

## **Factores de virulencia presentes en estirpes bacterianas del género *Enterococcus* aisladas en el litoral de Fortaleza (Ceará, Brasil)**

### ***VIRULENCE FACTORS PRESENT IN BACTERIAL STRAINS OF THE ENTEROCOCCUS GENUS ISOLATED ON THE FORTALEZA COAST (CEARÁ, BRAZIL)***

Marina Teresa TORRES RODRÍGUEZ<sup>1</sup>, Adson PINHEIRO QUEIROZ VIANA<sup>1</sup>, Francisca GLEIRE RODRIGUES DE MENESES<sup>2</sup>, Regine Helena SILVA DO FERNANDES VIEIRA<sup>1</sup>, Oscarina VIANA DE SOUSA<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Laboratório de Microbiologia Ambiental y do Pescado (LAMAP). Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR), Universidade Federal do Ceará (UFC). Avenida Abolição No. 3207, Meireles – CEP: 60165-08, Fortaleza, Ceará, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Engenharia de Pesca- Bloco 823, Universidade Federal do Ceará (UFC). Avenida Mister Hull, s/n – Pici. CEP: 60455-760, Fortaleza, Ceará, Brasil.

*Correspondencia:* Marina T. Torres. Correo-e: marinatorresrodriguesm@gmail.com

#### **RESUMEN**

Las bacterias del género *Enterococcus* son caracterizadas por su complejidad al poseer una alta tolerancia para crecer frente a condiciones adversas del ambiente. El arsenal de patogenicidad de las bacterias enterocóccicas y el origen genético de los genes relacionados a su expresión son variados, por lo que su potencial patogénico no puede ser definido solamente por su resistencia a los antimicrobianos sino también por los factores de virulencia que expresan. El objetivo de este trabajo fue detectar la expresión fenotípica de diferentes factores de virulencia en bacterias del género *Enterococcus* pertenecientes a la bacterioteca del Laboratorio de Microbiología Ambiental y del Pescado (LAMAP), del Instituto de Ciencias del Mar (LABOMAR) de la Universidad Federal de Ceará, Brasil. Fueron seleccionadas 44 estirpes bacterianas aisladas de ambiente acuático. Los siguientes factores de virulencia fueron analizados: biofilm, gelatinasa, factor de agregación y producción de hemolisinas. De las 44 estirpes analizadas, aproximadamente el 59.09% presentó respuesta positiva frente a la gelatina, 97.72% fue capaz de producir biofilm, cerca del 7% presentó algún grado de agregación en vidrio y ninguna estirpe presentó hemólisis total. Fueron evidenciados 7 perfiles de virulencia resultando la formación de biofilm el perfil de mayor frecuencia (solo o combinado). La presencia de factores de virulencia en estirpes bacterianas del género *Enterococcus* en el litoral de Fortaleza destaca la importancia de su detección para la vigilancia y control del ambiente y su posible asociación con el riesgo a la salud humana.

**Palabras clave:** *Enterococcus*, agregación, gelatinasa, biofilm, hemólisis, virulencia.

#### **ABSTRACT**

*Enterococcus* genus bacteria are characterized by their complexity by having a high tolerance to grow against adverse environmental conditions. The pathogenic arsenal of enterococcal bacteria and the genetic origin of the genes related to their expression are varied, so their pathogenic potential can not only be defined by their resistance to antimicrobials but also by the virulence factors they express. The objective of this work was to detect phenotypic expression of different virulence factors in bacteria of the *Enterococcus* genus belonging to the bacteriotech of the Laboratory of Environmental and Fish Microbiology (LAMAP), of the Institute of Marine Sciences (LABOMAR) of the Federal University of Ceará, Brazil. 44 bacterial strains isolated from aquatic

environment were selected. The following virulence factors were evaluated: gelatinase, aggregation factor, hemolysin and biofilm production. Of the 44 strains analyzed, approximately 59.09% presented a positive response to gelatin, 97.72% were able to produce biofilm, about 7% had some degree of aggregation in glass and no lineage presented total hemolysis. Seven virulence profiles were evidenced. Biofilm formation was the highest frequency profile (alone or combined). The presence of virulence factors in bacterial strains of the genus *Enterococcus* on the coast of Fortaleza highlights the importance of its detection for the surveillance and control of the environment and its possible association with the risk to human health.

