett, 2004).

O integrão tem três características genéticas únicas, que o fazem capaz de inserir genes cassette, tais como o gene 5' *intI*, o qual codifica a integrase, o P1, o qual actua como o promotor de todos os genes cassette inseridos e o elemento *attI*, o qual é uma sequência invertida repetida, que actua como local de recombinação para os genes cassette linearizados (Roe & Pillai, 2003). A ligação *attI-attC* é mais específica que a ligação *attC-attC* e assim, quando há a inserção de um novo gene cassette este vai ficar mais perto do promotor do que o gene cassette que o precedeu. O novo gene, como fica mais perto do promotor vai ter uma maior expressão (Collins & Hall, 1995).

Os integrões podem ser divididos em dois grupos: os integrões de resistência (RI) e os super integrões (SI). O grupo dos super integrões compreende estruturas localizadas em cromossomas (primeiramente descritos em *Vibrio cholerae*), os quais têm um grande número de genes cassette com uma grande variedade de funções. Os integrões de resistência contêm genes cassette os quais codificam resistência a antibióticos, estando divididos em 3 classes, as quais foram definidas com base na homologia das integrases (Bennett, 2004; Fluit & Schmitz, 2004).

Os integrões classe 1, contêm o gene da integrase *intI1*, sendo que este representa a estrutura mais comum encontrada em patógenos bacterianos. A maioria destes integrões tem sido detectada dentro de transposições, como por exemplo o transposão *Tn21*, membro da família *Tn3* dos elementos transponíveis. Esta associação está largamente distribuída em bactérias Gram-negativo (Carattoli, 2003). A classe 1 de integrões contém uma sequência 3' conservada composta pelos genes de resistência *qacEΔ1* e *sul1* com uma *open reading frame*, *orf5*, localizada a downstream dos genes (Roe & Pillai, 2003).

Os integrões classe 2 (*intI2*) estão também distribuídos em bactérias patogénicas, tendo sido descritos dentro da família *Tn7* dos transposições. Os integrões classe 2 contêm uma sequência 3' conservada, composta do módulo génico *tns* o qual contém cinco genes que codificam proteínas envolvidas no movimento do transposão (Roe & Pillai, 2003).

A classe 3 de integrões (*intI3*) foi descrita, não estando associada a transposões, e contendo a gene cassette *blaIMP* a qual confere resistência a carbapenemos (antibióticos β -lactâmicos) (Carattoli, 2003).

Os genes da integrase da classe 2 e 3 de integrões apenas partilham 45% e 60% de similaridade aminoacídica com a classe 1, respectivamente (Carattoli, 2003).

1.3 – Factores de Virulência

Um factor de virulência é uma molécula efectora que aumenta a capacidade de um microorganismo causar doença, para além daquela intrínseca ao *background* da espécie (Mundy *et al.*, 2000).

Os factores de virulência podem ser codificados por genes presentes em plasmídeos conjugativos (como AS e Cyl) ou por regiões cromossómicas, como o *locus fsr*, as ilhas de patogenicidade (PAI), e o *locus cps* (Ogier & Serror, 2008).

As ilhas de patogenicidade são regiões distintas do genoma que contêm vários genes de virulência (Tendolkar *et al.*, 2003). No género *Enterococcus* foram primeiramente identificadas no genoma de uma estirpe de *E. faecalis* com multi-resistência a antibióticos, a qual causou um surto de infecções nosocomiais na década de 1980. Os genes encontrados codificavam transposases, reguladores transcripcionais e factores de virulência como a proteína de superfície (Esp), citolisina e o factor de agregação (Upadhyaya *et al.*, 2009).

Os factores de virulência estão ligados sobretudo à fuga à resposta imunitária, à absorção de nutrientes e à ligação a superfícies epiteliais (Poeta, 2006).

Vários estudos identificaram diversos factores de virulência em *Enterococcus* spp. sendo os mais estudados a citolisina, gelatinase, proteína de superfície (*esp*), factor de agregação, MSCRAMM Ace (Microbial surface component recognizing adhesive matrix molecule adhesin of collagen from Enterococci), serina protease e super-óxido extra-celular. Estes factores estão, porém, mais relacionados com a espécie *E. faecalis*, se bem que têm sido detectados em várias outras espécies de enterococos (Ogier & Serror, 2008; Poeta *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2008; Upadhyaya *et al.*, 2009).

Tabela 2 – Funções dos factores de virulências presentes em *Enterococcus faecalis* (Adaptado de Kayaoglu & Orstavik, 2004).

Função	Factor de Virulência
<u>Adesão e Colonização</u>	Factor de agregação
	Outras adesinas (como a proteína de superfície extracelular e o factor acessório de colonização)
	Ácido lipoteicóico
<u>Resistência à defesa do hospedeiro</u>	Factor de agregação
<u>Inibição de outras bactérias</u>	Citolisina
	AS-48
	Outras bacteriocinas
<u>Dano tecidual</u>	Ácido lipoteicóico
	Superóxido extracelular
	Gelatinase
	Hialuronidase
	Citolisina
<u>Indução de inflamação</u>	Feromonas sexuais
	Ácido lipoteicóico

1.3.1 – Citolisina

A citolisina é uma proteína citolítica capaz de lisar eritrócitos de vários animais, sendo os mais susceptíveis à lise os de cão, cavalo, coelho e humanos (Alouf & Popoff, 2006). As estirpes de enterococos que produzem esta proteína são virulentas e estão associadas a um aumento da severidade das infecções (Upadhyaya *et al.*, 2009). Para além da propriedade β -hemolítica, a citolisina é bactericida contra um vasto espectro de bactérias Gram-positivas (Poeta, 2006; Fisher & Phillips, 2009). A citolisina é um dos factores de virulência melhor caracterizados em enterococos e pertence à classe dos lantibióticos, os quais são definidos como bacteriocinas que possuem os aminoácidos lantionina, β -metil lantionina, desidroalanina e desidrobutirina (Gaspar *et al.*, 2009; Shankar *et al.*, 2004).

A primeira caracterização da citolisina em *Enterococcus* foi levada a cabo em 1934 por Todd, o qual estudou a actividade hemolítica de estirpes de estreptococos do grupo D. Este investigador observou a ocorrência de hemólise em agar sangue, embora

não tenha sido capaz de detectar esta actividade em culturas líquidas (Alouf & Popoff, 2006).

A citolisina é produzida por um processo complexo, o qual requer os produtos de oito genes: *cylR1*, *cylR2*, *cylL_L*, *cylL_S*, *cylM*, *cylB*, *cylA* e *cylI* (Shankar *et al.*, 2004). Os genes *cylL_L* e *cylL_S* correspondem às unidades estruturais da citolisina, os genes *cylM*, *cylB* e *cylA* são responsáveis por modificações pós-traducionais e têm funções secretoras e o gene *cylI* é responsável pela imunidade celular. Todos estes seis genes são transcritos como uma unidade, sendo que os genes reguladores *cylR1* e *cylR2* correspondem à segunda unidade transcripcional, a qual é transcrita na direcção oposta à primeira (ver Figura 2) (Coburn & Gilmore, 2003). Estes genes podem estar localizados em plasmídeos que respondem a feromonas, como o plasmídeo pAD1 ou, menos frequentemente, em regiões cromossómicas (Jett *et al.*, 1994; Day *et al.*, 2003).



Figura 2 – Organização do operão *cyl* (adaptado de Gaspar *et al.*, 2009).

As subunidades proteicas CylL_L (subunidade grande) e CylL_S (subunidade pequena) são sintetizadas como precursores de 68 e 63 aminoácidos, respectivamente, e são 5 a 6 vezes mais abundantes que os restantes transcritos do operão (Shankar *et al.*, 2004; Alouf & Popoff, 2006). Estes precursores sofrem modificações pós-traducionais, características dos lantibióticos, pelo polipéptido de 993 aminoácidos CylM, produto do gene *cylM*. Após estas modificações ambas as subunidades interagem com o produto do gene *cylB*, CylB, o qual cataliza a externalização das subunidades bem como o corte proteolítico de 24 e 36 aminoácidos de CylL_L e CylL_S, respectivamente, o qual gera CylL_L' e CylL_S'. Posteriormente à secreção, uma sequência idêntica de 6 aminoácidos é removida da extremidade N-terminal de cada subunidade pela serina protease CylA, produto do gene *cylA*. A remoção dos seis aminoácidos gera as subunidades activas da toxina, CylL_L'' e CylL_S''. O produto do gene *cylI* providencia protecção às estirpes produtoras de citolisina (Figura 3) (Shankar *et al.*, 2004).

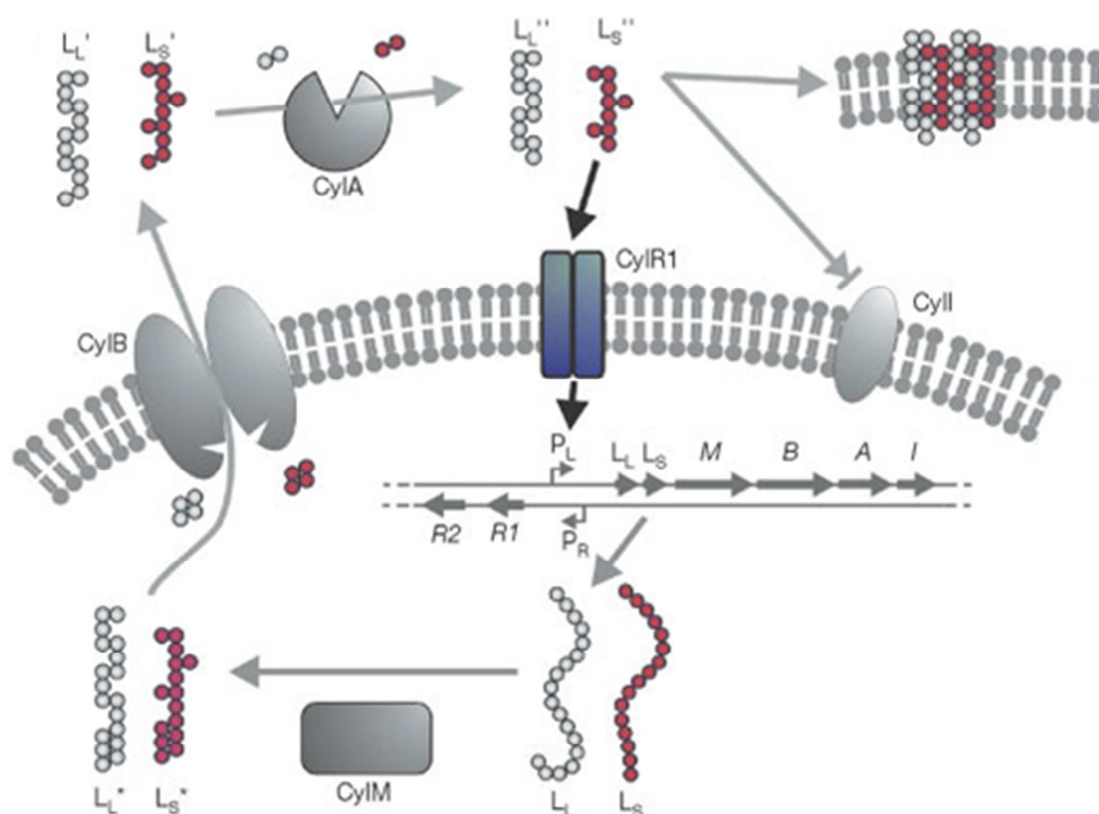


Figura 3 – Modelo da maturação e regulação da citolisina (adaptado de Haas *et al.*, 2002).

Estudos sobre a regulação da expressão do operão da citolisina têm revelado algumas características inesperadas do sistema. Foi evidenciado que o promotor da citolisina é largamente reprimido pela acção dualística das proteínas CylR1 e CylR2. Por outro lado, a forma activa da subunidade pequena CylL_S'' induz a expressão do operão assim que excede a concentração *threshold* (figura 3). Ainda, na ausência de células alvo, a forma activa da subunidade maior CylL_L'' inibe a actividade auto-indutiva de CylL_S'' (Alouf & Popoff, 2006).

1.3.2 – Gelatinase

A gelatinase é uma zinco metaloprotease com a capacidade de hidrolisar gelatina, colagénio, caseína, hemoglobina e outros péptidos bioactivos, de maneira a fornecer nutrientes à bactéria (Lopes *et al.*, 2006; Upadhyaya *et al.*, 2009). Esta enzima tem também um papel importante na formação de biofilmes, sendo codificada através da expressão do gene *gelE*, o qual se encontra no cromossoma bacteriano (Park *et al.*, 2007; Fisher & Phillips, 2009).

Outro gene *sprE*, o qual codifica uma serina protease, está localizado directamente a *downstream* e é co-transcrito com o gene *gelE* (figura 4). A transcrição de ambos os genes é regulada pelo locus *fsr* (Fisher & Phillips, 2009). Este locus, com uma sequência similar ao locus *agr* de *Staphylococcus aureus*, é composto por 4 genes: *fsrA*, *fsrB*, *fsrD* (Nakayama *et al.*, 2006) e *fsrC* (figura 4). Os produtos dos genes *fsrA*, *fsrB* e *fsrC* respondem à acumulação extracelular de um péptido cíclico denominado GBAP (gelatinase biosynthesis-activating pheromone), o qual é codificado pelo gene *fsrD*. O péptido FsrB actua como uma cisteína protease, estando envolvido no processamento do transcrito FsrD. A acumulação deste péptido no espaço extracelular é sentida pela histidina cinase membranar FsrC, o que leva à activação do regulador da resposta e factor de transcrição FsrA (Papa & Perego, 2011).

A presença do gene *gelE* não implica que as estirpes demonstrem um fenótipo positivo (Lopes *et al.*, 2006). A ausência dos genes do locus *fsr* ou a presença de uma mutação num ou mais destes pode comprometer a expressão da gelatinase (Qin *et al.*, 2000).

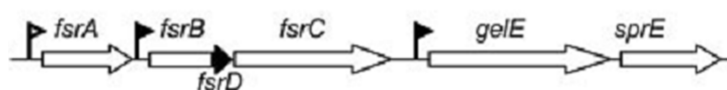


Figura 4 – Organização do locus *fsr* e dos genes *gelE* e *sprE* (adaptado de Nakayama *et al.*, 2006).

1.3.3 – Factor de agregação

O factor de agregação é uma proteína de superfície, Agg (codificada pelo gene *agg*), induzível por feromonas, com uma estrutura semelhante a um cabelo, estando ancorada à membrana bacteriana pela sua extremidade C-terminal (Jett *et al.*, 1994; Upadhyaya *et al.*, 2009).

A sua principal função é promover a transferência de plasmídeos durante a conjugação, através da formação de agregados entre a célula dadora e a receptora. A troca de plasmídeos é favorecida uma vez que o contacto entre as células se torna mais eficiente (Poeta, 2006; Aberna & Prabakaran, 2011).

Para além da promoção da transferência de plasmídeos (o que auxilia a disseminação de genes de resistência e de factores de virulência), esta proteína contribui para a patogenicidade dos enterococos através de vários mecanismos. Contém dois

motivos Arg-Gly-Asp, os quais são reconhecidos por integrinas, uma família de receptores membranares eucariotas. A presença das integrinas no epitélio intestinal promove a aderência e invasão das bactérias que apresentam este factor de virulência, de modo a haver translocação da barreira epitelial intestinal (Aberna & Prabakaran, 2011). A expressão de Agg conduz, também, a um aumento significativo da adesão a proteínas da matriz extracelular como a fibronectina, trombospondina, vitronectina e colagénio tipo I (Tendolkar *et al.*, 2003). Foi também evidenciado que os enterococos que expressam esta proteína são mais resistentes à fagocitose, através da inibição do *burst* oxidativo nos macrófagos (Upadhyaya *et al.*, 2009).

O factor de agregação e a citolisina têm acções sinérgicas, aumentando assim a virulência através da activação da regulação *quorum-sensing* da citolisina (Portenier *et al.*, 2003).

1.3.4 – Proteína de superfície extracelular

A proteína de superfície extracelular Esp (Enterococcal surface protein), está associada à parede celular bacteriana e foi inicialmente identificada em 1999 por Shankar e colaboradores numa bacterémia provocada por uma estirpe de *E. faecalis* resistente à gentamicina (Tendolkar *et al.*, 2003).

Esta proteína de alto peso molecular tem 1873 aminoácidos e é codificada pelo gene *esp*, o qual é composto por 5622 pb e se encontra dentro da ilha de patogenicidade (Toledo-Arana *et al.*, 2001; Heikens *et al.*, 2007; Fisher & Phillips, 2009). A região central da proteína consiste em unidades de repetição, as quais compõem cerca de 50% da proteína. A primeira unidade de repetição está localizada a downstream da extremidade N-terminal e consiste em 3 repetições de 84 resíduos codificados por repetições em tandem quase idênticas de 252 nucleótidos (repetições A). Sete unidades de repetições em tandem com 246 nucleótidos (repetições C) codificantes são flanqueadas pelas repetições B, as quais partilham 74% da sequência a nível aminoacídico (figura 5). A estrutura de múltiplas repetições altamente conservadas permite a expressão de formas alternadas que diferem no número de unidades de repetição (Tendolkar *et al.*, 2003). Esta proteína demonstra similaridade estrutural com as proteínas C alfa e Rib de estreptococos do grupo B e com a proteína Bap de *Staphylococcus aureus* (Toledo-Arana *et al.*, 2001).

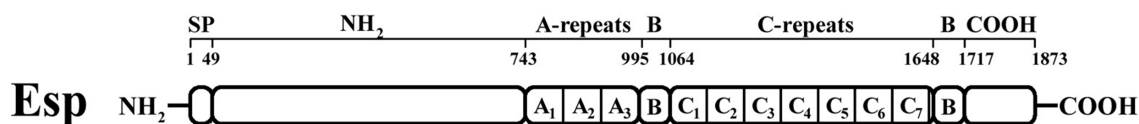


Figura 5 – Estrutura da proteína Esp, da estirpe MMH594 de *Enterococcus faecalis*, evidenciando o péptido *signal* (SP), as regiões N- e C-terminal e as repetições A, B e C. (Adaptado de Toledo-Arana *et al.*, 2001).

A proteína Esp tem como função a promoção da adesão e colonização de células eucariotas como as do epitélio do tracto urinário, bem como a formação de biofilmes (Heikens *et al.*, 2007). Vários estudos mostram que se o gene *esp* não for expresso é prevenida a capacidade de *E. faecalis* formar biofilmes (Fisher & Phillips, 2009).

1.3.5 – Hialuronidase

A hialuronidase é uma enzima associada a danos tecidulares, a qual actua sobre o ácido hialurónico (que é um glucosaminoglicano encontrado em tecido conectivo, neural e epitelial) (Frasher *et al.*, 1997; Fisher & Phillips, 2009). Esta proteína despolimeriza a molécula de glucosaminoglicano, facilitando assim a disseminação dos enterococos e suas toxinas nos tecidos hospedeiros (Kayaoglu & Orstavik, 2004). Outro papel putativo atribuído à hialuronidase é o fornecimento de nutrientes à bactéria, uma vez que os produtos de degradação do seu substrato alvo são dissacáridos os quais podem ser transportados e metabolizados intracelularmente pela bactéria (Hynes & Walton, 2000).

A hialuronidase em enterococos foi relacionada com o gene *hyl*, presente no cromossoma bacteriano. Recentemente, este gene foi descrito em enterococos, como codificante putativo de uma glicosil hidrolase, após comparação *in silico* com o gene *spy1600* de *Streptococcus pyogenes* (Freitas *et al.*; 2010; Panesso *et al.*, 2011). Esta proteína mostra homologia com hialuronidasas e glicosaminidasas descritas em *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*, as quais contribuem para a invasão da nasofaringe e pneumonia pneumocócica (Vankerckhoven *et al.*, 2004).

1.3.6 – Factor acessório de colonização

O factor acessório de colonização (Ace), codificado pelo gene *ace*, é uma proteína *collagen-binding*, a qual pertence à família de proteínas MSCRAMM

(microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules) e é similar à proteína Cna de *Staphylococcus aureus* (Kayaoglu & Orstavik, 2004). O gene *ace* é ubíquo em *E. faecalis* e está bastante conservado (Singh *et al.*, 2010).

Este factor de virulência medeia a aderência de *E. faecalis* a colagénio tipo I de rato e vaca, colagénio tipo IV e dentina humana e laminina de rato. A Ace liga-se ao colagénio através de um mecanismo denominado *Collagen Hug* (Singh *et al.*, 2010).