**Keywords:** *Enterococcus*, aggregation, gelatinase, biofilm, hemolysis, virulence.

## INTRODUCCIÓN

Los enterococos son bacterias que habitan el tracto intestinal de humanos, animales y han sido aislados de diferentes fuentes ambientales. Su capacidad de sobrevivir a condiciones de estrés ambiental y en ambiente hostil los capacita para colonizar diferentes nichos ecológicos (Fisher y Phillips, 2009). Actualmente, ese género presenta, según la colección germánica de microorganismos (DSMZ), 67 especies conocidas incluyendo dos sub-especies pertenecientes a ese género (DSMZ, 2020).

Por su persistencia en el ambiente y su ubicuidad en el intestino humano, este grupo bacteriano ha sido utilizado como indicador fecal de contaminación humana en aguas (Boehm, 2014), por lo que bacterias del género *Enterococcus* han sido utilizadas como valiosas y confiables herramientas para evaluar la calidad sanitaria del agua recreacional en varias partes del mundo (Abualtayef *et al.*, 2014; Alipour *et al.*, 2014; Hamzah *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2008).

Aunque los enterococos habitan como comensales en el tracto gastrointestinal de animales de sangre caliente, determinadas condiciones pueden permitir que estos organismos invadan regiones extra intestinales y causen infecciones (Upadhyaya *et al.*, 2009).

La ruptura del equilibrio en el ecosistema del intestino se produce cuando los patógenos intestinales utilizan sus factores de virulencia específicos o aprovechan el uso inadecuado o en exceso de antibióticos para su propio beneficio y de esta forma, contrarrestan el efecto de la resistencia a la colonización por parte de la microbiota del tracto intestinal (Lawley y Walker, 2012). Generalmente las bacterias del género *Enterococcus* poseen bajos niveles de virulencia lo que es evidenciado por ser colonizadores naturales del tracto gastrointestinal y ser utilizados durante décadas como probióticos tanto en el hombre como en los animales (Arias y Murray, 2012).

Entretanto, semejante a otros grupos, la patogenia de bacterias del género *Enterococcus* no puede ser explicada solamente por la resistencia a los antimicrobianos (Toledo-Arana, 2001), por lo que de esta forma, el presente trabajo tiene como objetivo detectar la presencia de diferentes factores de virulencia en bacterias del género *Enterococcus* aisladas del litoral de Fortaleza con vistas a conocer el potencial patogénico de las estirpes para su evaluación y control en el ambiente.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Selección de las estirpes analizadas

Fueron seleccionadas 44 estirpes bacterianas del género *Enterococcus* todas pertenecientes a la bacterioteca Regine Vieira, del Laboratorio de Microbiología Ambiental y del Pescado (LAMAP), Universidad Federal de Ceará, Brasil. Las estirpes fueron aisladas de galerías pluviales y puntos de mar adyacentes en el litoral de Fortaleza, Ceará, Brasil.

### Confirmación de la pureza de las estirpes

Las estirpes fueron inoculadas en caldo de infusión cerebro corazón (BHI, sigla en inglés-Difco) e incubadas en estufa bacteriológica a 37°C/24h. Después de este período, fue verificado el crecimiento bacteriano de acuerdo con la turbidez del medio.

Los tubos con crecimiento, fueron replicados en placas de medio selectivo (*m-Enterococcus*, Difco) e incubadas en estufa bacteriológica 37°C/48h. Después de este período, las colonias características del género *Enterococcus* fueron seleccionadas e inoculadas en medio Agar Brain Heart Infusion (Agar BHI, Difco) para la posterior confirmación de las características del género: cocos gram positivos, agrupados en pares o en cadenas cortas, catalasa negativa, hidrólisis de la esculina, crecimiento en caldo BHI a 45°C por 24 horas y en presencia de 6,5% de NaCl (Manero y Blanch, 1999).