1.3.7 – Feromonas sexuais

A produção de feromonas sexuais por estirpes de *E. faecalis* e o seu efeito de indução de agregação bacteriana foi primariamente descrito em 1978 por Dunny e colaboradores. Feromonas sexuais são pequenos péptidos hidrofóbicos, constituídos por 7 ou 8 aminoácidos, codificados por genes presentes no cromossoma bacteriano. Estão maioritariamente presentes em *E. faecalis* mas foram, também, identificados em outras espécies (Kayaoglu & Orstavik, 2004).

Estes péptidos de sinalização são designados de feromonas uma vez que incitam a conjugação com células que contêm plasmídeos específicos (Jett *et al.*, 1994). Inicialmente, uma célula receptora secreta a feromona sexual correspondente ao plasmídeo que não transporta. Em resposta, a célula dadora produz o factor de agregação (Agg), o qual providencia o contacto entre as duas células, facilitando a transferência do plasmídeo replicado. Após ter adquirido o plasmídeo, a bactéria cancela a produção da feromona. A transferência de certos plasmídeos conjugativos é muito aumentada através do sistema de feromonas sexuais (Kayaoglu & Orstavik, 2004). Os plasmídeos que respondem a feromonas codificam pequenos péptidos similares às feromonas mas que actuam como seus inibidores. Isto serve para prevenir a indução de plasmídeos por quantidades residuais da feromona (Flannagan & Clewell, 2002).

As feromonas sexuais estão também envolvidas na indução de resposta inflamatória. Estes péptidos são quimotáxicos para leucócitos polimorfonucleares humanos e de rato *in vitro* e induzem produção de superóxido e secreção de enzimas lisossomais (Sannomiya *et al.*, 1990).

Os genes codificantes de feromonas sexuais mais estudados são o *cpd*, *cob*, *ccf* e *cad* (Eaton & Gasson, 2001).

1.3.8 – Superóxido extracelular

Os enterococos são únicos na sua capacidade de produzir grandes quantidades de superóxido (Tendolkar *et al.*, 2003). O anião superóxido é um radical de oxigénio altamente reactivo envolvido em danos celulares e tecidulares de uma grande variedade de doenças. Este anião exerce um efeito destrutivo em compostos biológicos como lípidos, proteínas e ácidos nucleicos (Kayaoglu & Orstavik, 2004). Esta substância é produzida em maior quantidade por estirpes invasoras do que por estirpes comensais e em menor quantidade por estirpes de *E. faecium* do que por estirpes de *E. faecalis* (Poeta, 2006).

O superóxido extracelular produzido por *E. faecalis* advém da redução não enzimática do oxigénio pela dimetilmenaquinona associada à membrana. Isto é resultado de uma cadeia respiratória rudimentar que apenas contém o citocromo *bd* e a fumarato redutase como terminais quinol oxidases (Wang & Huycke, 2007).

Num modelo subcutâneo, a produção de superóxido extracelular aumentou a sobrevivência de *E. faecalis* numa infecção mista com *Bacteroides fragilis* (Mundy *et al.*, 2000).

1.3.9 – Ácido lipoteicóico

Os ácidos lipoteicóicos são um grupo de moléculas anfipáticas intimamente relacionadas, as quais consistem num esqueleto de poliglicerolfosfato unido covalentemente a uma molécula de glicolípido (algumas bactérias Gram-positivas como *Streptococcus pneumoniae* têm uma estrutura completamente diferente) (Kayaoglu & Orstavik, 2004; Baik *et al.*, 2008). Esta molécula tem a capacidade de se ligar a uma grande variedade de células eucariotas incluindo plaquetas, eritrócitos, linfócitos, leucócitos polimorfonucleares e células epiteliais (Kayaoglu & Orstavik, 2004).

Este factor de virulência está envolvido no despoletar de respostas inflamatórias e dano tecidular. O glicolípido que faz parte da estrutura do ácido lipoteicóico é o maior responsável por este potencial imunoestimulatório. Foi demonstrado que ácidos lipoteicóicos isolados de estirpes de *E. faecalis* e outras bactérias Gram-positivas levam à estimulação da produção de mediadores (como TNF- α , interleucina 1 beta, interleucina 6 e interleucina 8). por leucócitos, os quais têm um papel activo em várias etapas da resposta inflamatória (Kayaoglu & Orstavik, 2004; Baik *et al.*, 2011).

O ácido lipoteoico de *E. faecalis* tem um papel importante na formação de biofilmes, providenciando resistência microbiana a antibióticos e desinfetantes. É também um receptor, na célula receptora, do factor de agregação produzido pelas células dadoras (Kayaoglu & Orstavik, 2004; Baik *et al.*, 2008).

1.4 – Importância das gaivotas como veículos de transmissão de resistências a antibióticos e factores de virulência

As gaivotas são aves marinhas migratórias que vivem e nidificam em zonas costeiras e ilhas e se alimentam de peixe, bivalves, moluscos, ovos, etc, na costa ou ao largo da costa. Frequentemente, utilizam também restos deixados pelos humanos como fonte de alimento (Radhouani *et al.*, 2011).

Apesar de não entrarem em contacto com antibióticos no seu meio natural, as gaivotas podem ser infectadas com enterococos resistentes através da interacção com humanos e outros animais. Estes animais são também migratórios e percorrem longas distâncias, podendo assim actuar como transportadores e reservatórios de bactérias resistentes, tendo consequentemente um importante papel epidemiológico na disseminação de resistências e de factores de virulência. São também utilizados para monitorizar o impacto do uso de antibióticos em ambientes naturais e servem de alerta para a pressão dos antibióticos em ambientes agrícolas e urbanos presentes ao longo das suas rotas migratórias. A presença significativa de genes de resistência a antibióticos e factores de virulência nas gaivotas permitirá a identificação das origens desses determinantes no ambiente (Radhouani *et al.*, 2011).

1.5 - Importância da abordagem proteómica

As proteínas são os produtos finais de uma célula viva, sendo produzidos de acordo com a informação contida no genoma. O proteoma representa o conjunto total de proteínas que são expressas num compartimento biológico (célula, tecido, órgão) num certo tempo e sob condições particulares (Beranova-Giorgianni *et al.*, 2003). O conceito de proteoma foi inicialmente introduzido em 1995 tendo sido definido como a caracterização em larga escala do conjunto de proteínas expressas numa célula ou tecido (Wilkins *et al.*, 1995).

Ao contrário do genoma, o qual permanece, em grande parte, inalterado, o conteúdo proteico numa dada célula muda em resposta a alterações no ambiente (Cho, 2007). De facto, através da análise da sequência do genoma não é possível obter informação sobre o nível de expressão de genes e proteínas, ou sobre características das proteínas expressas, tais como o seu tempo de meia-vida, a sua localização sub-celular, eventuais modificações pós-tradução, interações proteína-proteína e proteína-DNA, a estrutura e a função biológica das proteínas (Santos *et al.*, 2004).

A análise comparativa da expressão de mRNAs e proteínas tem mostrado que os níveis de expressão destes não estão necessariamente correlacionados (Anderson & Seilhamer, 1997; Gygi, 1999), uma vez que um gene pode dar origem a várias proteínas diferentes. A medição dos níveis de transcritos de mRNA não providencia uma informação completa acerca da regulação celular, visto que a expressão génica é regulada pós-transcricionalmente e, na altura em que as inúmeras modificações pós-transcripcionais são consideradas, o número de proteínas expressas na célula é muitas vezes maior que o potencial codificante do organismo (Cobon *et al.*, 2002).

O proteoma é influenciado por eventos pós-transcrição (*splicing*, poliadenilação e edição de mRNA) e por eventos pós-tradução (modificações como fosforilação, ubiquitinação e glicosilação) (Wouters, 2008). Após a formação das proteínas podem ocorrer cerca de 200 tipos de modificações pós-tradução (Krishna & Wold, 1993). As proteínas podem ser modificadas após a tradução, em resposta a uma variedade de sinais intra e extracelulares (Figura 6). Para além disto, a maturação e degradação proteica são processos dinâmicos que controlam os níveis de proteínas funcionais na célula (McGregor & Dunn, 2003). Está estimado que o ser humano tem entre 30,000 e 40,000 genes, os quais codificam cerca de 40,000 proteínas diferentes. Depois dos eventos do *splicing* do RNA e das modificações pós-traducionais este número pode aumentar até 2,000,000 de proteínas ou fragmentos proteicos. Como consequência o proteoma é muito mais complexo que o genoma (Cho, 2007).

Existem ainda, amostras biológicas de fluídos corporais, como a urina, que não contêm mRNA, mas com óbvia importância na investigação biomédica (Martzen *et al.*, 1999). Neste caso, apenas com o recurso a ferramentas de análise do proteoma se obtém uma ideia dos níveis de expressão nestas amostras biológicas.

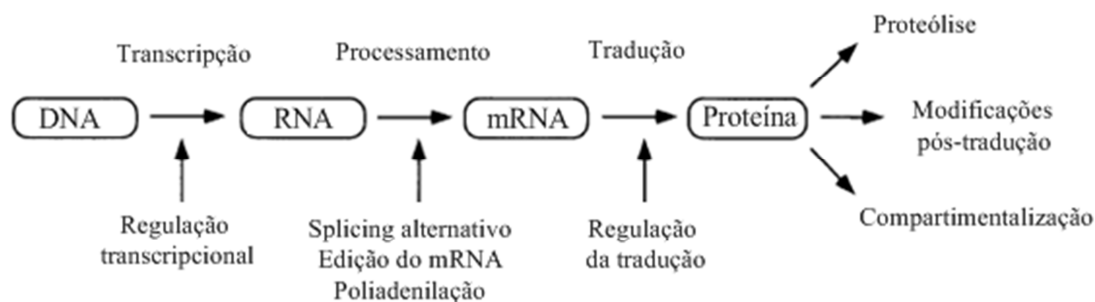


Figura 6 – Mecanismos pelos quais um único gene pode dar origem a vários produtos (adaptado de Graves & Haystad, 2002).

A definição primária de proteômica dada por Wilkins em 1995 não tem em conta, a natureza dinâmica do proteoma. A definição de proteômica deverá assim, ser, o complemento proteico de uma dada célula num determinado tempo (ou estado de desenvolvimento), incluindo todo o conjunto de isoformas e modificações (de Hoog & Mann, 2004).

O alvo da proteômica é vasto, englobando a identificação e quantificação de proteínas em células, tecidos e fluídos biológicos, análise de mudanças na expressão proteica em células normais *versus* células que traduzem doença, estudos de interações proteína-proteínas e outras aplicações (Figura 7) (Beranova-Giorgianni *et al.*, 2003).

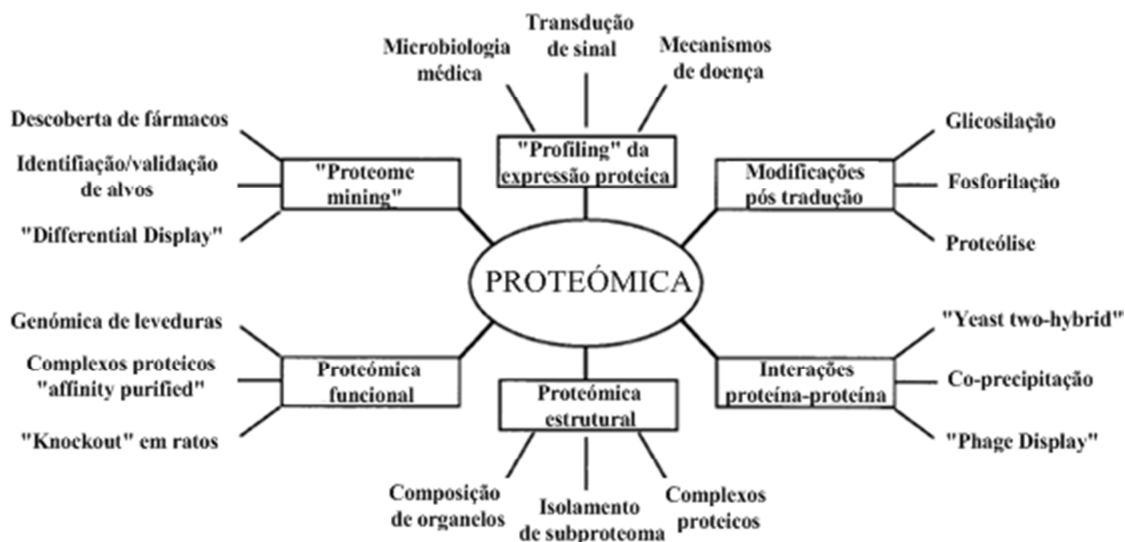


Figura 7 – Áreas da proteômica e sua aplicação às ciências biológicas (adaptado de Graves & Haystad, 2002).

Uma das principais aplicações da proteômica é a previsão de genes. Avanços na tecnologia de sequenciação de DNA têm facilitado a determinação de sequências

genómicas de uma variedade de organismos. O primeiro passo para a anotação do genoma advém de algoritmos de previsão de genes, os quais fazem a leitura das sequências de DNA procurando características de genes (como open reading frames (ORFs) e conteúdo em GC) e examinando outras espécies para inferir regiões funcionais importantes. Estes métodos computacionais têm vindo a identificar genes novos, no entanto permanecem imperfeitos e não conseguem providenciar validação experimental para os modelos produzidos (Findlay *et al.*, 2009). O isolamento e a sequenciação de cDNA através de RT-PCR é uma técnica aceite para validar a expressão de regiões codificantes previstas, no entanto não consegue providenciar informação que a informação presente no RNA é, de facto, traduzida para proteínas (de Souza & Wiker, 2009).

Os métodos de análise proteómica baseados na espectrometria de massa podem ser utilizados para refinar as anotações computacionais de genes e identificar novos genes. A informação proveniente da espectrometria de massa é inserida em bases de dados de proteínas previstas; os péptidos que são identificados confirmam e refinam os modelos génicos derivados do trabalho computacional. Quando esta procura é expandida para um genoma traduzido completo, os péptidos identificados podem revelar novas variantes de splicing, alterações inesperadas numa gelha de leitura de um transcrito, ou genes completamente desconhecidos (Findlay *et al.*, 2009). Estas tecnologias foram já utilizadas para a descoberta de novos genes e para refinar anotações já existentes, em várias espécies bacterianas. Recentemente Okamoto e Yamada, 2011, levaram a cabo uma análise proteómica independente da anotação do genoma em *Streptococcus pyogenes* SF370. Foram encontradas 9 proteínas codificadas por novas ORFs, tendo os seus mRNAs sido verificados por RT-PCR. Adicionalmente estes investigadores providenciaram anotações funcionais (126 proteínas) para genes hipotéticos já descritos.

Por sua vez, Kim e colaboradores, em 2009, analisaram o proteoma de *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 com o objectivo de identificar proteínas codificadas por genes não previstos durante a anotação do genoma. Foram encontradas 16 regiões codificantes não anotadas previamente, das quais 9 eram *antinsense* a genes previstos, 6 eram intergénicas e 1 era lida numa grelha de leitura diferente de um gene anotado. A expressão dos genes foi verificada por RT-PCR.

Um dos objectivos da proteómica é conhecer a localização celular e as interacções existentes entre proteínas, visto que uma localização errada destas pode ter

um profundo efeito na função celular, como no caso da doença fibrose quística. Assim, a informação obtida pelo estudo do proteoma pode ser utilizada para criar um mapa proteico 3-D da célula, onde se evidencia a localização proteica e as interações proteína-proteína, providenciando assim nova informação sobre a regulação das proteínas (Graves & Haystead, 2002).

Onder e colaboradores, em 2011, utilizaram nLC-MS/MS (*nano-scale liquid chromatographic tandem mass spectrometry*) para estudar a localização celular das proteínas de *Rhodobacter capsulatus*. A análise revelou 450 proteínas, 210 das quais são citoplasmáticas, 185 extra-citoplasmáticas e 55 com localização desconhecida. Foi também evidenciado que 40 das proteínas estudadas validam genes hipotéticos previamente anotados para esta espécie.

A estrutura tridimensional das proteínas é também objecto de estudo da proteómica, uma vez que na maioria dos casos, as suas funções só podem ser determinadas através da análise da sua estrutura 3-D. A completa identificação de proteínas permite estabelecer estruturas 3-D para todas as proteínas num dado proteoma, e estas providenciam um ponto de partida para novas experiências, tais como mutagénese *site-directed*, estudos *ligand-binding*, ensaios enzimáticos e estudos de interações proteína-proteína (Burley *et al.*, 1999).

Os objectivos ambiciosos da proteómica requerem o envolvimento de várias outras áreas, como a biologia molecular, bioquímica e bioinformática (Dhingra *et al.*, 2005), sendo que a última tem tido uma crescente importância, visto que, de uma única experiência pode ser gerada uma enorme quantidade de informação que, apenas com recurso a bases de dados e outras ferramentas bioinformáticas pode ser analisada. De facto, a análise bioinformática leva, em muitos casos, mais tempo que a experiência laboratorial (Vihinen, 2001). Existem actualmente algumas bases de dados com informações relativas aos perfis proteicos 2-D. Assim é possível ter acesso a todas as informações sobre os perfis proteicos associados a uma dada espécie. Nesses perfis, encontram-se identificadas as proteínas, de maneira a poder providenciar essa informação, para eventuais comparações de proteomas. A base de dados ExPASy, congrega todas as bases de dados proteicas, para uma mais fácil procura.

Esta base de dados providencia uma interface para a observação dos mapas 2-D proteicos e condições experimentais. Aqui estão reunidos mapas 2-D de *Arabidopsis thaliana*, *Dictyostelium discoideum*, várias estirpes de *Escherichia coli*, várias linhas celulares de *Homo sapiens* e *Mus musculus*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Staphylococcus*

aureus, *Caenorhabditis elegans*, entre outros. Nesta base de dados não estão descritos quaisquer perfis 2-D de *Enterococcus* spp.

1.6 – Proteómica aplicada ao estudo de factores de virulência e resistência a antibióticos em bactérias

Compreender os mecanismos de patogenicidade das bactérias é fundamental para investigar doenças infecciosas, e a avaliação dos perfis proteicos de bactérias em situações de stress pode representar uma abordagem integrada para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e agentes antimicrobianos. Têm ocorrido progressos significativos na caracterização de patógenos bacterianos através da proteómica comparativa correlacionada com espectrometria de massa e a bioinformática (Pinto *et al.*, 2010).

Scherl e colaboradores, em 2006, exploraram a resistência a glicopéptidos em *Staphylococcus aureus* com recurso a proteómica e transcriptómica. Foram comparadas estirpes resistentes e susceptíveis a este tipo de antibióticos tendo sido detectados 94 genes e 178 proteínas com diferentes níveis de expressão. Nas estirpes resistentes foram detectados genes já reportados anteriormente, mas também novos genes sobre-expressos. Também dos Santos e colaboradores, em 2010, utilizaram ferramentas proteómicas para estudar a problemática da resistência a antibióticos. Estes investigadores utilizaram as técnicas 2D-DIGE e MALDI-TOF para comparar estirpes de *Escherichia coli* susceptíveis e resistentes a piperacilina/tazobactam. Na estirpe resistente foram detectadas 12 proteínas com expressão aumentada em relação à estirpe resistente, as quais estavam relacionadas com a virulência bacteriana, resistência a antibióticos e protecção do DNA em situação de stress.

A resistência a antibióticos representa um obstáculo na terapêutica de muitas doenças infecciosas, nas quais, muitas vezes, o mecanismo está pouco evidenciado. A detecção e caracterização de proteínas membranares é particularmente desejável para a descoberta de biomarcadores para o fenótipo de resistência múltipla, uma vez que estas incluem proteínas ligadas a bombas de efluxo, e porinas as quais estão intimamente relacionadas à permeabilidade molecular e à resistência múltipla a antibióticos (Pinto *et al.*, 2010).

As bombas de efluxo são estruturas proteicas que têm como objectivo expulsar substâncias tóxicas, podendo expulsar os antibióticos, conferindo à bactéria resistência.

Algumas bombas são específicas para determinados antibióticos, como a tetraciclina, enquanto outras bombas conseguem expulsar diferentes tipos de antibióticos. No entanto, as primeiras conferem um nível de resistência mais elevado que as segundas, aos respectivos antibióticos (Sefton, 2002). Em bactérias Gram-negativas as bombas de efluxo são tripartidas e encontram-se distribuídas em todo o envelope celular. Estas têm um papel preponderante na resistência intrínseca e adquirida a vários antibióticos, mas também exportam biocidas, detergentes e solventes orgânicos. As bombas de efluxo em bactérias Gram-positivas têm apenas um componente, uma vez que o seu envelope celular é mais simples. Apesar da ausência de uma membrana exterior, bombas de efluxo que expulsam antibióticos foram já descritas nestas bactérias, algumas das quais têm contribuições importantes, especialmente na expulsão de fluoroquinolonas e macrólidos (Kumar & Schweizer, 2005).

A redução da permeabilidade aos antibióticos, que ocorre por perda ou alteração de canais porina constituem um mecanismo de resistência importante nas bactérias Gram-negativas. Este mecanismo pode levar à multirresistência e resulta, normalmente, de mutações espontâneas seleccionadas pela pressão exercida pelo uso de antibióticos. (Sefton, 2002). Existem 3 tipos de porinas principais (OmpA, OmpC e OmpF) e tendo-se relacionado a diminuição da expressão das porinas do tipo OmpF com o aumento da resistência às quinolonas, β -lactâmicos, tetraciclina e cloranfenicol (Sáenz, 2004). As porinas podem ser específicas para uma família de antibióticos. No entanto, no caso do imipenemo e do meropenemo, pertencentes à mesma classe de β -lactâmicos, não utilizam os mesmos canais porina, o que indica que uma estirpe resistente a um agente poderá não ser resistente a outro (Moreillon, 2000).

Yun e colaboradores, em 2008, levaram a cabo uma análise proteómica da membrana exterior de uma estirpe de *Acinetobacter baumannii* com elevada resistência à tetraciclina. Foram identificadas 4 porinas, OmpA₃₈, OmpA₃₂, CarO e OmpW, as quais apresentavam uma expressão diminuída. Contudo, o nível de transcrição destas porinas não foi alterado significativamente. Estes resultados sugerem que *A. Baumannii* regula activamente a expressão membranar e a secreção das porinas, de maneira a ultrapassar a situação de stress criada pelos antibióticos.

Técnicas de análise proteómica têm sido utilizadas também para a análise de factores de virulência. Neste caso são geralmente separadas as fracções membranares ou da parede celular antes da electroforese bidimensional, uma vez que os factores de virulência são maioritariamente proteínas membranares, de superfície, da parede celular

ou secretadas (Wu *et al.*, 2008). Chitlaru e colaboradores, em 2006, analisaram as proteínas secretadas no patógeno Gram-positivo *Bacillus anthracis*, identificando vários factores de virulência putativos (como toxinas, proteases, nucleotidasas, sulfatases, transportadores e factores de detoxificação).

1.6.1 – Análise proteómica em *Enterococcus* spp.

Do género *Enterococcus* spp. a espécie *E. faecalis* é mais estudada a nível genómico e proteómico. O genoma de três estirpes desta espécie foi já sequenciado (V583, OG1RF e Symbioflor1) e vários outros projectos estão já em curso. No caso da estirpe V583, um isolado clínico resistente à vancomicina, mais de um quarto do seu genoma consiste em DNA móvel ou exógeno, incluindo ilhas de patogenicidade. A abundância destes elementos contribui para a acumulação de determinantes de virulência e de resistência (Bohle *et al.*, 2011).

Recentemente, Wang e colaboradores (2009) analisaram os perfis proteicos das estirpes V583 e V309 da espécie *E. faecalis*, com o objectivo de compreender os mecanismos moleculares da resistência a glicopéptidos. Algumas das proteínas têm funções de resistência à vancomicina ou estão relacionadas com factores de virulência, stress, metabolismo, tradução e conjugação, o que ajuda a bactéria a sobreviver à acção dos antibióticos.

Também Maddalo e colaboradores, em 2011, estudaram a espécie *E. faecalis* a nível proteómico. Estes investigadores fraccionaram o proteoma membranar de *E. faecalis* e identificaram os seus constituintes por espectrometria de massa. Muitas das 102 proteínas identificadas são importantes para a homeostasia celular, virulência e resistência a antibióticos. Algumas proteínas, no entanto, não tinham função conhecida, o que indica que existem grandes falhas no conhecimento da biologia deste organismo.

Bohle e colaboradores em 2010 analisaram o proteoma de *E. faecalis* V583 em resposta ao stress causado pela presença de ácidos biliares. Através de electroforese 2-D foram analisadas cerca de 500 proteínas. Destas, 53 eram reguladas em resposta aos ácidos biliares e foram subsequentemente identificadas por espectrometria de massa. Estas proteínas pertenciam a 9 classes funcionais diferentes, incluindo proteínas responsáveis pela síntese de ácidos gordos e fosfolípidos, metabolismo energético e transporte e ligação. Observou-se que as proteínas envolvidas na síntese de ácidos gordos e fosfolípidos eram reguladas negativamente na presença de ácidos biliares.

1.7 - Técnicas utilizadas em análise proteómica

Uma das técnicas mais usadas, para a análise de proteomas é a electroforese bi-dimensional. Os fundamentos desta abordagem foram apresentados, pela primeira vez, por O'Farrell em 1975. As proteínas são separadas de acordo com o seu ponto isoeléctrico (na primeira dimensão) num processo denominado focalização isoeléctrica. A segunda dimensão separa as proteínas pelo seu peso molecular através de SDS-PAGE.

SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Poliacrilamye Gel Electrophoresis*) é uma técnica muito reprodutível a nível laboratorial, através da qual os polipéptidos são separados, em gel de poliacrilamida, de acordo com o seu peso molecular. A carga eléctrica intrínseca das proteínas não é um factor de separação, devido à presença de SDS na amostra e no gel (2-D handbook). O sistema tampão mais comumente usado em SDS-PAGE é o sistema Tris-glicina, descrito por Laemmli (1970). Este sistema inclui a utilização de um gel de concentração (*stacking gel*) (com tampão Tris a pH 6,8) polimerizado em cima de um gel de resolução (*resolving gel*), o qual contém tampão a pH 8,8 (Westermeyer & Naven, 2002). Durante a electroforese os iões cloreto, SDS e glicina migram em direcção ao ânodo, e os iões de hidroximetil aminometano (Tris) positivamente carregados migram em direcção ao cátodo (Westermeyer & Naven, 2002).

A focalização isoeléctrica (IEF) é um método electroforético que separa as proteínas de acordo com o seu ponto isoeléctrico (pI). As proteínas são moléculas anfotéricas; elas podem ter uma carga positiva, negativa ou zero, dependendo do pH do ambiente onde se encontrem. O ponto isoeléctrico é o pH específico no qual a carga de uma proteína é zero. A presença de um gradiente de pH é crítica para a técnica de focalização isoeléctrica. Num gradiente de pH e sob influência de um campo eléctrico, as proteínas irão mover-se para a posição no gradiente onde a sua carga é zero. A resolução desta técnica é determinada pelo alcance do gradiente de pH e pela força do campo eléctrico. A focalização isoeléctrica é executada em condições desnaturantes e a voltagens altas, normalmente acima de 1000V (2-D handbook).

Após a focalização isoeléctrica e antes de haver a corrida da segunda dimensão as tiras necessitam de ser equilibradas numa solução que contenha SDS, de maneira a tornar todas as proteínas com carga negativa, sendo posteriormente sujeitas a SDS-PAGE (2-D handbook).

Uma vez terminada a segunda dimensão, as proteínas separadas por electroforese 2-D podem ser visualizadas, no próprio gel, através da sua coloração com azul de “Coomassie”, nitrato de prata ou compostos fluorescentes (ex. SYPRO; Molecular Probes). Alternativamente, as proteínas podem ser previamente marcadas *in vitro* com moléculas fluorescentes (ex. CyDye DIGE fluors, Amersham Biosciences) ou radioactivas (ex. ³H-iodoacetamida) ou *in vivo* com compostos marcados radioactivamente (por exemplo, metionina marcada com ³⁵S). A escolha (visualização/detecção) depende, entre outros factores, da quantidade de proteína existente na amostra (Santos *et al.*, 2004).

Para a identificação das proteínas correspondentes aos *spots* separados por electroforese 2-D, recorre-se a técnicas analíticas. Hoje em dia, existem várias soluções, em termos de equipamento para a identificação proteica, sendo a mais vulgarizada o espectrómetro de massa do tipo MALDI-TOF, o qual é composto por um ionizador (MALDI, *matrix assisted laser desorption/ionization*), um analisador (TOF, *time-of-flight*) e um detector que regista o tempo de voo dos vários péptidos ionizados. (Santos *et al.*, 2004).

O resultado da ionização no MALDI, é um gás de iões positivamente carregados, acelerados por um campo eléctrico. Duas proteínas com carga idêntica mas com diferentes massas, irão percorrer o tubo do analisador TOF com diferentes velocidades, e uma proteína positiva e bivalentemente carregada percorre o analisador mais depressa que a mesma proteínas mas apenas com uma carga. Todos os iões entram num tubo em vácuo – o analisador *time of flight* e todos percorrem a mesma distância, o tamanho do TOF, atingindo no final um detector (Rehm, 2006).

2 - Objectivos

O objectivo geral deste trabalho foi a análise do papel de gaivotas (*Larus cachinnans*) do arquipélago das Berlengas como reservatórios de bactérias portadoras de genes e proteínas relacionadas com factores de virulência e com a resistência a antibióticos.

Foram também objectivos específicos:

1 - Detectar genotipicamente os factores de virulência em estirpes de *Enterococcus* spp. isoladas de amostras fecais de gaivotas:

1.1 – Identifica os genes codificadores de factores de virulência (*gelE*, *esp*, *agg*, *hyl*, *fsr*, *cpd*, *ace*, *cylA*, *cylB*, *cylL*, *cylM*, *cylS*).

1.2 – Detectar a produção de gelatinase e a actividade hemolítica.

1.3 – Relacionar o fenótipo de resistência a antibióticos com os genes codificadores dos factores de virulência e com a actividade da gelatinase.

2 – Analisar os perfis SDS-PAGE de amostras proteicas de estirpes de *Enterococcus* spp. isoladas de amostras fecais de gaivotas:

2.1 – Identificar as diferentes espécies de enterococos presentes.

2.2 – Analisar a relação entre os perfis proteicos obtidos e a análise genómica que foi previamente efectuada.

3 – Material e Metodologia

3.1 – Isolados de enterococos obtidos de gaivotas

Foram utilizadas neste estudo 63 estirpes de *Enterococcus* previamente isolados de amostras fecais de gaivotas (*Larus cachinnans*) do Arquipélago das Berlengas (a origem das amostras encontra-se descrita em Poeta *et al.*, 2008a; Radhouani *et al.*, 2009 e Radhouani *et al.*, 2010). Das 63 estirpes, 25 pertencem à espécie *E. faecium*, 5 à espécie *E. durans*, 4 à espécie *E. faecalis*, 3 à espécie *E. hirae* e 26 não puderam ser identificadas sendo designadas como *Enterococcus* spp.

Foi também realizado previamente o estudo da resistência a antibióticos nestas estirpes, sendo que os isolados apresentavam os seguintes fenótipos de resistência: 18 isolados resistentes à tetraciclina (TET) e eritromicina (ERY); 4 resistentes à TET, ERY e quinupristina-dalfopristina (QD); 3 resistentes à TET, ERY, QD e cloranfenicol (CHL); 3 resistentes à TET, ERY, QD, CHL e ampicilina (AMP); 2 resistentes à TET, ERY e kanamicina (KAN); 2 resistentes à TET, ERY e vancomicina (VAN); 2 resistentes à TET, ERY, AMP e VAN, 2 resistentes à TET, ERY, KAN e estreptomicina (STR); 2 resistentes à TET, ERY, STR, QD, KAN e ciprofloxacina (CIP); 1 resistente à TET, ERY, AMP e KAN, 1 resistente à TET, ERY, AMP e STR; 1 resistente à CIP, 1 resistente à TET, ERY, AMP e CIP; 1 resistente à QD e CIP; 1 resistente à TET, ERY, STR, KAN e QD; 1 resistente à TET, ERY, CIP e QD; 1 resistente à TET, ERY, AMP, KAN e STR; 1 resistente à TET, ERY, CIP, AMP e VAN; e 1 resistente à ERY, CIP, AMP e VAN. Em 15 das estirpes não foi detectada resistência a nenhum dos antibióticos estudados.

Apenas 29 dos isolados foram utilizados para análise proteómica, sendo todos os isolados das espécies *E. hirae* e *E. durans* foram analisados. Também 18 isolados da espécie *E. faecium*, 2 da espécie *E. faecalis* e 1 *Enterococcus* spp. fizeram parte deste estudo. Estes isolados foram escolhidos devido à semelhança dos seus perfis genotípicos de genes de resistência a antibióticos, os quais estavam previamente caracterizados. 6 isolados possuíam o genótipo *tetL+ermB*, 6 possuíam o genótipo *tetL+tetM+ermB*, 7 possuíam o genótipo *tetL+tetM+ermB+Tn5397+intTn916*, 2 possuíam o genótipo *tetL+tetM+ermB+Tn5397+vatE*, 2 possuíam o genótipo *tetL+tetM+Tn5397+intTn916*, 2 possuíam o genótipo *tetL+tetM+ermB+intTn916*, 1 possuía o genótipo *tetL+tetM+ermB+aph3'''-IIIa*, 1 possuía o genótipo *tetL+Aph3'''-IIa* e 1 possuía o genótipo *ermB*.

3.2 – Determinação da actividade da gelatinase

A produção de gelatinase, foi detectada inoculando em forma de botão cada estirpe em TSA, com 1,5% de meio de leite desidratado. As placas, foram incubadas a 37°C durante 24h, tendo a detecção de um halo à volta das colónias, sido considerado como positivo para a produção de gelatinase (Poeta, 2006).

3.3 - Determinação da actividade hemolítica

Após crescimento a 37°C durante 24h em BHI agar, de cada estirpe a estudar, semearam-se placas de Agar Columbia suplementado com 5% de sangue de cavalo. As placas, foram incubadas a 37°C, durante 72h, em aerobiose e anaerobiose para examinar a produção de cada tipo de hemólise (α e β) (Poeta, 2006).

3.4 – Determinação dos factores de virulência com recurso a primers específicos

3.4.1 – Extracção de DNA

A extracção foi realizada segundo o protocolo InstaGene™ Purification Matrix (Bio-Rad). Suspenderam-se num eppendorf com 1 mL de água destilada esterilizada, colónias de enterococos retiradas de uma cultura pura. De seguida procedeu-se a centrifugação durante um minuto a 12.000 rotações por minuto (rpm). Retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 200 μ L de resina de extracção ao pellet. Posteriormente, ressuspendeu-se o pellet e colocou-se o eppendorf num banho-maria a 56 °C, durante 20 minutos. Após passar no vortex, colocou-se num banho a 100°C durante 8 minutos. Por fim, agitou-se novamente no vortex e colocou-se na centrifugadora a 13.000 rpm durante 3 minutos.

Após a extracção, mediu-se a absorção dos ácidos nucleicos a 260 nm usando o espectrofotómetro, obtendo a concentração e pureza do DNA por comparação com esta medida a 280 nm. Como valores óptimos, definimos a absorvância entre 1,90 e 2,00 e a concentração entre 300 e 600 nanogramas (ng). Finalmente, o DNA extraído foi guardado a 4°C num frigorífico.

3.4.2 – Preparação dos tubos de PCR

Cada tubo de reacção da técnica de PCR tem um volume final de 50 µL, estando os seus componentes descritos na tabela 3:

Tabela 3 – Composição da reacção de PCR.

Componentes	Concentração stock	Volume por tubo
Tampão de reacção	10X	5µL
MgCl ₂	50mM	1,5µL
Primer directo	25µM	1µL
Primer reverso	25µM	1µL
dNTPs	10mM	1µL
BIOTAQ TM DNA polimerase	5U/µL	0,3µL
DNA	-	10µL
Água MiliQ esterilizada	-	Até perfazer 50µL

Os primers utilizados foram sintetizados por Sigma-Aldrich e os termocicladores eram do modelo Biometra 3000. Em todas as reacções de PCR foram incluídos um controlo positivo e um negativo.

3.4.3 – Primers e condições de PCR

As sequências dos primers dos genes que codificam os factores de virulência estudados encontram-se descritas na tabela 4, assim como as condições da PCR e o tamanho de banda obtido.

Tabela 4 – Sequências nucleotídicas de primers de PCR para genes codificantes de factores de virulência.

Primers (sequência 5' a 3')	Condições	Banda	Referência
	94°C 3' 1 ciclo		
<i>ace</i>	94°C 1'		
AAAGTAGAATTAGATCCACAC	56°C 1' 30 ciclos	248 pb	Mannu <i>et al.</i> , 2003
TCTATCACATTCGGTTGCG	72°C 1'		
	72°C 5' 1 ciclo		

Tabela 4 (continuação) - Sequências nucleotídicas de primers de PCR para genes codificantes de factores de virulência.

Primers (sequência 5' a 3')	Condições	Banda	Referência
<i>gelE</i> AGTTCATGTCTATTTTCTTCAC CTTCATTATTTACACGTTTG	94°C 3' 1 ciclo	403 pb	Eaton & Gasson, 2001
	94°C 1'		
	56°C 1' 30 ciclos		
	72°C 1'		
	72°C 5' 1 ciclo		
<i>agg</i> AAGAAAAAGAAGTAGACCAAC AAACGGCAAGACAAGTAAATA	95°C 2' 1 ciclo	1553 pb	Eaton & Gasson, 2001
	94°C 45''		
	49°C 45'' 30 ciclos		
	72°C 1'		
	72°C 4' 1 ciclo		
<i>esp</i> TTGCTAATGCTAGTCCACGACC GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA	95°C 2' 1 ciclo	955 pb	Eaton & Gasson, 2001
	94°C 45''		
	63°C 45'' 30 ciclos		
	72°C 1'		
	72°C 4' 1 ciclo		
<i>cpd</i> TGGTGGGTATTTTTCAATTC TACGGCTCTGGCTTACTA	95°C 2' 1 ciclo	782 pb	Eaton & Gasson, 2001
	94°C 45''		
	47°C 45'' 30 ciclos		
	72°C 1'		
	72°C 4' 1 ciclo		
<i>cyiL_L</i> GATGGAGGGTAAGAATTATGG GCTTCACCTCACTAAGTTTTATAG	94°C 3' 1 ciclo	253 pb	Semedo <i>et al.</i> , 2003
	94°C 1'		
	55°C 1' 35 ciclos		
	72°C 2'		
	72°C 7' 1 ciclo		
<i>cyiL_S</i> GAAGCACAGTGCTAAATAAGG GTATAAGAGGGCTAGTTTCAC	94°C 1'	240 pb	Semedo <i>et al.</i> , 2003
	55°C 1' 30 ciclos		
	72°C 2'		
	72°C 1 ciclos		
<i>cyiA</i> TGGATGATAGTGATAGGAAGT TCTACAGTAAATCTTTTCGTCA	95°C 2' 1 ciclo	517 pb	Eaton & Gasson, 2001
	94°C 45''		
	49°C 45'' 35 ciclos		
	72°C 1'		
	72°C 4' 1 ciclo		

Tabela 4 (continuação) - Sequências nucleotídicas de primers de PCR para genes codificantes de factores de virulência.

Primers (sequência 5' a 3')	Condições	Banda	Referência
<i>cylB</i> ATTCCTACCTATGTTCTGTTA AATAAACTCTTCTTTTCCAAC	95°C 2' 1 ciclo	843 pb	Eaton & Gasson, 2001
	94°C 45''		
	49°C 45'' 35 ciclos		
	72°C 1'		
	72°C 4' 1 ciclo		
<i>cyiM</i> CTGATGGAAAGAAGATAGTAT TGAGTTGGTCTGATTACATTT	95°C 2' 1 ciclo	742 pb	Eaton & Gasson, 2001
	94°C 45''		
	49°C 45'' 35 ciclos		
	72°C 1'		
	72°C 4' 1 ciclo		
<i>fsr</i> AACCAGAATCGACCAATGAAT GCCCCTCATAACTCAATACC	95°C 4' 1 ciclo	3268 pb	Pillai <i>et al.</i> , 2002
	94°C 30''		
	60°C 30'' 30 ciclos		
	72°C 2'5''		
	72°C 10' 1 ciclo		
<i>hyl</i> GAGTAGAGGAATATCTTAGC AGGCTCCAATTCTGT	94°C 4' 1 ciclo	661 pb	Klare <i>et al.</i> , 2005
	94°C 30''		
	50°C 30'' 30 ciclos		
	72°C 30''		
	72°C 4' 1 ciclo		

3.4.4 – Preparação dos géis para electroforese horizontal

Para preparar os géis usou-se uma concentração de agarose D-1, entre 1% e 2%, em relação ao tamanho dos fragmentos esperados. A solução tampão utilizada era constituída por TBE 1X (formado por TBE 5X: 54 g/l Tris (hidroximetil) aminometano; 27,5 g/l ácido bórico; 20 mL de EDTA 0,5M).

A mistura foi aquecida num microondas até à dissolução completa da agarose, sendo de seguida adicionado brometo de etídio com a concentração de 0,5µg/ml. Colocou-se a mistura num suporte com um ou vários pentes para formar os poços. Após polimerização do gel foram retirados os pentes.