### Hemolisinas

Placas de Agar BHI suplementado con 5% de hemáties de carnero fueron inoculadas e incubadas a 35°C/18-24h. Las estirpes que produjeron  $\beta$ -hemólisis (halo transparente alrededor del crecimiento bacteriano) fueron consideradas positivas para la producción de hemolisinas (Eaton y Gasson, 2001).

### Gelatinasa

Caldo BHI suplementado con 4% de gelatina fue inoculado e incubado por 35°C/48h. Después de este período, los tubos fueron retirados de la incubadora y colocados en agua con hielo por 30 minutos para alcanzar temperaturas por debajo de 28°C (punto de fusión de la gelatina). Después de ese tiempo, fue

tomado como criterio de positividad la forma líquida de la gelatina (Claus, 1989).

### Producción de biofilm

Fueron inoculadas placas con Agar Rojo Congo (RC), caldo BHI suplementado con 0,08% del colorante Rojo Congo (Sigma) y 5% de sacarosa (Sigma) (Freeman *et al.*, 1989). Las placas de Agar RC fueron inoculadas e incubadas a 35°C/24h seguido de incubación a temperatura ambiente por 48h. Fue utilizada una estirpe de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25 923) como control positivo. La producción de colonias rugosas de coloración prieta fue indicativa de positividad de la prueba. Fue considerado un resultado negativo la presencia de colonias rojas o blancas.

### Substancia de agregación (Agg)

Las estirpes evaluadas fueron cultivadas en triplicado en 5 mL de caldo BHI (Difco) a 35°C/24h. Después de ese periodo de incubación, el contenido de los tubos fue descartado y la superficie interna de los tubos fue lavada 3 veces con agua destilada estéril. Los tubos fueron colocados de forma invertida para su secado y una vez secos, fue adicionada una solución de safranina a 0,1% por 1 minuto. Una vez realizado el descarte del contenido de los tubos y el secado, fue realizada la lectura. La presencia de una masa adherente en el interior de los tubos fue considerada como agregación positiva (Christensen *et al.*, 1982).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las estirpes analizadas, 100% presentaron características propias del género *Enterococcus*.

En relación a la expresión de los factores de virulencia, se observaron diferencias en las estirpes evaluadas.

De las 44 estirpes evaluadas, 43 (97,72%) fueron capaces de formar biofilm. Aproximadamente el 7% de las estirpes presentó respuesta positiva frente a la prueba de agregación. Solo una estirpe no presentó ningún tipo de respuesta frente a los factores de virulencia analizados. Ninguna de las estirpes produjo hemólisis total ( $\beta$ -hemólisis) en agar sangre obteniendo solo hemólisis parcial en el 25% de las cepas evaluadas (Tabla 1).

Un factor de virulencia no es más que un efector que eleva la capacidad de provocar enfermedades más allá de la propia esencia de una especie (Mundy *et al.*, 2000). Diferentes factores de virulencia han sido identificados en estirpes de *Enterococcus* aisladas de diferentes fuentes (Kandričáková *et al.*, 2015; Golinska *et al.*, 2013; Lata *et al.*, 2009;).

La adquisición de factores de virulencia por parte de las bacterias favorece su competencia en ambientes adversos (Pereira *et al.*, 2017).

La formación de biofilm depende de múltiples factores ambientales y genéticos y consiste de una población celular unida irreversiblemente sobre varias superficies bióticas y abióticas, recubiertas por una matriz hidratada de sustancias exopoliméricas (Hashem *et al.*, 2017; Mohamed, 2007).

**Tabla 1.** Porcentaje de estirpes del género *Enterococcus* con resultados positivos por factor de virulencia evaluado.