3.4.5 – Corrida electroforética

Após a retirada dos pentes o gel foi colocado na tina de electroforese e depositaram-se nos poços 10 µL do produto da PCR, juntamente com 2 µL de tampão de carga (10% de sacarose, 0,0025% de azul de bromofenol em TE [10 mM Tris (hidroximetil) aminometano, 1 mM EDTA]).

No primeiro poço de cada gel, foi depositado um amplicão positivo já estudado para o gene em questão.

A electroforese foi realizada a 96 Volts (V) durante 45 minutos. Posteriormente a visualização do gel foi realizada com um transiluminador de luz ultravioleta e de seguida a imagem foi capturada com um modelo Image Store 5000, UVP.

3.5 – Preparação das amostras para SDS-PAGE

3.5.1 – Preparação dos meios de crescimento

Pesou-se a quantidade indicada de BHI (37g de *Brain Heart Infusion* Broth ou 60g de *Brain Heart Infusion* Agar para 1L de água), e colocou-se num balão volumétrico. Com o auxílio de uma proveta mediu-se a quantidade de água necessária e adicionou-se ao balão, agitando-se até total dissolução. O balão foi tapado e colocou-se na autoclave durante 15 minutos a 121°C.

Após a autoclavagem, e na câmara de fluxo laminar (a qual deve ser previamente exposta a luz UV durante 20 minutos), colocou-se a solução em placas (no caso do BHI Agar) ou em tubos Falcon (no caso do BHI Broth). Deixou-se arrefecer, e no caso de BHI Agar, deixar solidificar antes de retirar da câmara.

3.5.2 – Crescimento e repicagem das bactérias

Retirou-se, à chama, meio de leite onde estão contidas as bactérias com o auxílio de uma ansa. Espalhou-se, com o auxílio de uma ansa, o meio de leite em placas de Petri com BHI Agar solidificado. Colocaram-se as placas na estufa a 37°C durante 24 - 48 h, para que se possibilite o crescimento bacteriano. Decorrido o tempo na estufa, repicaram-se as bactérias para um tubo Falcon com BHI Broth. Colocou-se o tubo na estufa a 37°C durante 18 a 24h.

3.5.3 – Solubilização das proteínas

Retiraram-se os tubos Falcon onde as bactérias cresceram da estufa. Colocou-se o PBS na estufa a aproximadamente 75°C.

Centrifugaram-se as células a 10,000 *g* durante 3 minutos, à temperatura usada durante o crescimento das células. O *pellet* deve ser bem visível após centrifugação. Retirou-se o PBS a 75°C da estufa, e fez-se a ressuspensão do *pellet* em 4mL de PBS quente. Diversas repetições desta fase poderão ser necessárias nesta etapa para eliminar as substâncias que podem causar interferência como as enzimas extracelulares e os componentes do meio de cultura.

Suspendeu-se o *pellet* em 0,2 mL de tampão de solubilização de SDS frio e transferir o *pellet* para um eppendorf de 1,5 mL. O tampão de SDS deve estar contido em gelo, mas deverá ser pré-aquecido a 95°C se houver elevadas quantidades de proteases activas.

As amostras foram sonicadas, recorrendo a um homogeneizador ultrasónico (duas vezes 30 *pulses*; intervalo: 1 Hz; duração do *pulse*: 0,3 segundos; 20 kHz *homogeneous sound*; *power output*: 60 W). Sonicaram-se as amostras 8 vezes durante 10 segundos (tendo cuidado de não criar espuma e de maneira a que entre cada passo se deixe arrefecer as amostras). Centrifugaram-se as células rompidas a uma velocidade máxima de centrífuga (14,000 *g*), durante 30 minutos a 4°C. Colheu-se o sobrenadante cuidadosamente em pequenas quantidades de 50 µL a -80°C.

Aos eppendorfs com amostras para uso em SDS-PAGE, juntou-se solução C em quantidade 1:1. Diluíram-se 35 µL do aliquot das amostras para utilização em 2-DE com 70 µL de tampão de lise thiourea/ureia para separar o SDS das proteínas.

3.6 – SDS-PAGE

A metodologia usada para SDS-PAGE foi a proposta por Laemmli (1970), mas com algumas alterações propostas por Igrejas (2000) com vista a aumentar o seu poder de resolução e reprodutibilidade (Tabela 5). Ao contrário do proposto por Laemmli, utiliza-se um gel sem gradiente de concentração e a uma concentração de acrilamida de 12,52%, a qual permite uma maior resolução, tanto para proteínas de baixo, como de alto peso molecular.

Tabela 5 - Modificações ao protocolo descrito por Laemmli,1970.

Parâmetros	Laemmli (1970)	Modificações por Igrejas (2000)
Concentração dos géis de acrilamida	Gel de gradiente 7,5–13%	Gel a 12,52%
Dimensão dos géis	140×140×1,5mm	160×180×1mm
Porosidade	1,5%	0,97%
Intensidade da corrente	40mA/gel	30mA/gel
Tempo de migração	150 minutos	270 minutos
Temperatura de migração	25°C	14°C

3.6.1 – Montagem das placas de electroforese

Colocaram-se os espaçadores entre os vidros, paralelos entre si e junto à extremidade dos vidros. Colocaram-se as pinças e apertaram-se fracamente os parafusos. O conjunto foi colocado na base, premiram-se os vidros para baixo e apertaram-se bem os parafusos. Colocaram-se então os parafusos na base, rodando-os de maneira a ficarem apertados e numa posição vertical (Figura 7).

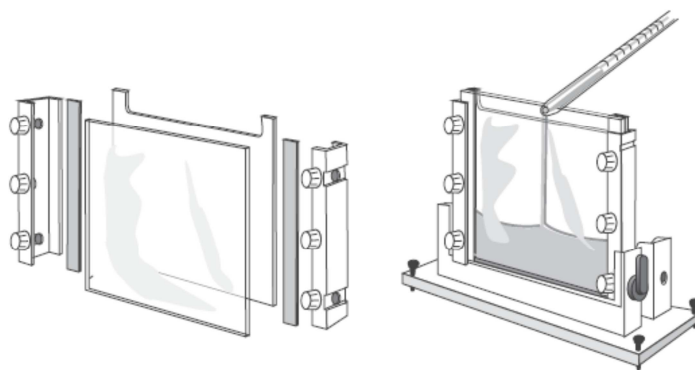


Figura 7 – Montagem das placas de electroforese em sistema vertical SDS-PAGE (Westermeier & Naven, 2002).

3.6.2 – Preparação dos géis

Para a elaboração de 2 géis, juntou-se num kitasato, 15,31 mL de acrilamida 40%, 3mL de bisacrilamida 2%, 10,5 mL de água bidestilada e 18,8 mL de tampão Tris-HCl pH= 8,8 (Tabela 6).

Tabela 6 – Composição do gel de separação, com quantidades referentes a 2 géis.

Componentes do gel de separação	T=12,52% C=0,97% (quantidades referentes a 2 géis)
Acrilamida 40%	15,31 mL
Bisacrilamida (Bis) 2%	3 mL
Água bidestilada	10,5 mL
Tampão Tris HCl pH = 8,8	18,8 mL
Desgaseificação	
SDS 10%	0,5 mL
APS 1%	1,25 mL
TEMED	25µL

Fez-se a desgaseificação da solução num kitasato, com o auxílio de uma bomba de vácuo. De seguida juntou-se à solução, 0,5mL de SDS 10%, 1,25mL de APS 1% e 25 µL de TEMED. Com uma seringa, colocou-se o gel entre os vidros até 4cm do cimo do vidro. Distribuiu-se pela superfície do gel 180µL de butanol, para eliminar bolhas de ar e tornar a superfície lisa. Deixou-se ocorrer polimerização e de seguida, lavou-se a superfície do gel com água bidestilada e limpou-se com papel de filtro.

Prepararou-se então o gel de concentração, colocando, num kitasato, 1,68mL de acrilamida 40%, 0,49mL de bisacrilamida 2%, 17,34mL de água bidestilada e 2,81mL de tampão Tris HCl pH = 6,8. Quantidades referentes a 2 géis referidas na tabela 7.

Tabela 7 – Composição do gel de concentração, com quantidades referentes a 2 géis.

Componentes do gel de concentração	T=2,88% C=1,42% (quantidades referentes a 2 géis)
Acrilamida 40%	1,68 mL
Bisacrilamida (Bis) 2%	0,49 mL
Água bidestilada	17,34 mL
Tampão Tris HCl pH = 6,8	2,81 mL
Desgaseificação	
SDS 10%	0,2 mL
APS 1%	1 mL
TEMED	22,5µL

Fez-se a degaseificação da solução num kitasato, com o auxílio de uma bomba de vácuo. Após degaseificação adicionou-se à solução, 0,2mL de SDS 10%, 1mL de APS 1% e 25 µL de TEMED.

Com uma seringa, colocou-se o gel entre os vidros, por cima do gel de separação, até 0,5 cm do topo dos vidros. Colocou-se o pente de 15 poços e deixou-se o gel polimerizar.

Após polimerização retirou-se o pente e encheram-se os poços com tampão de electroforese. Com uma seringa inseriu-se 15µL de amostra em cada poço. Depois de todas as amostras serem depositadas retiraram-se os parafusos da base e de seguida colocou-se o recipiente da parte superior e colocaram-se os parafusos. Retirou-se a base e o conjunto placa e recipiente superior foi colocado na tina de electroforese.

Colocou-se tampão de electroforese no recipiente da parte superior, tapou-se a tina e ligou-se à fonte de alimentação. Configuraram-se as condições de migração para 30mA/gel a 14°C. Deixou-se correr o gel até a frente de migração sair das placas. Registaram-se os valores de amperagem e voltagem finais.

3.7 – Coloração dos géis de acrilamida

3.7.1 – Coloração com Azul de “Coomassie” R250

Colocaram-se os géis numa tina, e adicionaram-se cerca de 400mL de solução de coloração “Coomassie” R250 por gel. Deixou-se em agitação durante 24 horas. Posteriormente colocaram-se os géis em água durante uma noite em agitação para ocorrer descoloração.

Na manhã seguinte passaram-se os géis para uma solução de ácido tricloroacético (TCA) a 6% durante 4 a 5 horas. Findo o tempo, foi retirada a solução de TCA 6% e colocaram-se os géis numa solução de glicerol a 5% onde permaneceram 1 a 2 horas. De seguida colocaram-se entre duas folhas de papel de celofane que foram previamente embebidas na solução de glicerol a 5% e deixaram-se secar em cima de uma placa de vidro do seu tamanho durante alguns dias.

4 – Resultados

4.1 – Genes de factores de virulência

A maioria dos isolados apresenta o gene estrutural *cylL_L* do factor de virulência citolisina (65,08%) e o gene codificante de feromona sexual *cpd* (61,9%) (Tabela 8). Nenhum dos isolados apresentou os genes *agg*, *fsr* e *cylL_S*. Nenhum dos seis isolados resistentes à vancomicina apresentou os genes *gelE*, *ace*, *cylA*, *cylB* e *cylM*.

Tabela 8 - Genes codificantes de factores de virulência presentes em isolados de gaivota.

Espécies		Genes								
		<i>gelE</i>	<i>hyl</i>	<i>esp</i>	<i>cpd</i>	<i>ace</i>	<i>cylA</i>	<i>cylB</i>	<i>cylL_L</i>	<i>cylM</i>
Não resistentes à vancomicina	<i>E. faecium</i> (N=23)	4	4	7	11	4	1	2	16	10
	<i>E. faecalis</i> (N=4)	1	2	3	4	2	0	1	3	2
	<i>E. hirae</i> (N=3)	0	0	1	3	0	0	1	2	1
	<i>E. durans</i> (N=1)	0	0	1	1	0	0	1	1	1
	<i>Enterococcus</i> spp. (N=26)	20	14	5	16	13	4	5	17	11
Resistentes à vancomicina VRE	<i>E. durans</i> (N=4)	0	0	1	3	0	0	0	2	0
	<i>E. faecium</i> (N=2)	0	2	1	1	0	0	0	0	0
	Total (N=63)	25	22	19	39	19	5	10	41	25

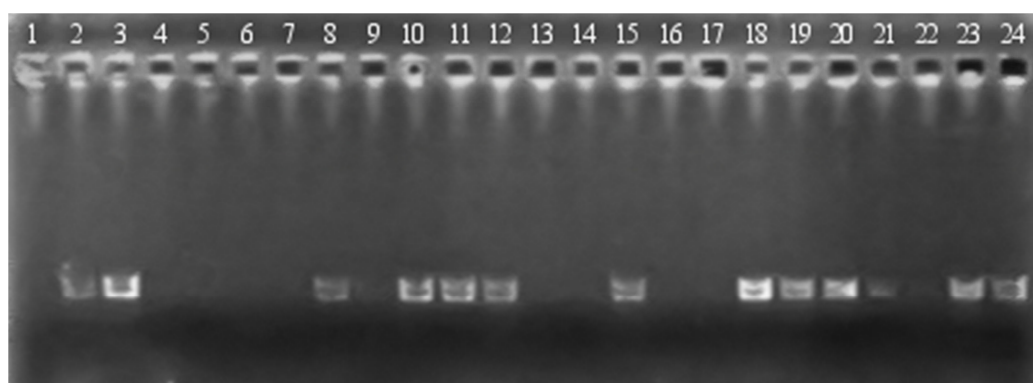


Figura 8 – Imagem do gel de electroforese resultante da amplificação por PCR do gene *gelE*. Poço 1 – controlo negativo; Poço2 – controlo positivo; Poços 3 a 24 – isolados 1 a 22.

Apenas quatro dos isolados (1 pertencente à espécie *E. faecium*, 1 *E. durans* e 2 *Enterococcus* spp.) não apresentaram nenhum dos 12 genes codificantes de factores de virulência estudados (Tabela 9).

Tabela 9 – Número de genes de virulência presentes nos isolados estudados.

Número de genes	Quantidade de isolados	Espécies
8	2	1 <i>Enterococcus</i> spp.; 1 <i>E. faecium</i>
7	2	2 <i>Enterococcus</i> spp.
5	13	8 <i>Enterococcus</i> spp.; 2 <i>E. faecium</i> ; 1 <i>E. faecalis</i> ; 1 <i>E. hirae</i> ; 1 <i>E. durans</i>
4	13	7 <i>Enterococcus</i> spp.; 3 <i>E. faecium</i> ; 3 <i>E. faecalis</i>
3	10	4 <i>Enterococcus</i> spp.; 5 <i>E. faecium</i> ; 1 <i>E. durans</i>
2	8	1 <i>Enterococcus</i> spp.; 5 <i>E. faecium</i> ; 1 <i>E. hirae</i> ; 1 <i>E. durans</i>
1	11	1 <i>Enterococcus</i> spp.; 8 <i>E. faecium</i> ; 1 <i>E. hirae</i> ; 1 <i>E. durans</i>
0	4	2 <i>Enterococcus</i> spp.; 1 <i>E. faecium</i> ; 1 <i>E. durans</i>

Dois dos isolados apresentaram um máximo de 8 genes presentes: um isolado *Enterococcus* spp. apresentou os genes *gelE*, *hyl*, *cpd*, *ace*, *cylA*, *cylB*, *cylL_L* e *cylM* e o outro isolado pertencente à espécie *E. faecium* apresentou os genes *gelE*, *hyl*, *esp*, *ace*, *cylA*, *cylB*, *cylL_L* e *cylM*. A maioria dos isolados (63,49%) apresentou 3 ou mais genes (Tabelas 10 e 11).

Tabela 10 - Espécies de enterococos distribuídas pelas combinações de factores de virulência detectadas em isolados não resistentes à vancomicina.

Factores de virulência	Espécie
-	1 <i>E. faecium</i> ; 2 <i>Enterococcus</i> spp.
<i>cylM</i>	2 <i>E. faecium</i>
<i>cylL_L</i>	4 <i>E. faecium</i> ; 1 <i>Enterococcus</i> spp.
<i>cpd</i>	1 <i>E. faecium</i> ; 1 <i>E. hirae</i>
<i>cylL_L</i> + <i>cylM</i>	2 <i>E. faecium</i>
<i>cpd</i> + <i>cylM</i>	1 <i>E. faecium</i>
<i>gelE</i> + <i>cylL_L</i>	1 <i>E. faecium</i> ; 1 <i>Enterococcus</i> spp.
<i>cpd</i> + <i>cylL_L</i>	1 <i>E. hirae</i> ; 1 <i>E. faecium</i> ;
<i>gelE</i> + <i>cpd</i> + <i>cylL_L</i>	1 <i>E. faecium</i> ; 1 <i>Enterococcus</i> spp.
<i>gelE</i> + <i>cylL_L</i> + <i>cylM</i>	1 <i>Enterococcus</i> spp.
<i>hyl</i> + <i>cpd</i> + <i>ace</i>	1 <i>E. faecium</i>
<i>gelE</i> + <i>hyl</i> + <i>ace</i>	1 <i>Enterococcus</i> spp.
<i>gelE</i> + <i>esp</i> + <i>cylM</i>	1 <i>Enterococcus</i> spp.
<i>gelE</i> + <i>esp</i> + <i>cpd</i>	1 <i>E. faecium</i>
<i>esp</i> + <i>cpd</i> + <i>cylL_L</i>	1 <i>E. faecium</i>

Tabela 10 (continuação) - Espécies de enterococos distribuídas pelas combinações de factores de virulência detectadas em isolados não resistentes à vancomicina.

Factores de virulência	Espécie
<i>gelE+hyl+cpd+ace</i>	2 <i>Enterococcus</i> spp.
<i>gelE+hyl+cpd+cylL_L</i>	1 <i>Enterococcus</i> spp.
<i>esp+cpd+ace+cylL_L</i>	1 <i>Enterococcus</i> spp.
<i>gelE+hyl+ace+cylL_L</i>	1 <i>Enterococcus</i> spp.
<i>hyl+ace+cylL_L+cylM</i>	1 <i>E. faecium</i>
<i>esp+cpd+cylL_L+cylM</i>	1 <i>Enterococcus</i> spp.; 3 <i>E. faecium</i>
<i>hyl+esp+cpd+cylL_L</i>	1 <i>E. faecalis</i>
<i>gelE+hyl+cpd+ace+cylL_L</i>	4 <i>Enterococcus</i> spp.
<i>gelE+hyl+cpd+ace+cylM</i>	1 <i>Enterococcus</i> spp.
<i>hyl+esp+cpd+ace+cylL_L</i>	1 <i>E. faecium</i>
<i>gelE+cylA+cylB+cylL_L+cylM</i>	1 <i>Enterococcus</i> spp.
<i>gelE+cpd+cylB+cylL_L+cylM</i>	1 <i>Enterococcus</i> spp.
<i>gelE+hyl+esp+cpd+ace</i>	1 <i>Enterococcus</i> spp.
<i>esp+cpd+cylB+cylL_L+cylM</i>	1 <i>E. faecium</i> ; 1 <i>E. hirae</i> ; 1 <i>E. faecalis</i> ; 1 <i>E. durans</i>
<i>gelE+hyl+ace+cylA+cylB+cylL_L+cylM</i>	1 <i>Enterococcus</i> spp.
<i>gelE+hyl+cpd+cylA+cylB+cylL_L+cylM</i>	1 <i>Enterococcus</i> spp.
<i>gelE+hyl+cpd+ace+cylA+cylB+cylL_L+cylM</i>	1 <i>Enterococcus</i> spp.
<i>gelE+hyl+esp+ace+cylA+cylB+cylL_L+cylM</i>	1 <i>E. faecium</i>

Tabela 11 – Espécies de enterococos distribuídas pelas combinações de factores de virulência detectadas em isolados resistentes à vancomicina (VRE).

Factores de virulência	Espécie
-	1 <i>E. durans</i>
<i>cpd</i>	1 <i>E. durans</i>
<i>hyl</i>	1 <i>E. faecium</i>
<i>cpd+cylL_L</i>	1 <i>E. durans</i>
<i>hyl+esp+cpd</i>	1 <i>E. faecium</i>
<i>esp+cpd+cylL_L</i>	1 <i>E. durans</i>

4.2 – Actividade gelatinase

A grande maioria dos isolados, 82,54%, foi capaz de degradar a gelatinase (Figura 9). Apenas um dos isolados com resistência à vancomicina (VRE) não apresentou esta actividade.



Figura 9 – Imagem exemplificativa da actividade gelatinase positiva em colónias de enterococos.

4.3 – Actividade hemolítica

Nenhum dos isolados apresentou actividade β -hemolítica. Porém a maioria, 55,56% (35 isolados), apresentou actividade α -hemolítica (Tabela 12). Todos os isolados resistentes à vancomicina apresentaram actividade α -hemolítica.

Tabela 12 – Número de isolados com actividade α -hemolítica distribuídos por espécies.

	Espécie	Número de isolados com actividade α - hemolítica
Isolados não resistentes à vancomicina	<i>E. faecium</i> (N=23)	15
	<i>E. faecalis</i> (N=4)	2
	<i>E. hirae</i> (N=3)	1
	<i>E. durans</i> (N=1)	0
	<i>Enterococcus</i> spp. (N=26)	11
Isolados resistentes à vancomicina (VRE)	<i>E. durans</i> (N=4)	4
	<i>E. faecium</i> (N=2)	2

4.4 – Relação entre o fenótipo de resistência a antibióticos e a presença de genes codificantes de factores de virulência

Como evidenciado nas tabelas 13 e 14, a espécie *E. faecium* foi a que apresentou uma maior diversidade de fenótipos de resistência a antibióticos (12), sendo o fenótipo mais comum TET+ERY com 10 isolados. Os isolados com este fenótipo apresentaram 7 genótipos de factores de virulência: *cylL_L*, *cpd*, *cpd+cylL_L*, *cylL_L+cylM*, *hyl+cpd+ace*, *esp+cpd+cylL_L* e *hyl+esp+cpd+ace+cylL_L*. Relativamente a *Enterococcus* spp., foram detectados 7 fenótipos de resistência, sendo que também TET+ERY foi o mais comum

encontrado (em 4 isolados), com os seguintes genótipos de factores de virulência: *gelE+hyl+ace*, *gelE+hyl+ace+cpd+cyl_L*, *gelE+hyl+ace+cpd+cylM* e *gelE+hyl+ace+cylA+cylB+cylLL+cylM*. A espécie *E. faecalis* apresentou 4 fenótipos, todos com apenas 1 isolado. As espécies *E. durans* e *E. hirae* foram as que apresentaram menor número de fenótipos de resistência, com 3 e 2 isolados, respectivamente. O fenótipo TET+ERY foi o mais comum encontrado em *E. hirae* e estes isolados apresentaram os seguintes genótipos: *cpd+ace* e *cpd+cyl_L*. Relativamente à espécie *E. durans* existem 2 isolados com os fenótipos de resistência a antibióticos TET+ERY+VAN e TET+ERY+AMP+VAN e 1 isolado com o fenótipo TET+ERY.

Tabela 13 - Relação entre o fenótipo de resistência a antibióticos e os genótipos de factores de virulência nos isolados não resistentes à vancomicina.

Espécie	Fenótipo de resistência a antibióticos	Nº de isolados	Genótipo de factores de virulência	Nº de isolados
<i>Enterococcus</i> spp.	-	15	-	2
			<i>cyl_L</i>	1
			<i>gelE+cyl_L</i>	1
			<i>gelE+cylLL+cylM</i>	1
			<i>gelE+ cpd +cyl_L</i>	1
			<i>gelE+hyl+cpd+cyl_L</i>	1
			<i>esp+cpd+ace+cylM</i>	1
			<i>esp+cpd+cyl_L+cylM</i>	2
			<i>gelE+hyl+cpd+ace+cyl_L</i>	2
			<i>gelE+cylA+cylB+cyl_L+cylM</i>	1
			<i>gelE+cpd+cylB+cyl_L+cylM</i>	1
			<i>gelE+hyl+cpd+ace+cylA+cylB+cyl_L+cylM</i>	1
	TET+ERY	4	<i>gelE+hyl+ace</i>	1
			<i>gelE+hyl+ace+cpd+cyl_L</i>	1
			<i>gelE+hyl+ace+cpd+cylM</i>	1
			<i>gelE+hyl+ace+cylA+cylB+cyl_L+cylM</i>	1
	QD+CIP	1	<i>gelE+hyl+cpd+cylA+cylB+cyl_L</i>	1
			<i>L_L+cylM</i>	1
	TET+ERY+QD	1	<i>gelE+hyl+ace+cpd</i>	1
	TET+ERY+AMP+STR	1	<i>gelE+hyl+ace+cpd</i>	1

Tabela 13 (continuação) – Relação entre o fenótipo de resistência a antibióticos e os genótipos de factores de virulência nos isolados não resistentes à vancomicina.

Espécie	Fenótipo de resistência a antibióticos	Nº de isolados	Genótipo de factores de virulência	Nº de isolados
<i>Enterococcus</i> spp.	TET+ERY+AMP+CIP	1	<i>gelE+hyl+ace+cylL_L</i>	1
	TET+ERY+QD+CHL	1	<i>gelE+hyl+ace+cpd+cylL_L</i>	1
	TET+ERY+QD+STR+CIP+KAN	2	<i>gelE+esp+cylM</i>	1
			<i>gelE+hyl+esp+ace+cpd</i>	1
<i>E. faecium</i>	TET+ERY	10	-	1
			<i>cylL_L</i>	3
			<i>cpd</i>	1
			<i>cpd+cylL_L</i>	1
			<i>cylL_L+cylM</i>	1
			<i>hyl+cpd+ace</i>	1
			<i>esp+cpd+cylL_L</i>	1
			<i>hyl+esp+cpd+ace+cylL_L</i>	1
			<i>cylL_L+cylM</i>	1
			<i>gelE +cpd+cylL_L</i>	1
	TET+ERY+KAN	2		
	TET+ERY+QD	1	<i>gelE+cylL_L</i>	1
	TET+ERY+STR+KAN	2	<i>esp+cpd+cylL_L+cylM</i>	2
	TET+ERY+AMP+KAN	1	<i>cylM</i>	1
	TET+ERY+QD+CIP	1	<i>gelE+esp+cpd</i>	1
	TET+ERY+QD+CHL	1	<i>gelE+hyl+esp+ace+cylA+cylB+cy lL_L+cylM</i>	1
	TET+ERY+AMP+CHL+QD	3	<i>cylM</i>	1
			<i>cpd+cylM</i>	1
			<i>esp+cpd+cylB+cylL_L+cylM</i>	1
	TET+ERY+STR+KAN+QD	1	<i>hyl+ace+cylL_L+cylM</i>	1
	TET+ERY+AMP+STR+KAN	1	<i>cylL_L</i>	1
<i>E. faecalis</i>	CIP	1	<i>esp+cpd+ace+cylL_L+cylM</i>	1
	TET+ERY	1	<i>hyl+esp+cpd+cylL_L</i>	1
	TET+ERY+QD	1	<i>esp+cpd+cylL_L+cylM</i>	1
	TET+ERY+QD+CHL	1	<i>gelE+hyl+cpd+ace</i>	1
<i>E. hirae</i>	TET+ERY	2	<i>cpd</i>	1
			<i>cpd+cylL_L</i>	1
	TET+ERY+QD	1	<i>esp+cpd+cylB+cylL_L+cylM</i>	1
<i>E. durans</i>	TET+ERY	1	<i>esp+cpd+cylB+cylL_L+cylM</i>	1

Tabela 14 - Relação entre o fenótipo de resistência a antibióticos e os genótipos de factores de virulência nos isolados resistentes à vancomicina.

Espécie	Fenótipo de resistência a antibióticos	Nº de isolados	Genótipo de factores de virulência	Nº de isolados
<i>E. faecium</i>	TET+ERY+AMP+CIP+VAN	1	<i>hyl+esp+cpd</i>	1
	ERY+CIP+AMP+VAN	1	<i>hyl</i>	1
<i>E. durans</i>	TET+ERY+VAN	2	-	1
			<i>cpd+cyl_L</i>	1
	TET+ERY+AMP+VAN	2	<i>cpd</i>	1
			<i>esp+cpd+cyl_L</i>	1

4.5 - Perfis proteicos monodimensionais

Através de análise proteómica foi possível obter perfis monodimensionais reproduzíveis nos quais foi possível diferenciar as espécies incluídas neste estudo, como se observa nas figuras 10 e 11. Na generalidade, os isolados da mesma espécie são mais parecidos entre si do que com quaisquer outros isolados. No gel da figura 10, os perfis proteicos observados são mais semelhantes entre si do que no gel da figura 11.

Nenhum dos isolados estudados tem em comum a espécie, genótipo de resistência a antibióticos e genótipo de virulência.

As setas vermelhas observadas nas figuras 10 e 11 indicam bandas que apenas foram detectadas nesse isolado.

No gel da figura 10, 6 isolados apresentam o genótipo *tetM+tetL+ermB*, 6 apresentam o genótipo *tetL+ermB*, 1 apresentam o genótipo *tetL+aph3'-IIIa* e 1 apresentam o genótipo *ermB*. Apenas 3 isolados presentes neste gel, Gv24, Gv31 e Gv3VRE partilham o mesmo fenótipo de virulência, apresentando o gene de factor de virulência *cpd*.

Os isolados resistentes à vancomicina pertencentes à espécie *E. durans* têm o mesmo genótipo de resistência a antibióticos. Os perfis proteicos destes isolados são muito similares, no entanto algumas diferenças podem ser observadas (setas verdes presentes na figura 10).

O isolado Gv39 também apresenta uma banda (assinalada no gel com uma seta azul), a qual não está presente em mais nenhum dos isolados.

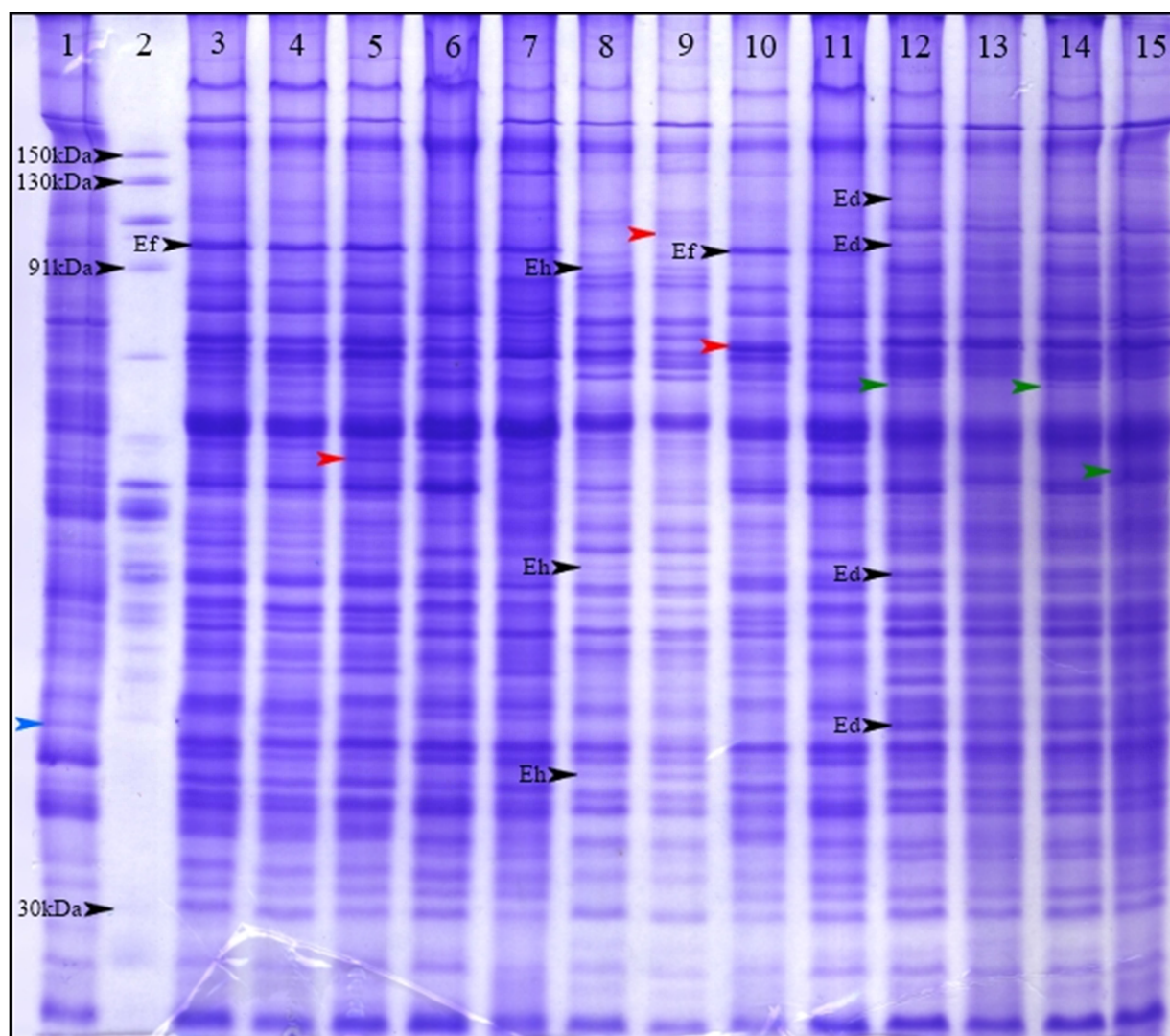


Figura 10 - Gel monodimensional de estirpes de *Enterococcus* spp. Poço 1 – *Enterococcus* spp. Gv39; Poço 2 – Marcador; Poço 3 a 7 – *E. faecium* Gv24, Gv28, Gv20, Gv41VRE e Gv41; Poço 8 e 9 – *E. hirae* Gv31 e Gv43; Poço 10 e 11 – *E. faecium* Gv12 e Gv50VRE; Poço 12 a 15 – *E. durans* Gv56VRE, Gv01VRE, Gv02VRE e Gv03VRE. Legenda: Ef – *E. faecium*; Eh – *E. hirae*; Ed – *E. durans*.

No gel presente na figura 11, 7 isolados apresentam o genótipo *tetL+tetM+ermB+Tn5397+intTn916*, 2 apresentam o genótipo *tetL+tetM+ermB+Tn5397+vatE*, 2 apresentam o genótipo *tetL+tetM+ermB+intTn916*, 2 apresentam o genótipo *tetL+tetM+Tn5397+intTn916* e 1 apresenta o genótipo *tetL+tetM+ermB+aph3'''-IIIa*. Apenas 2 isolados presentes neste gel, Gv38 e Gv53 partilham o mesmo fenótipo de virulência, apresentando os genes de factor de virulência *cpd+cylL*.

As setas azuis presentes na figura 11 indicam bandas apenas presentes nos isolados Gv26 e Gv23.

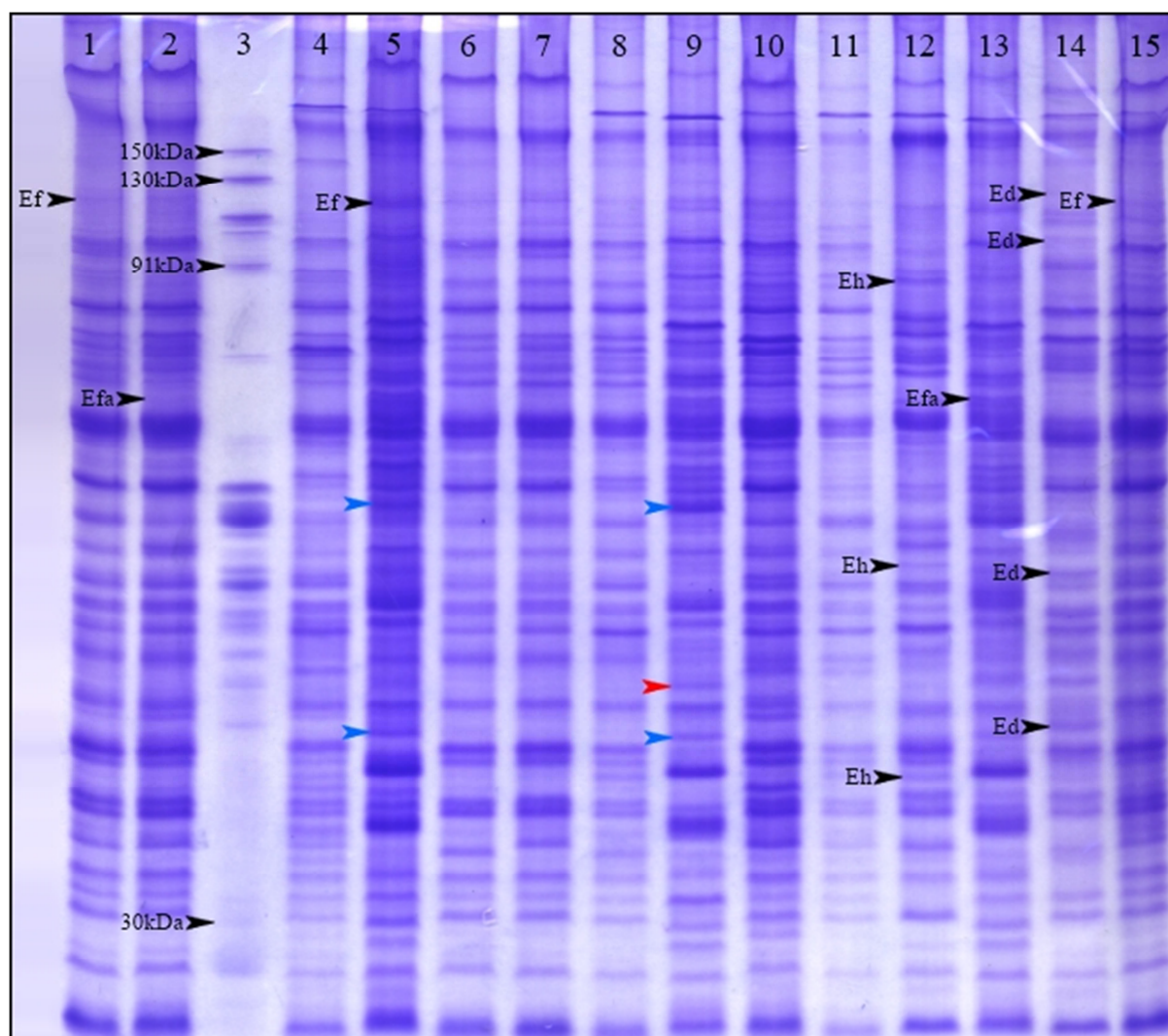


Figura 11 - Gel monodimensional de estirpes de *Enterococcus* spp. Poço 1 e 2 – *E. faecium* Gv02e Gv53; Poço 3 – Marcador; Poço 4 – *E. faecalis* Gv49; Poço 5 a 11 – *E. faecium* Gv26, Gv05, Gv03, Gv04, Gv23, Gv27 e Gv07; Poço 12 – *E. hirae* Gv38; Poço 13 – *E. faecalis* Gv44; Poço14 – *E. durans* Gv56; Poço 15 – *E. faecium* Gv50. Legenda: Ef – *E. faecium*; Eh – *E. hirae*; Ed – *E. durans*; Efa – *E. faecalis*.

5 – Discussão

As gaivotas (*Larus cachinnans*) são aves marinhas migratórias que nidificam, entre outros locais da costa portuguesa, no arquipélago das Berlengas. Este é um grupo de pequenas ilhas localizado a cerca de 10 quilómetros da costa portuguesa, constituído pela Grande Ilha Berlenga e recifes adjacentes, o qual foi classificado como Reserva Natural em 1981 (Mendes *et al.*; 2009). Não existe população residente no arquipélago, não sendo realizadas actividades de agricultura ou exploração de gado. As ilhas são, esporadicamente visitadas por pequenos grupos de turistas, os quais são instruídas a não interferirem com a fauna e flora locais. Este arquipélago é, portanto, conservado num estado selvagem (Radhouani *et al.*, 2011).

As Berlengas constituem um habitat rico para várias plantas e animais, sendo a fauna local composta maioritariamente por aves marinhas. As gaivotas representam o maior grupo de aves marinhas do arquipélago, tendo os seus números vindo a aumentar drasticamente nos últimos 40 anos. O sucesso da sua colonização é provavelmente devido aos seus hábitos alimentares oportunistas e devido a necessitarem de poucos requisitos para se reproduzir com sucesso (Yésou & Beaubrun, 1995).

Estes animais entram muitas vezes em contacto com humanos e animais ao longo das suas rotas migratórias, tirando partido de qualquer fonte de alimentação disponível, muitas vezes lixo humano. Devido a este contacto próximo há a possibilidade de troca de genes de resistência a antibióticos e de factores de virulência, tornando estes animais transportadores destas estirpes (Radhouani *et al.*, 2011).

Os enterococos são bactérias comensais que habitam o tracto gastrointestinal de humanos e animais. Apesar de serem normalmente inofensivas, estas bactérias têm vindo a ser reconhecidas como capazes de causar infecções, devido ao aumento da resistência a antibióticos e da disseminação de factores de virulência (Lopes *et al.*, 2006). A resistência a antibióticos contribui, de forma indirecta, para a patogenicidade das estirpes de enterococos. Esta não pode, no entanto, explicar a sua virulência, a qual é evidenciada através da produção de factores de virulência. Estes factores permitem a aderência das bactérias a células hospedeiras e à matriz extracelular, facilitam a invasão dos tecidos, afectam a imunomodulação e causam danos celulares mediados por toxinas (Portenier *et al.*, 2003, Poeta *et al.*, 2006).

Com este trabalho pretendeu-se analisar a presença de factores de virulência e os perfis proteicos em várias estirpes de *Enterococcus* spp., previamente isoladas de amostras fecais de gaivotas do arquipélago das Berlengas.

5.1 – Factores de virulência de isolados de *Enterococcus* spp. de gaivota

No presente estudo, foram relacionados os factores de virulência com a resistência a antibióticos. Das 17 estirpes sensíveis a antibióticos apenas 2 não apresentaram qualquer factor de virulência. Um dos isolados sensíveis a antibióticos apresentou a maior quantidade de factores de virulência registada, com o genótipo *gelE+hyl+cpd+ace+cylA+cylB+cylL_L+cylM*, a par do isolado de *E. faecium* com o fenótipo de resistência TET+ERY+QD+CHL, o qual apresentou o genótipo de virulência *gelE+hyl+esp+ace+cylA+cylB+cylLL+cylM*. Alguns estudos evidenciam que a presença de resistências a antibióticos não implica que haja presença de factores de virulência, como no estudo de 2003 por Mannu e colaboradores. Estes investigadores analisaram a incidência de factores de virulência e resistência a antibióticos em isolados provenientes de lacticínios e pequenos ruminantes. Dos 26 isolados de pequenos ruminantes, nenhum apresentou os factores de virulência estudados (*ace*, *efaA*, *gelE*, *agg* e *esp*); no entanto estes isolados apresentavam resistência a 4 dos 12 antibióticos testados (eritromicina, tetraciclina, nitrofurantoína e norfloxacina).

A produção de citolisina está dependente da expressão do operão *cyl*, presente em plasmídeos. Este factor de virulência, apesar de estar mais, frequentemente, associado a isolados clínicos da espécie *E. faecalis*, foi já identificado também em isolados provenientes de produtos alimentares e de amostras fecais de animais domésticos e selvagens (Semedo *et al.*, 2003a; Brtkova *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2011). Foram, também, detectadas outras espécies de enterococos, como *E. faecium* e *E. durans*, contendo este operão e portanto manifestando β -hemólise (Poeta *et al.*, 2006; Gaspar *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2011). No presente trabalho nenhum dos isolados manifestou β -hemólise, o que é consistente com a análise genotípica, uma vez que em nenhum dos casos foi detectada a presença do gene estrutural *cylL_S*, não estando, portanto, o operão *cyl* completo. Apesar disto, a grande maioria dos isolados (74,6%) apresentou pelo menos um dos genes deste operão, sendo que 5 isolados apresentaram 4 dos 5 genes: *cylA*, *cylB*, *cylL_L* e *cylM*. O gene, pertencente ao operão *cyl*, mais

frequentemente identificado foi o gene estrutural *cylL*. Vários estudos corroboram a premissa da necessidade de existência de todos os genes do operão *cyl* para haver manifestação de β -hemólise, como é o caso de Hällgren e colaboradores. Estes investigadores, em 2009, estudaram a presença do operão *cyl* em 115 isolados clínicos de *E. faecalis* e *E. faecium*. Foi detectada β -hemólise em 13% dos isolados, sendo que estes continham todos os genes do operão *cyl*. Em nenhum dos isolados com o operão *cyl* incompleto ou ausente foi detectada a lise dos eritrócitos. Num outro estudo de Poeta e colaboradores (2007), foi estudada presença da citolisina em 140 isolados de animais selvagens. Nenhum dos isolados apresentou actividade β -hemolítica, mas, em alguns casos foi detectado o operão *cyl* completo. Isto mostra que apesar deste operão ser necessário para a ocorrência de β -hemólise, a sua presença não indica, forçosamente, que tal aconteça.

O factor de virulência gelatinase actua através da degradação de várias proteínas, incluindo a gelatina e o colagénio e é codificado pelo gene *gelE*, presente no cromossoma bacteriano. A actividade gelatinase está intimamente relacionada com a espécie *E. faecalis*, tendo sido, no entanto, descrita em várias outras espécies, como *E. faecium*, *E. durans* e *E. hirae* (Lopes *et al.*, 2006; Poeta *et al.*, 2006). Neste estudo foi detectada a actividade gelatinase em 52 isolados das espécies *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae* e *Enterococcus* spp.. No entanto, o gene *gelE* foi apenas detectado em 25 isolados das espécies *E. faecalis*, *E. faecium* e *Enterococcus* spp.. Dos isolados que apresentaram actividade gelatinase positiva 38,46% possuíam o gene *gelE*. No entanto, 5 dos isolados com o gene *gelE*, demonstraram actividade gelatinase negativa. O estudo de Mohamed e Murray em 2005 corrobora estes resultados. Estes investigadores estudaram a relação entre a produção de gelatinase e a formação de biofilmes em isolados de *E. faecalis* e observaram que 11 (6,75%) dos isolados apresentavam o gene *gelE* mas eram gelatinase negativos. Creti e colaboradores, em 2004, obtiveram resultados semelhantes em isolados de *E. faecalis* de várias origens, sendo que a maioria (63,6%) dos isolados com o *gelE* evidenciava um fenótipo gelatinase negativo. A não produção de gelatinase em estirpes que contêm o gene *gelE*, é devida a uma deleção de um fragmento de 23,9kb no locus *fsr* (regulador da expressão do gene *gelE*) (Nakayama *et al.*, 2002). Foi também reportada a presença de colónias não produtoras de gelatinase em subculturas de isolados produtores de gelatinase, o que indica a ocorrência frequente de deleções espontâneas (Galloway-Penã *et al.*, 2011).

No presente estudo 32 isolados apresentaram actividade gelatinase, apesar de não possuírem o gene *gelE*. Isto acontece, provavelmente, devido à presença de outras proteases como a pepsina e tripsina, as quais também conseguem degradar a gelatina. (Harrington, 1996). No estudo de Pangallo e colaboradores, em 2008, 5 dos 166 isolados de enterococos estudados apresentaram actividade gelatinase positiva sem, no entanto, possuírem o gene *gelE*.

A presença do gene *gelE* e dos genes *fsrA*, *fsrB* e *fsrC* em simultâneo num mesmo isolado sugere um fenótipo gelatinase positivo como evidenciado no estudo de Poeta e colaboradores em 2008. Estes investigadores analisaram a prevalência dos genes *fsrABC* e *gelE*, em 67 isolados fecais de enterococos provenientes de javalis, tendo observado a presença dos genes em 4 isolados de *E. faecium* e 2 isolados de *E. faecalis*. Todos os seis isolados foram identificados como positivos para a actividade da gelatinase. No presente estudo foi estudada também a presença do operão *fsr*, mas não foi detectado nenhum isolado que o contivesse, o que sugere a presença de deleções no mesmo.

Foi também analisada a presença do factor de virulência hialuronidase, através da detecção do gene *hyl*. Foi observado que o gene *hyl* se encontrava presente em 34,92% (22) dos isolados, 6 pertencentes à espécie *E. faecium*, 2 a *E. faecalis* e 14 a *Enterococcus* spp.. Dois dos isolados *E. faecium* com este gene eram resistentes à vancomicina. Vankerckhoven e colaboradores, em 2004, desenvolveram um PCR multiplex capaz de detectar simultaneamente a presença de 5 genes de factores de virulência, *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp* e *hyl* em *E. faecium*. De entre 271 amostras clínicas e fecais, 17% continham o gene codificante da hialuronidase. Doğru e colaboradores, em 2010, estudaram os perfis genéticos de *E. faecium* e *E. faecalis* isolados de fezes e de carcaças de aves. De entre os 199 isolados estudados, apenas 2, pertencentes à espécie *E. faecium*, possuíam o gene *hyl*. Já Khan e colaboradores, em 2008, obtiveram uma percentagem muito mais elevada de presença do gene *hyl* no seu estudo. Estes investigadores analisaram 34 isolados de *E. faecium* resistentes à vancomicina provenientes de hospitais da Arábia Saudita, tendo observado que em 53% dos isolados estava presente o gene *hyl*.

Isolados de *E. faecium* resistentes à vancomicina pertencentes ao complexo clonal 17 (CC17) estão, frequentemente, associados a resistência à ampicilina e ciprofloxacina, e à presença do gene de virulência *hyl* (Radhouani *et al.*; 2010). Isto

verifica-se no presente trabalho, uma vez que, todos os isolados de *E. faecium* resistentes à vancomicina tinham presente este gene.

O gene codificante da proteína de superfície extracelular *esp* foi também um dos factores de virulência objecto deste estudo. Foram identificados 19 isolados (30,16%) que continham este gene, sendo que 8 destes pertenciam à espécie *E. faecium* (1 deles resistente à vancomicina), 3 a *E. faecalis*, 2 a *E. durans* (1 deles resistente à vancomicina), 1 a *E. hirae* e 5 a *Enterococcus* spp. Whitman e colaboradores, em 2007, efectuaram um estudo sobre a incidência deste factor de virulência em enterococos isolados de fezes de animais e de fontes humanas. O gene *esp* foi encontrado em 20,93% dos isolados de cães (todos *E. faecium*); em 13,64% dos isolados de rato; em 9,09% dos isolados de aves da subordem *Passeri*, e em 29,41% dos isolados de gaivotas. Este gene não foi detectado em isolados de gato, rena, ganso ou guaxinim. Relativamente aos isolados de *E. faecalis* e *E. faecium* provenientes das fontes humanas, o gene *esp* foi detectado em 100% dos isolados de efluentes primários; em 30% de isolados provenientes do conteúdo de fossas sépticas e em 80% dos isolados provenientes de latrinas. O resultado de Whitman e colaboradores em isolados de gaivotas foram muito similares aos encontrados no presente estudo.

O gene *cpd* codifica uma feromona sexual, que ajuda à troca de plasmídeos, promovendo a conjugação bacteriana. No presente estudo, este foi o gene detectado com maior frequência, estando presente em 61,9% dos isolados. Todos os isolados de *E. faecalis* e *E. hirae* apresentaram o gene *cpd*, sendo que dos restantes, 12 pertenciam à espécie *E. faecium*, 16 a *Enterococcus* spp. e 4 a *E. durans*. Dos isolados que continham este gene, 3 pertenciam à espécie *E. durans* e 1 pertencia à espécie *E. faecium* (todos eram resistentes à vancomicina). Também no estudo de Eaton e Gasson, em 2001, todos os isolados de *E. faecalis* continham o gene *cpd*. Estes investigadores analisaram factores de virulência presentes em enterococos de isolados clínicos e alimentares, sendo que apenas 2 espécies foram evidenciadas, *E. faecium* e *E. faecalis*. Nenhum isolado de *E. faecium* continha o gene *cpd*. Também Poeta e a sua equipa, em 2008, analisaram a presença do gene *cpd* em 67 isolados fecais de enterococos (39 *E. faecium*, 2 *E. faecalis*, 24 *E. hirae* e 2 *Enterococcus* spp.) isolados de javalis. O gene foi encontrado em todos os isolados *E. faecalis*, mas não nas restantes espécies.

O factor de virulência *ace*, que codifica uma proteína de ligação ao colagénio, está intrinsecamente ligado à espécie *E. faecalis*, estando nesta ubiquamente distribuído. Vários são os estudos que reportam a presença deste gene em *E. faecalis* (Creti *et al.*,

2004; Poeta *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2011; Zou *et al.*, 2011), mas existem outros que evidenciam a presença deste gene em diferentes espécies, como é o caso de Abriouel e colaboradores, em 2008, os quais analisaram a presença deste gene em isolados de enterococos provenientes de frutas, legumes, solo, água e amostras clínicas. Estes investigadores detectaram o gene *ace* em isolados de *E. faecalis* e *E. faecium* provenientes de água/solo e provenientes de hospital, não sendo detectado em isolados de frutas/vegetais. Também Trivedi e colaboradores, em 2011, estudaram os factores de virulência em enterococos provenientes de lacticínios, carnes e fruta/vegetais. O gene *ace* foi observado nas espécies *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus* e *E. mundtii*, apresentando maior prevalência na espécie *E. faecalis*. No presente estudo, o gene *ace* foi detectado em 19 dos isolados de fezes de gaivota (30,16%), 4 pertencentes à espécie *E. faecium*, 2 à espécie *E. faecalis* e 13 a *Enterococcus* spp.

O gene *agg*, que codifica o factor de agregação, não foi detectado em nenhum dos 63 isolados. Este gene, à semelhança dos genes *ace* e *gelE* e do operão *cyl*, encontra-se intrinsecamente relacionado com a espécie *E. faecalis*, como foi já evidenciado em vários estudos (Martin *et al.*, 2005; Poeta *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2011). No entanto, este gene foi já evidenciado por vários autores noutras espécies de enterococos, como no estudo de Cariolato e colaboradores, em 2008. Estes investigadores analisaram a ocorrência de factores de virulência em *E. faecalis* e *E. faecium* provenientes de isolados humanos e de lacticínios. O gene *agg* foi encontrado em 65,8% dos isolados de *E. faecalis*, mas foi, também, detectado em 2,47% de *E. faecium*. Também Gelsomino e colaboradores, em 2004, num estudo sobre factores de virulência e resistência a antibióticos em enterococos isolados de queijos artesanais irlandeses, encontraram o gene *agg* em espécies de *E. faecalis* e *E. casseliflavus*.

5.2 – Análise SDS-PAGE dos perfis proteicos dos isolados de *Enterococcus* spp. de gaivotas

O estudo das proteínas responsáveis pela resistência aos antibióticos, é um assunto muito importante, uma vez que, por todo o mundo se observa uma disseminação das resistências e factores de virulência, e o aparecimento em grande escala de bactérias multiresistentes. Torna-se então, necessária a detecção das proteínas responsáveis por este fenómeno, de maneira a poder desenvolver novos antibióticos, para assim conseguir mais eficazmente tratar infecções bacterianas. As metodologias proteómicas

auxiliam a descoberta de novos antibióticos através da identificação ou validação dos mecanismos de acção dos compostos, e do aumento da confiança no valor de genes com função desconhecida como novos alvos potenciais (Bandow, 2005).

Os desafios da descoberta de novos antibióticos começam com a identificação de alvos. Becker e colaboradores, em 2006, catalogaram e caracterizaram ORFs com funções metabólicas no genoma de *Salmonella enterica*, baseado na premissa que genes envolvidos nas funções metabólicas tendem a ser bons alvos para antibióticos (Schmid, 2006). Posteriormente foram utilizadas ferramentas proteómicas para identificar as proteínas de *S. enterica* expressas em modelos de infecção em ratos, de febre tifóide e gastroenterite. Foi possível separar proteínas e vias responsáveis por metabolizar compostos fornecidos pelo hospedeiro daqueles que não são fornecidos pelo hospedeiro. Foram também identificadas proteínas que fazem parte de vias catabólicas e outras responsáveis pelo transporte de metabolitos. Estes investigadores descobriram que o efeito mais marcante na virulência é conseguido desligando genes e vias envolvidas na síntese de metabolitos que não são fornecidos pelo hospedeiro. Estas vias incluem 155 proteínas, as quais foram distinguidas como novos alvos promissores para antibióticos.

Neste estudo foram obtidos perfis proteicos monodimensionais reproduzíveis, com um padrão de bandas bem definido para todas as amostras analisadas.

Foi possível obter bandas, as quais distinguem as espécies analisadas. Para a espécie *E. faecium* e espécie *E. faecalis* foi apenas observada uma banda característica. Relativamente às espécies *E. hirae* e *E. durans*, foram identificadas 3 e 4 bandas características, respectivamente. Em espécies que estão presentes em ambos os géis foi possível identificar o mesmo padrão de bandas, o que indica reprodutibilidade, e valida as tecnologias proteómicas como úteis na distinção espécies bacterianas. Vários estudos foram já efectuados com o mesmo objectivo, como é o caso do estudo de Kim e colaboradores, em 2010. Estes investigadores analisaram perfis proteicos obtidos por SDS-PAGE de *Bacillus* spp. isolados de uma pasta de soja fermentada tradicional da Coreia, *doenjang*. Através da comparação dos proteomas obtidos com os de espécies referência, foi possível identificar as espécies *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus* e *B. sonorensis*, apesar de existirem grandes diferenças. Estes resultados foram também validados pela sequenciação do gene codificante de 16S rRNA. Também Hébert e colaboradores, em 2000, utilizaram a técnica de SDS-PAGE para distinguir as espécies *Lactobacillus helveticus* e *Lactobacillus delbrueckii* lactis isoladas de queijos argentinos. Os padrões obtidos foram reproduzíveis e permitiram a

discriminação das espécies, principalmente na região de 14 a 160kDa. Estes resultados foram também validados pela sequenciação do gene codificante de 16S rRNA.

No presente estudo, as bandas proteicas encontradas, que discriminam as espécies foram encontradas na região entre 30 e 130kDa. Relativamente a bandas únicas, a maioria foi encontrada na região entre 30 e 91kDa.

Nenhuma das amostras analisadas apresenta o mesmo genótipo de resistência a antibióticos e virulência, e pertence à mesma espécie, simultaneamente. Este facto traduz-se em perfis proteicos algo diversos, sendo possível identificar bandas apenas presentes num dos isolados (assinaladas com setas vermelhas em ambos os géis).

No gel da figura 11 foram identificadas duas bandas (assinaladas com uma seta azul), as quais estão presentes em ambos os isolados Gv23 e Gv26. Estes isolados são os únicos que apresentam o gene codificante do factor de virulência *ace*, o que poderá indicar que as bandas observadas estejam relacionadas com este gene. No gel da figura 10 foi também identificada uma banda (assinalada com uma seta azul), a qual apenas está presente no isolado, Gv39. Esse mesmo isolado, neste gel, é o único que apresenta o factor de virulência *ace* e o gene codificante de resistência à canamicina, *aph3'-IIIa*. Sendo que a banda observada está na mesma posição que uma das bandas assinaladas no gel da figura 11, presumir-se-á que esta esteja relacionada com o gene *ace* e não com o *aph3'-IIIa*.

Os isolados pertencentes à espécie *E. durans*, presentes no gel da figura 10, têm o mesmo genótipo de resistência a antibióticos e apresentam perfis proteicos muito semelhantes, no entanto foi possível distinguir algumas bandas diferentes (assinaladas com setas verdes). Isto poderá ser devido às suas diferenças de genótipo de virulência, sendo que o isolado Gv56VRE apresenta o genótipo *esp+cpd+cyl_L*, o isolado Gv01VRE não apresenta quaisquer genes de virulência, o isolado Gv02 apresenta o genótipo *cpd+cyl_L* e o isolado Gv03VRE apresenta apenas o gene *cpd*.

O gel da figura 11 apresenta perfis proteicos mais distintos entre si do que o gel da figura 10, o que poderá ser explicado pela presença de maior diversidade de espécies de enterococos, e de maior quantidade de genótipos de resistência no gel da figura 11.

Para aprofundar o estudo das proteínas presentes nas várias espécies de *Enterococcus* spp. e relacioná-las com mecanismos de resistência a antibióticos e factores de virulência, é necessário proceder a electroforese bidimensional, seleccionar spots proteicos e posteriormente identificá-los por espectrometria de massa e ferramentas bioinformáticas. Um dos objectivos é elaboração de mapas proteicos. Após

a sequenciação, a informação relativa à sequência proteica é procurada em bases de dados. A identificação da proteína e da sua função está assim facilitada, uma vez que já muitas proteínas estão anotadas neste tipo de bases de dados. Quando há o aparecimento de uma proteína ainda não presente nas bases de dados, é dada a percentagem de similaridade proteica com outras proteínas, podendo essa informação ajudar a determinar a que família proteica pertence a proteína e assim ser mais fácil a determinação da sua função e localização celular.

Nas bases de dados que contêm perfis proteicos bidimensionais, os *spots* proteicos encontram-se anotados, estando disponível informação acerca de cada proteína, como a sua sequência e a sua função. Carregando sobre o *spot* proteico no gel, obtêm-se várias informações sobre a proteína. É possível, assim, comparar os proteomas obtidos com os já disponíveis, de maneira a identificar as proteínas. No entanto, não estão disponíveis perfis proteicos bidimensionais para nenhum isolado do género *Enterococcus* spp..

Foi já efectuada a identificação de várias proteínas obtidas através de electroforese bidimensional, para as amostras Gv03VRE e Gv41VRE (Radhouani *et al.*, 2010). No isolado Gv03VRE, a maioria das proteínas identificadas estava envolvida na glicólise (25,7%), síntese proteica (24,3%) e mecanismos de conjugação (18,9%). No isolado Gv41VRE, a maioria das proteínas identificadas estava envolvida na glicólise (22,22%), transporte de iões e síntese de ATP (16,66%), e com o “assembly” da subunidade maior dos ribossomas (11,11%).

Num estudo levado a cabo por Bohle e colaboradores, em 2011, foram utilizados métodos baseados no “shaving” proteolítico e subsequente identificação de proteínas por espectrometria de massa, para a identificação de proteínas de superfície de *E. faecalis* V583. Foram identificadas 69 proteínas, a maioria das quais nunca tinha sido previamente caracterizada. Foi previsto que 33 das proteínas fossem citoplasmáticas, 31 estariam localizadas na superfície e 5 seriam secretadas. As proteínas localizadas na superfície e secretadas incluíam proteínas envolvidas na síntese da parede celular, processos regulados por feromonas e transporte de solutos. Estas proteínas emergem como interessantes alvos de estudo para a investigação da interacção entre *E. faecalis* e o ambiente.

Giard e colaboradores, em 2001, estudaram o proteoma de *E. faecalis* em situações de stress químico ou físico, com recurso a electroforese bidimensional. Foram identificados 27 *spots* proteicos, através de sequenciação N-terminal ou Western

blotting. As proteínas foram classificadas em 4 grupos de acordo com a sua função e regulação. O primeiro grupo compreende proteínas com funções protectoras caracterizadas a variados stresses. O segundo grupo contém enzimas de vias catabólicas. O terceiro grupo contém proteínas induzidas em células privadas de glucose pertencentes ao regulon CcpA (a indução destas enzimas em situações de privação pode servir para aumentar a capacidade das células procurarem nutrientes ou para mobilizar reservas energéticas endógenas). O último grupo compreende proteínas onde não foi possível obter homologia nas bases de dados.

6 – Conclusão

Os resultados obtidos no decorrer deste estudo revelaram que estirpes comensais de *Enterococcus* spp. de várias espécies, isolados de gaivota (*Larus cachinnans*), possuem um vasto espectro de factores de virulência demonstrando, a maioria dos isolados, múltiplos genes.

Podemos então, de modo geral, tirar as seguintes conclusões:

1. O gene *cylL_L* foi o mais detectado (em 41 dos isolados), seguido do gene *cpd* (em 39 dos isolados) e dos genes *gelE* e *cylM* (ambos detectados em 25 isolados). Não foi detectado nenhum isolado com os factores de virulência *fsr*, *agg* e *cylL_S*.
2. Apenas 4 dos isolados não apresentou qualquer factor de virulência. A maioria apresentou um genótipo de múltiplos genes de virulência, sendo que o número máximo de genes detectados foi 8, em dois dos isolados (1 de *E. faecium* e 1 de *Enterococcus* spp.).
3. Nenhum dos isolados apresentou actividade β -hemolítica, o que foi consistente com a análise genotípica, sendo que nenhum apresentou a totalidade do operão *cyl* (uma vez que o gene *cylS* não foi detectado em qualquer isolado). Foi detectada actividade α -hemolítica na maioria dos isolados.
4. A grande maioria dos isolados (52) apresentou actividade gelatinase positiva, apesar de ter ocorrido com diferentes graus de intensidade. Nem todos os isolados com o gene *gelE* presente apresentaram actividade gelatinase positiva.
5. O fenótipo de resistência a antibióticos mais comum foi o TET+ERY. Apenas 2 dos 17 isolados sem resistência a antibióticos não tinham qualquer factor de virulência presente.
6. Foi evidenciado também que a presença de resistência a antibióticos não implica a presença de factores de virulência, uma vez que 1 dos isolados sensíveis aos antibióticos apresentou o número máximo de factores de virulência detectados.
7. Não foi detectada diferença significativa em termos de número de genes de virulência, entre os isolados resistentes à vancomicina e os restantes.

Em relação à análise proteómica efectuada, foram obtidos perfis proteicos reprodutíveis e onde foi possível detectar alguns padrões.

Foi possível estabelecer as seguintes conclusões gerais:

1. Foi possível identificar padrões proteicos capazes de distinguir as espécies analisadas (*E. faecium*, *E. faecalis*, *E. hirae* e *E. durans*).
2. Foi identificada uma banda apenas presente nos isolados Gv39, Gv26 e Gv23, a qual poderá estar relacionada com o factor de virulência ace, uma vez que, apenas estes isolados o possuíam.
3. Os isolados da espécie *E. durans* possuem o mesmo genótipo de virulência, e um perfil proteico bastante similar. Foi, no entanto, possível detectar algumas diferenças, as quais poderão ser devidas às diferenças existentes entre os seus genótipos de virulência.

A observação da existência de estirpes de enterococos em animais migratórios como as gaivotas, com genes de resistência a antibióticos e de virulência é muito importante. Estes animais podem entrar em contacto com humanos ou com animais domésticos e para consumo, durante as suas migrações, actuando assim como um veículo de transmissão destes genes.

É importante monitorizar a ocorrência de diferentes perfis de resistência a antibióticos e factores de virulência em enterococos isolados de gaivotas e de outros animais selvagens, de forma a determinar se consistem num reservatório destes genes e expandir o conhecimento sobre as possíveis transferências destes determinantes.

Devido ao elevado polimorfismo proteico a análise proteómica é muito mais informativa (e também mais complexa) que a análise genómica. É assim importante a análise de perfis proteicos em bactérias portadoras de genes de resistência a antibióticos e de factores de virulência com vista à identificação de proteínas envolvidas nestes processos. Esta informação auxilia do desenvolvimento de novos antibióticos necessários para tratar infecções por bactérias multiresistentes. Assim poder-se-à também, estabelecer perfis proteicos mono e bidimensionais e aumentar as bases de dados existentes, de maneira a ser mais fácil a identificação proteica e comparação de proteomas.

7 – Bibliografia

- 2-D Electrophoresis, Principles and Methods. GE Healthcare, 2004.
- Aberna, R.; Prabakaran, K.; (2011) *Evaluation for the association of virulence determinants among E. faecalis with its clinical outcome*. Int J Biol Med Res. 2(2):523-527.
- Abriouel, H.; Omar, N.; Molinos, A.; López, R.; Grande, M.; Martínez-Viedma, P.; Ortega, E.; Cañamero, M.; Galvez, A.; (2008) *Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples*. International Journal of Food Microbiology 123: 38 – 49.
- Alouf, J.; Popoff, M.; (2006) *The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins*. Academic Press.
- Anderson, L., Seilhamer, J., (1997) *A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver*. Electrophoresis, 18(3-4):533-7.
- Andrewes, F.; Horder, T.; (1906) *A study of the streptococci pathogenic for man*. Lancet ii:708-713.
- Baik, J.; Jang, K.; Kang, S.; Yun, C.; Lee, K.; Kim, B.; Kum, K.; Han, S.; (2011) *Calcium Hydroxide Inactivates Lipoteichoic Acid from Enterococcus faecalis through Deacylation of the Lipid Moiety*. Journal of Endodontics 37 (2): 191-196.
- Baik, J.; Ryu, Y.; Han, J.; Im, J.; Kum, K.; Yun, Y.; Lee, K.; Ha, S.; (2008) *Lipoteichoic Acid Partially Contributes to the Inflammatory Responses to Enterococcus faecalis*. Journal of Endodontics 34 (8): 975-982.
- Bandow, J.; (2005) *Proteomic approaches to antibiotic drug discovery*. Curr Protoc Microbiol. Chapter 1: Unit 1F.2.
- Bennett, P.; (2002) *The mobility of genetic material*, In: Molecular medical microbiology, S. M., Editor, Academic press: San Diego, California.
- Bennett, P.; (2004) *Genome plasticity: insertion sequence elements, transposons and integrons, and DNA rearrangement*. In: Methods in Molecular Biology, vol. 266: Genomics, Proteomics, and Clinical Bacteriology: Methods and Reviews. Editors: Woodford, N.; Johnson, A.; Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Beranova-Giorgianni, S., (2003) *Proteome analysis by twodimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations*. Trends in Analytical Chemistry 22 (5).

Bøhle, A.; Riaz, T.; Egge- Jacobsen, W.; Skaugen, M.; Busk, O.; Eijsink, V.; Mathiesen, G.; (2011) *Identification of surface proteins in Enterococcus faecalis V583*. BMC Genomics, 12:135.

Bohle, L.; Færgestad, E.; Veiseth-Kent, E.; Steinmoen, H.; Nes, I.; Eijsink, V.; Mathiesen, G.; (2010) *Identification of proteins related to the stress response in Enterococcus faecalis V583 caused by bovine bile*. Proteome Science 25; 8: 37.

Boyd, D.; Willey, B.; Fawcett, D.; Gillani, N.; Mulvey, M.; (2008) *Molecular characterization of Enterococcus faecalis N06-0364 with low-level vancomycin resistance harboring a novel D-Ala-D-Ser gene cluster, vanL*. Antimicrob Agents Chemother; 52: 2667–2672.

Brtkova, A.; Revallova, M.; Bujdakova, H.; (2011) *Dissemination of Virulence Factors and Antimicrobial Resistance in Faecal Enterococci from Poultry*. Current Nutrition & Food Science 7(2): 137-143.

Burley, S., Almo, S., Bonanno, J., Capel, M., Chance, M., Gaasterland, T., Lin, D., Sali, A., Studier, F., Swaminathan S., (1999) *Structural genomics: beyond the human genome project*. Nature Genetics 23: 151–157.

Carattoli, A.; (2003) *Plasmid-Mediated Antimicrobial Resistance in Salmonella enterica*. Curr. Issues Mol. Biol. 5: 113-122.

Cariolato, D.; Andrighetto, C.; Lombardi, A.; (2008) *Occurrence of virulence factors and antibiotic resistances in Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium collected from dairy and human samples in North Italy*. Food Control 19(9): 886-892.

Cetinkaya, Y.; Falk, P.; Mayall, C.; (2000) *Vancomycin-resistant enterococci*. Clinical Microbiology Reviews 13:686-707.

Chitlaru, T.; Gat, O.; Gozlan, Y.; Ariel, N.; Shafferman, A.; (2006) *Differential Proteomic Analysis of the Bacillus anthracis Secretome: Distinct Plasmid and Chromosome CO₂-Dependent Cross Talk Mechanisms Modulate Extracellular Proteolytic Activities*. J. Bacteriol. 188(10) 3551-3571.

Cho, W.; (2007) *Proteomics Technologies and Challenges*. Geno. Prot. Bioinfo. 5 (2).

Cobon, G., Verrills, N., Papakostopoulos, P., Eastwood, H., Linnane, A., (2002) *The proteomics of ageing*. Biogerontology 3: 133–136.

Coburn, P.; Gilmore, M.; (2003) *The Enterococcus faecalis cytolysin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells*. Cellular Microbiology (10): 661–669.

Collins, C.; Hall, R.; (1995) *Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 39:155-162.

Coque, T.; Willems, R.; Fortún, J.; Top, J.; Diz, S.; Loza, E.; Cantón, R.; Baquero, F.; (2005) *Population structure of Enterococcus faecium causing bacteremia in a Spanish university hospital: setting the scene for a future increase in vancomycin resistance?* Antimicrob Agents Chemother. 49(7):2693-700.

Creti, R.; Imperi, M.; Bertuccini, L.; Fabretti, F.; Orefici, G.; Rosa, R.; Lucilla, B.; (2004) *Survey for virulence determinants among Enterococcus faecalis isolated from different sources*. Journal of Medical Microbiology 53: 13–20.

Davison, J.; (1999) *Genetic Exchange between Bacteria in the Environment*. Plasmid 42(2): 73-91.

Day, A.; Cove, J.; Phillips- Jones, M.; (2003) *Cytolysin gene expression in Enterococcus faecalis is regulated in response to aerobiosis conditions*. Mol Gen Genomics 269: 31–39.

de Hoog, C., Mann, M., (2004) *Proteomics*. Annual Reviews, Genomics Human Genetics 5: 267–293.

de Souza, G.; Wiker, H.; (2009) *The Impact of Proteomic Advances on Bacterial Gene Annotation*. Current Proteomics. 6: 84-92.

Devriese, L.; Baele, M.; Butaye, P.; (2006) *The Genus Enterococcus: Taxonomy*. In: The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria, Volume 4. Editor: Dworkin, M.; Springer.

Dhingra, V., Gupta, M., Andacht, T., Fua, Z., (2005) *Mini review New frontiers in proteomics research: A perspective*. International Journal of Pharmaceutics 299: 1–18.

Doğru, A.; Gençay, Y.; Ayaz, N.; (2010) *Comparison of Virulence Gene Profiles of Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis Chicken Neck Skin and Faeces Isolates*. Kafkas Univ Vet Fak Derg 16 (Suppl-A): S129-S133.

dos Santos, K.; Diniz, C.; Veloso, L.; de Andrade, H.; Giusta, M.; Pires, S.; Santos, A.; Apolônio, A.; de Carvalho, M.; Farias, L.; (2010) *Proteomic analysis of Escherichia coli with experimentally induced resistance to piperacillin/tazobactam*. Research in Microbiology 161: 268-275.

Dunny, G.; Brown, B.; Clewell, D.; (1978) *Induced cell aggregation and mating in Streptococcus faecalis: evidence for a bacterial sex pheromone*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 75, 3479-3483.

Eaton, T.; Gasson, M.; (2001) *Molecular Screening of Enterococcus Virulence Determinants and Potential for Genetic Exchange between Food and Medical Isolates*. Applied and Environmental Microbiology. 67(4): 1628–1635.

Expasy - <http://expasy.org/>

Findlay, G.; MacCoss, M.; Swanson, W.; (2009) *Proteomic discovery of previously unannotated, rapidly evolving seminal fluid genes in Drosophila*. Genome Research 19:886–896.

Fisher, K.; Phillips, C.; (2009) *The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus*. Microbiology 155, 1749–1757.

Flannagan, S.; Clewell, D.; (2002) *Identification and characterization of genes encoding sex pheromone cAM373 activity in Enterococcus faecalis and Staphylococcus aureus*. Molecular Microbiology 44(3): 803–817.

Fluit, A.; Schmitz, F.; (2004) *Resistance integrons and super-integrons*. Clin Microbiol Infect 10: 272–288.

Foulquié Moreno, M.; Sarantinopoulos, P.; Tsakalidou, E.; De Vuyst, L.; (2006) *The role and application of enterococci in food and health* International Journal of Food. Microbiology 106: 1 – 24.

Fracalanza, S.; Scheidegger, E.; dos Santos, P.; Leite, P.; Teixeira, L.; (2007) *Antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from poultry meat and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil*. Mem Inst Oswaldo Cruz 102(7): 853-859.

Frasher, J.; Laurent, T.; Laurent, U.; (1997) *Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover*. Journal of Internal Medicine. 242:27-33.

Freitas, A.; Tedim, A.; Novais, C.; Ruiz-Garbajosa, P.; Werner, G.; Laverde-Gomez, J.; Cantón, R.; Peixe, L.; Baquero, F.; Coque, T.; (2010) *Global spread of the hyl(Efm) colonization-virulence gene in megaplasmids of the Enterococcus faecium CC17 polyclonal subcluster*. Antimicrob Agents Chemother. 54(6):2660-5.

Galloway-Penã, J.; Bourgogne, A.; Qin, X.; Murray, B.; (2011) *Diversity of the fsr-geIE region of the Enterococcus faecalis genome but conservation in strains with partial deletions of the fsr operon*. Appl. Environ. Microbiol. 77(2): 442.

Gaspar, F.; Crespo, M.; Lopes, M.; (2009) *Proposal for a reliable enterococcal cytolysin production assay avoiding apparent incongruence between phenotype and genotype*. J Med Microbiol 58: 8 1122-1124.

Gelsomino, R.; Huys, G.; D'Haene, K.; Vancanneyt, M.; Cogan, T.; Franz, C.; Swings, J.; (2004) *Antibiotic resistance and virulence traits of enterococci isolated from Baylough, an Irish artisanal cheese*. J Food Prot. 67(9):1948-52.

Giard, J.; Laplace, J.; Rincé, A.; Pinchereau, V.; Benachour, A.; Leboeuf, C.; Flahaut, S.; Auffray, Y.; Hartke, A.; (2001) *The stress proteome of Enterococcus faecalis*. Electrophoresis. 22(14):2947-54.

Giraffa, G.; (2002) *Enterococci from foods*. FEMS Microbiology Reviews 26:163-171.

Gold, H.; (2001) *Vancomycin-Resistant Enterococci: Mechanisms and Clinical Observations*. Clinical Infectious Diseases 33:210–9.

Graves, P., Haystead, T., (2002) *Molecular Biologist's Guide To Proteomics*. Microbiology And Molecular Biology Reviews 66 (1): 39–63.

Gygi, S., Rochon, Y., Franza, B., Aebersold, R., (1999) *Correlation between protein and mRNA abundance in yeast*. Molecular Cell Biology, 19(3):1720-30.

Haas, W.; Shepard, B.; Gilmore, M.; (2002) *Two-component regulator of Enterococcus faecalis cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction*. Nature 415, 84-87

Hällgren, A.; Claesson, C.; Saeedi, B.; Monstein, H.; Hanberger, H.; Nilsson, L.; (2009) *Molecular detection of aggregation substance, enterococcal surface protein, and cytolysin genes and in vitro adhesion to urinary catheters of Enterococcus faecalis and E. faecium of clinical origin*. International Journal of Medical Microbiology 299:323 – 332.

Hardie, J.; Whiley, R.; (1997) *Classification and overview of the genera Streptococcus and Enterococcus*. Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement 83 1S-11S.

Harrington, D.; (1996) *Bacterial Collagenases and Collagen-Degrading Enzymes and Their Potential Role in Human Disease*. Infection and Immunity 64 (6):1885–1891.

Hébert, E.; Raya, R.; de Giori, G.; (2000) *Use of SDS-PAGE of cell-wall proteins for rapid differentiation of Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis and Lactobacillus helveticus*. Biotechnology Letters 22(12): 1003-1006.

Hegstad, K.; Mikalsen, T.; Coque, T.; Werner, G.; Sundsfjord, A.; (2010) *Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium*. Clin Microbiol Infect 16: 541–554.

Heikens, E.; Bonten, M.; Willems, R.; (2007) *Enterococcal Surface Protein Esp Is Important for Biofilm Formation of Enterococcus faecium E1162*. Journal of Bacteriology 189(22): 8233-8240.

Hynes, W.; Walton, S.; (2000) *Hyaluronidases of Gram-positive bacteria*. FEMS Microbiol Lett 183:201-207.

Igrejas, G., (2000) *Factores Genéticos, Bioquímicos e Tecnológicos associados à utilização do Trigo Mole (Triticum aestivum L.)*. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro - Tese de doutoramento, p 57.

Jett, B.; Huycke, M.; Gilmore, M.; (1994) *Virulence of Enterococci*. Clinical Microbiology Reviews 7(4): 462-478.

Kayaoglu, G.; Ørstavik, D.; (2004) *Virulence factors of Enterococcus faecalis: relationship to endodontic disease*. Crit Rev Oral Biol Med 15(5):308-320.

Khan, M.; van der Wal, M.; Farrell, D.; Cossins, L.; van Belkum, A.; Alaidan, A.; Hays, J.; (2008) *Analysis of VanA vancomycin-resistant Enterococcus faecium isolates from Saudi Arabian hospitals reveals the presence of clonal cluster 17 and two new Tn1546 lineage types*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 62, 279 – 283.

Kim, T.; Kim, Y.; Kim, S.; Lee, J.; Park, C.; Kim, H.; (2010) *Identification and Distribution of Bacillus Species in Doenjang by Whole-Cell Protein Patterns and 16S rRNA Gene Sequence Analysis*. J. Microbiol. Biotechnol. 20(8), 1210–1214.

Kim, W.; Silby, M.; Purvine, S.; Nicoll, J.; Hixson, K.; Monroe, M.; Nicora, C.; Lipton, M.; Levy, S.; (2009) *Proteomic Detection of Non-Annotated Protein-Coding Genes in Pseudomonas fluorescens Pf0-1*. PLoS ONE 4:12.

Klare, I.; Konstabel, C.; Mueller-Bertling, S.; Werner, G.; Strommenger, B.; Kettlitz, C.; Borgmann, S.; Schulte, B.; Jonas, D.; Serr, A.; Fahr, A.; Eigner, U.; Witte, W.; (2005) *Spread of ampicillin/vancomycin-resistant Enterococcus faecium of the epidemic–virulent clonal complex-17 carrying the genes esp and hyl in German hospitals*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases 24:815-825.

Klein, G.; (2003) *Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract*. International Journal of Food Microbiology 88:123 – 131.

Krishna, R., Wold, F. (1993) *Post-translational modification of proteins*. Adv. Enzymol. Relat. Areas Molecular Biology 67: 265–298.

Kumar A.; Schweizer, H.; (2005) *Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake*. Advanced Drug Delivery Reviews 57: 1486 – 151.

Laemmli, U., (1970) *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature 227: 680-685.

Leclercq, R.; Lebreton, F.; Cattior, V.; (2009) *Mechanisms of resistance to vancomycin*. ESCMID conference on Enterococci: from animal to man 2009; abstract, page 11.

Lee, W.; Kim, W.; (2003) *Identification of a novel insertion sequence in vanB2-containing Enterococcus faecium*. Letters in Applied Microbiology 36:186–190.

Lopes, M.; Simões, A.; Tenreiro, R.; Marques, J.; Crespo, M.; (2006) *Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci*. International Journal of Food Microbiology 112: 208 – 214.

Maddalo, G.; Chovanec, P.; Stenberg-Bruzell, F.; Nielsen, H.; Jensen-Seaman, M.; Ilag, L.; Kline, K.; Daley, C.; (2011) *A reference map of the membrane proteome of Enterococcus faecalis*. Proteomics. 11(19):3935–3941.

Mannu, L.; Paba, A.; Daga, E.; Comunian, R.; Zanetti, S.; Duprè, I.; Sechi, L.; (2003) *Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between Enterococcus faecium strains of dairy, animal and clinical origin*. International Journal of Food Microbiology 88: 291 – 304.

Marothi, Y.; Agnihotri, H.; Dubey, D.; (2005) *Enterococcal resistance – an overview*. Indian Journal of Medical Microbiology. 23 (4): 214-219.

Martin, B.; Garriga, M.; Hugas, M.; Aymerich, T.; (2005) *Genetic diversity and safety aspects of enterococci from slightly fermented sausages*. Journal of Applied Microbiology 98, 1177–1190.

Martzen M., McCraith, S., Spinelli, S., Torres, F., Fields, S., Grayhack, E., Phizicki, E., (1999) *A biochemical genomics approach for identifying genes by the activity of their products*. Science 286: 1153-5.

Mathur, S.; Singh, R.; (2005) *Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review*. International Journal of Food Microbiology 105: 281 – 295.

McGregor, E., Dunn, M., (2003) *Proteomics of heart disease*. Human Molecular Genetics Vol. 12:135-144.

Mendes, S.; Fernández-Gómez, M.; Galindo-Villardón, M.; Maranhão, P.; Azeiteiro, U.; Bacelar-Nicolau, P.; (2009) *The bacterioplankton dynamics in the Berlengas Archipelago (West coast of Portugal) studied using the HJ-biplot method*. Arquipélago. Life and Marine Sciences 26; 25-35.

Mohamed, J.; Murray, B.; (2005) *Lack of Correlation of Gelatinase Production and Biofilm Formation in a Large Collection of Enterococcus faecalis Isolates*. Journal of Clinical Microbiology 43(10): 5405–5407.

Moreillon, P. (2000). *Moyens de défense des bactéries*. Revue Médicale de la Suisse Romande 120, 641-650.

Mundy, L.; Sahm, D.; Gilmore, M.; (2000) *Relationships between Enterococcal Virulence and Antimicrobial Resistance*. Clinical Microbiology Reviews 13(4)513–522.

Nakayama, J.; Chen, S.; Oyama, N.; Nishiguchi, K.; Azab, E.; Tanaka, E.; Kariyama, R.; Sonomoto, K.; (2006) *Revised Model for Enterococcus faecalis fsr Quorum-Sensing System: the Small Open Reading Frame fsrD Encodes the Gelatinase Biosynthesis-Activating Pheromone Propeptide Corresponding to Staphylococcal AgrD*. Journal of Bacteriology 188(23): 8321-8326.

Nakayama, J.; Kariyama, R.; Kumon, H.; (2002) *Description of a 23.9-Kilobase chromosomal deletion containing a region encoding fsr genes which mainly determines the gelatinase-negative phenotype of clinical isolates of Enterococcus faecalis in urine*. Appl. Environ. Microbiol 68(6):3152.

O'Farrel, P. (1975) *High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins*. J. Biol. Chem. 250: 4007–4021.

Ogier, J.; Serror, P.; (2008) *Safety assessment of dairy microorganisms: The Enterococcus genus*. International Journal of Food Microbiology 126: 291 – 301.

Okamoto, A.; Yamada, K.; (2011) *Proteome driven re-evaluation and functional annotation of the Streptococcus pyogenes SF370 genome*. BMC Microbiology 11:249.

Onder, O.; Aygun-Sunar, S.; Selamoglu, N.; Daldal, F.; (2010) *A Glimpse into the Proteome of Phototrophic Bacterium Rhodobacter capsulatus*. Adv Exp Med Biol. 675: 179–209.

Palmer, K.; Kos, V.; Gilmore, M.; (2010) *Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance*. Current Opinion in Microbiology 13:632–639.

Panesso, D.; Montealegre, M.; Rincón, S.; Mojica, M.; Rice, L.; Singh, K.; Murray, B.; Arias, C.; (2011) *The hyl_{Efm} gene in pHyl_{Efm} of Enterococcus faecium is not required in pathogenesis of murine peritonitis*. BMC Microbiol. 11: 20.

Pangallo, D.; Drahovská, H.; Harichová, J.; Karelová, E.; Chovanová, K.; Ferianc, P.; Turná, J.; Timk, J.; (2008) *Assessment of environmental enterococci: bacterial antagonism, pathogenic capacity and antibiotic resistance*. Antonie van Leeuwenhoek 94:555–56.

Papa, M.; Perego, M.; (2011) *Enterococcus faecalis* virulence regulator FsrA binding to target promoters. J. Bacteriol. 193(7):1527-1532.

Park, S.; Kim, K.; Lee, J.; Seo, S.; Lee, I.; (2007) *Extracellular Gelatinase of Enterococcus faecalis Destroys a Defense System in Insect Hemolymph and Human Serum*. Infection and Immunity. 75(4): 1861–1869.

Pillai, S.; Sakoulas, G.; Gold, H.; Wennersten, C.; Eliopoulos, G.; Moellering, J.; Inouye, R.; (2002) *Prevalence of the fsr locus in Enterococcus faecalis infections*. Journal of Clinical Microbiology 40:2651-2652.

Pinto₁ L.; Poeta₁ P.; Vieira₁ S.; Caleja₁ C.; Radhouani₁ H.; Carvalho₁ C.; Vieira-Pinto₁ M.; Themudo₁ P.; Torres₁ C.; Vitorino₁ R.; Domingues₁ P.; Igrejas₁ G.; (2010) *Genomic and proteomic evaluation of antibiotic resistance in Salmonella strains*. J Proteomics. 73(8):1535-41.

Poeta, P.; (2006) *Resistência a Antibióticos, Factores de Virulência e Bacteriocinas em Estirpes Comensais de Enterococcus spp. de Animais e Humanos*. Dissertação de doutoramento. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

Poeta, P.; Costa, D.; Rojo-Bezares, B.; Zarazaga, M.; Klibi, N.; Rodrigues, J.; Torres, C.; (2007) *Detection of antimicrobial activities and bacteriocin structural genes in faecal enterococci of wild animals*. Microbiological Research 162 (3): 257-263.

Poeta, P.; Radhouani, H.; Igrejas, G.; Gonçalves, A.; Carvalho, C.; Rodrigues, J.; Vinué, L.; Somalo, S.; Torres, C.; (2008a) *Seagulls of the Berlengas natural reserve of Portugal as carriers of fecal Escherichia coli harbouring CTX-M and TEM extended-spectrum beta-lactamases*. Appl Environ Microbiol. 74(23): 7439–7441.

Poeta, P.; Costa, D.; Klibi, N.; Rodrigues, J.; Torres, C.; (2006) *Phenotypic and genotypic study of gelatinase and beta-haemolysis activities in faecal enterococci of poultry in Portugal*. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 53(5):203-8.

Poeta, P.; Igrejas, G.; Costa, D.; Sargo, R.; Rodrigues, J.; Torres, C.; (2008) *Virulence factors and bacteriocins in faecal enterococci of wild boars*. Journal of Basic Microbiology. 48(5):385-92.

Portenier, I.; Walimo, T.; Haapasalo, M.; (2003) *Enterococcus faecalis* – the root canal survivor and ‘star’ in post-treatment disease. Endodontic Topics 6: 135–159.

Qin, X.; Singh, K.; Weinstock, G.; Murray, B.; (2000) *Effects of Enterococcus faecalis fsr genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence*. Infection and Immunity. 68: 2579-2586.

Radhouani, H.; Igrejas, G.; Pinto, L.; Gonçalves, A.; Coelho, C.; Rodrigues, J.; Poeta, P.; (2011) *Molecular characterization of antibiotic resistance in enterococci recovered from seagulls (Larus cachinnans) representing an environmental health problem*. J. Environ. Monit. 13, 2227-2233.

Radhouani, H.; Poeta, P.; Igrejas, G.; Gonçalves, A.; Vinué, L.; Torres, C.; (2009) *Antimicrobial resistance and phylogenetic groups in isolates of Escherichia coli from seagulls at the Berlengas natural reserve*. Vet Rec. 165(5):138-42.

Radhouani, H.; Poeta, P.; Pinto, L.; Miranda, J.; Coelho, C.; Carvalho, C.; Rodrigues, J.; López, M.; Torres, C.; Vitorino, R.; Domingues, P.; Igrejas, G.; (2010) *Proteomic characterization of vanA-containing Enterococcus recovered from Seagulls at the Berlengas Nature Reserve, W Portugal*. Proteome Science, 8(1): 48.

Rehm, H., (2006) *Protein Biochemistry and Proteomics*. Elsevier Inc.

Ribeiro, T.; Pinto, V.; Gaspar, F.; Lopes, M.; (2008) *Enterococcus hirae causing wound infections in a hospital*. Journal of Chinese Clinical Medicine. 3(3):150-152.

Roberts, M.; (1998) *Antibiotic resistance mechanisms in bacteria of oral and upper respiratory origin*. International Journal of Antimicrobial Agents 9: 255 – 267.

Roe, M.; Pillai, S.; (2003) *Monitoring and Identifying Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria*. Poultry Science 82:622–626.

Sáenz, Y.; (2004) *Caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia a antibióticos en cepas de Escherichia coli no patógenas de alimentos y de la microflora intestinal de humanos y animales*. Dissertação de Doutoramento na área de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade de La Rioja.

Sannomiya, P.; Craig, R.; Clewell, D.; Suzuki, A.; Fujino, M.; Till, G.; Marasco, W.; (1990) *Characterization of a class of nonformylated Enterococcus faecalis-derived neutrophil chemotactic peptides: The sex pheromones*, Proc. Natl. Acad. Sci. 87 66–70.

Santos, P., Teixeira, M., Sá-Correia, I., (2004) *A Análise Proteómica Quantitativa na Revelação de Mecanismos de Resposta a stresse químico em microrganismos*. Boletim de Biotecnologia p.7-17.

Scherl, A.; François, P.; Charbonnier, Y.; Deshusses, J.; Koessler, T.; Huyghe, A.; Bento, M.; Stahl-Zeng, J.; Fischer, A.; Masselot, A.; Vaezzadeh, A.; Gallé, F.; Renzoni, A.; Vaudaux, P.; Lew, D.; Zimmermann-Ivol, C.; Binz, P.; Sanchez, J.; Hochstrasser, D.; Schrenzel, J.; (2006) *Exploring glycopeptide-resistance in Staphylococcus aureus: a combined proteomics and transcriptomics approach for the identification of resistance-related markers*. BMC Genomics 7:296.

Schleifer, K.; Kilpper-Bälz, R.; (1984) *Transfer of Streptococcus faecalis and Streptococcus faecium to the genus Enterococcus nom. rev. as Enterococcus faecalis comb. nov. and Enterococcus faecium com. nov.* International Journal of Systematic Bacteriology 34:31-34.

Schmid, M.; (2006) *Do targets limit antibiotic discovery?* Nature Biotechnology 24: 419-420.

Schwarz, F.; Perreten, V.; Teuber, M.; (2001) *Sequence of the 50-kb Conjugative Multiresistance Plasmid pRE25 from Enterococcus faecalis RE25*. Plasmid 46(3):170-187.

Sefton, A.; (2002). *Mechanisms of antimicrobial resistance: their clinical relevance in the new millennium*. Drugs 62, 557-566.

Semedo, T.; Santos, M.; Lopes, M.; Marques, J.; Crespo, M.; Tenreiro, R.; (2003) *Virulence factors in food, clinical and reference Enterococci: A common trait in the genus?* Systematic and Applied Microbiology 26:13-22.

Semedo, T.; Santos, M.; Martins, P.; Lopes, M.; Marques, J.; Tenreiro, R.; Crespo, M.; (2003a) *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 (6): 2569-2576.

Shankar, N.; Coburn, P.; Pillar, C.; Haas, W.; Gilmore, M.; (2004) *Enterococcal cytolysin: activities and association with other virulence traits in a pathogenicity island*. Int. J. Med. Microbiol. 293: 609-618.

Shermand, J.; (1937) *The streptococci*. Bacteriological Reviews 1:3-97.

Sievert, D.; Rudrik, J.; Patel, J.; McDonald, L.; Wilkins, M.; Hageman, J.; (2008) *Vancomycin-resistant, Staphylococcus aureus in the United States, 2002–2006*. Clin Infect Dis. 46:668-674

Silva, N.; Igrejas, G.; Vaz, J.; Araújo, C.; Cardoso, L.; Rodrigues, J.; Torres, C.; Poeta, P.; (2011) *Virulence Factors in Enterococci from Partridges (Alectoris rufa) Representing a Food Safety Problem*. Foodborne Pathogens and Disease. 8(7): 831-833.

Singh, K.; Nallapareddy, S.; Sillanpää, J.; Murray, B.; (2010) *Importance of the Collagen Adhesin Ace in Pathogenesis and Protection against Enterococcus faecalis Experimental Endocarditis*. PLoS Pathog 6(1).

Stokes, H.; Hall, R.; (1989) *A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene integration functions: integrons*. Mol. Microbiol 3:1669-1683.

Tendolkar, P.; Baghdayan, A.; Shankar, N.; (2003) *Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century*. Cell. Mol. Life Sci. 60: 2622 – 2636.

Thiercelin, M.; (1899) *Morphologie et modes de reproduction de l'enterocoque*. Compt. rend. soc. biol. 51, 55.

Thiercelin, M.; Jouhaud, L.; (1903) *Reproduction de l'entérocoque; taches centrales; granulations périphériques et microblastes*. C.R. Séances Société Biologie 55: 686–688.

Todd, E.; (1934) *A comparative serological study of streptolysins derived from human and from animal infections, with notes on pneumococcal hemolysin, tetanolysin, and staphylococcus toxin*. J. Pathol. Bacteriol. 39: 299-321.

Toledo-Arana, A.; Valle, J.; Solano, C.; Arrizubieta, M.; Cucarella, C.; Lamata, M.; Amorena, B.; Leiva, J.; Penade, J.; Lasa, I.; (2001) *The Enterococcal Surface Protein, Esp, Is Involved in Enterococcus faecalis Biofilm Formation*. Applied and Environmental Microbiology 67(10): 4538–4545.

Treitman, A.; Yarnold, P.; Warren, J.; Noskin, G.; (2005) *Emerging incidence of Enterococcus faecium among hospital isolates (1993 to 2002)*. J Clin Microbiol 43, 462–463.

Trivedi, K.; Cupakova, S.; Karpiskova, R.; (2011) *Virulence factors and antibiotic resistance in enterococci isolated from food-stuffs*. Veterinarni Medicina 56(7):352–357.

Upadhyaya, P.; Ravikumar, K.; Umapathy, B.; (2009) *Review of virulence factors of enterococcus: an emerging nosocomial pathogen*. Indian Journal of Medical Microbiology 27(4): 301-5.

Uttley, A.; George, R.; Naidoo, J.; Woodford, N.; Johnson, A.; Collins, C.; Morrison, D.; Gilfillan, A.; Fitch, L.; Heptonstall, J.; (1989) *High-level vancomycin-resistant enterococci causing hospital infections*. Epidemiol Infect 103:173–81.

Vankerckhoven, V.; Autgaerden, T.; Vael, C.; Lammens, C.; Chapelle, S.; Rossi, R.; Jabes, D.; Goossens, H.; (2004) *Development of a Multiplex PCR for the Detection of asa1, gelE, cylA, esp, and hyl Genes in Enterococci and Survey for Virulence Determinants among European Hospital Isolates of Enterococcus faecium*. J. Clin. Microbiol. 42(10): 4473-4479.

Vihinen, M., (2001) *Bioinformatics in proteomics - Biomolecular Engineering* 18: 241–248.

Wang, X.; He, X.; Jiang, Z.; Wang, J.; Chen, X.; Liu, D.; Wang, F.; Guo, Y.; Zhao, J.; Liu, F.; Huang, L.; Yuan, J.; (2010) *Proteomic Analysis of the Enterococcus faecalis V583 Strain and Clinical Isolate V309 under Vancomycin Treatment*. Journal of Proteome Research. 9, 1772–1785

Wang, X.; Huycke, M.; (2007) *Extracellular Superoxide Production by Enterococcus faecalis Promotes Chromosomal Instability in Mammalian Cells*. Gastroenterology 132:551–561.

Wardal, E.; Sadowy, E.; Hryniewicz, W.; (2010) *Complex nature of enterococcal pheromone-responsive plasmids*. Polish Journal of Microbiology 59(2): 79-87.

Wenzel, R.; Edmond, M.; (2001) *Managing antibiotic resistance*. N.Engl. J. Med. 343: 1961-1962.

Westermeier, R., Naven, T., (2002) *Proteomics in practise: A Laboratory Manual for Proteome Analysis*. Wiley-VHC.

Whitman, R.; Przybyla-Kelly, K.; Shively, D.; Byappanahalli, M.; (2007) *Incidence of the enterococcal surface protein (esp) gene in human and animal fecal sources*. Environ Sci Technol. 41(17):6090-5.

Wilkins, M., Sanchez, J., Gooley, A., Appel, R., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D., Williams, K., (1995) *Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it*. Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 13:19–50.

Wouters, B., (2008) *Proteomics: Methodologies and Applications in Oncology*. PhD Semin Radiat Oncol, 18:115-125.

Wu, H.; Wang, A.; Jennings, M.; (2008) Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology* 12:1–9.

Yésou, P.; Beaubrun, P.; (1995) *Le Goéland Leucopnée Larus cachinnans*. SOF, Paris p. 328–329

Yun, S.; Choi, C.; Park, S.; Lee, J.; Leem, S.; Choi, J.; Kim, S.; Kim, S.; (2008) *Proteomic Analysis of Outer Membrane Proteins from Acinetobacter baumannii DU202 in Tetracycline Stress Condition*. *The Journal of Microbiology* 46(6):720-727.

Zheng, B.; Tomita, H.; Inoue, T.; Ike, Y.; (2009) *Isolation of VanB-type Enterococcus faecalis strains from nosocomial infections: first report of the isolation and identification of the pheromone-responsive plasmids pMG2200, encoding VanB-type vancomycin resistance and a Bac41-type bacteriocin, and pMG2201, encoding erythromycin resistance and cytolysin (Hly/Bac)*. *Antimicrob Agents Chemother*. 53:735-747.

Zou, L.; Wang, H.; Zeng, B.; Li, J.; Li, X.; Zhang, A.; Zhou, Y.; Yang, X.; Xu, C.; Xia, Q.; (2011) *Erythromycin resistance and virulence genes in Enterococcus faecalis from swine in China*. *New Microbiologica* 34, 73-80.

Anexos

Anexo 1 - Meios de cultura utilizados

- Brain-Heart-Infusion (BHI) (Difco) – Meio não selectivo para o crescimento de bactérias:
 - Cérebro de vitelo..... 7,7g
 - Coração de vaca..... 9,8g
 - Bacto protease peptona..... 10g
 - Bacto dextrose.....2g
 - Cloreto de sódio..... 5g
 - Fosfato disódico.....2,5g
 - Agar (juntar caso pretenda um meio sólido)...15g

- Meio de leite desidratado (Difco) – Para estudar a actividade da gelatinase.
 - 1,5% para juntar a Tryptic Soy Agar (TSA)

- Agar Columbia agar com 5% de sangue de cavalo (BioMérieux) – Utilizado para verificar o tipo de hemólise.
 - Substrato nutritivo especial.....23g
 - Amido.....1g
 - Cloreto de sódio..... 5g
 - Agar.....13g
 - 5% de sangue de cavalo.