Factor de virulencia	Nº de estirpes evaluadas	Nº de estirpes positivas (%)
Biofilm	44	43 (97,72)
Gelatinasa	44	26 (59,09)
Agregación	44	3 (6,81%)
Hemolisinas / citolisinas	44	0

La capacidad de producir biofilm como factor de virulencia ha sido estudiada tanto en patógenos gram negativos (*Salmonella* - Borges *et al.*, 2018; *Pseudomonas* - Campuzano *et al.*, 2018; *E.coli* - Lima *et al.*, 2015); como en gram positivos (*Streptococcus mutans* - Yang *et al.*, 2019; *Bacillus* - Ryan-Payseur y Freitag, 2018; *Staphylococcus aureus* - Singh *et al.*, 2017). Al igual que con otros patógenos gram positivos, la capacidad de producir biofilm en bacterias del género *Enterococcus* ha sido evidenciada en diferentes estudios (Popović *et al.*, 2018; Comerlato *et al.*, 2013; Barbosa *et al.*, 2010).

Similar a los resultados observados en nuestro estudio en el que fue detectado un 97,7% de las estirpes estudiadas productoras de biofilm, Marinho *et al.* (2013) en Brasil, detectaron resultados similares y alarmantes en relación a la formación de biofilm para enterococos procedentes de alimentos (vegetales, carnes y productos lácteos),

La gelatinasa es una proteasa capaz de hidrolizar gelatina, colágeno, caseína y otros péptidos (Kreft *et al.*, 1992). Importante destacar que aún presente el gen *gelE* situado en el cromosoma bacteriano y que codifica para la gelatinasa (Chajacka-Wierzchowska *et al.*, 2017) no se asegura su expresión fenotípica, lo que ha sido confirmado en diferentes estudios en estirpes de origen clínico (Kashef *et al.*, 2017; Comerlato *et al.*, 2013; Camargo *et al.*, 2008), y ambiental (Anderson *et al.*, 2016; Barbosa *et al.*, 2010; Abriouel *et al.*, 2008).

En nuestro estudio más del 50% de las estirpes estudiadas presentó fenotipo gelatinasa positiva. Molale y Bezuidenhout (2016) reportaron actividad gelatinasa en *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* (entre siete especies de este género estudiadas), procedentes de cinco sistemas de agua

superficial en Sur Africa. También Dada *et al.* (2012) en el estudio de estirpes bacterianas del género *Enterococcus* procedentes de aguas de playa detectaron actividad gelatinasa positiva en las estirpes evaluadas (*E. faecium* y *Enterococcus* spp.).

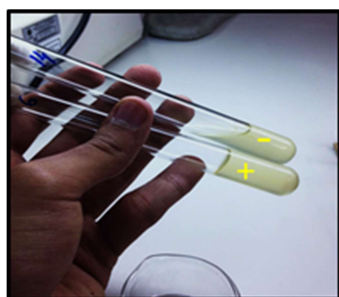
La sustancia de agregación (SA) es una proteína asociada a la pared celular que facilita la transferencia de material genético entre células donantes y receptoras por medio del contacto eficiente entre las mismas (Schell, 2014).

En el presente trabajo, la agregación fue observada solo en el 6% de las estirpes evaluadas. Gülhan *et al.*, (2006) estudiaron los factores de virulencia de *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis* en humanos y animales domésticos (perros y gatos). Los autores reportaron valores para *Enterococcus faecium* en humanos de 27.1% y de 1.6% y 11,1% para perros y gatos ya para *Enterococcus faecalis* se reportaron valores de 37.5% para humanos y de 6.7% para perros no observándose resultados positivos para gatos.

Por otra parte, las hemolisinas son proteínas citolíticas capaces de hidrolizar los eritrocitos humanos, de caballo y conejo, teniendo un rol importante en la primera etapa de la infección (penetración bacteriana en los tejidos del huésped, toxemia, así como ocasiona cierto daño tisular) (Upadhyaya *et al.*, 2009).

En Polonia, Stępień-Pyśniak *et al.* (2019) estudiaron la presencia de diferentes factores de virulencia (actividad gelatinasa, hemolítica y formación de biofilm) y genes de virulencia de especies de enterococos aislados de pájaros silvestres. Al igual que en nuestro estudio, no fue detectada actividad hemolítica en ninguna de las estirpes analizadas.

En las figuras 1 a 4 pueden ser observados los resultados en las diferentes pruebas de gelatinasa, citolisina/hemolisina, agregación en vidrio y producción de biofilm.

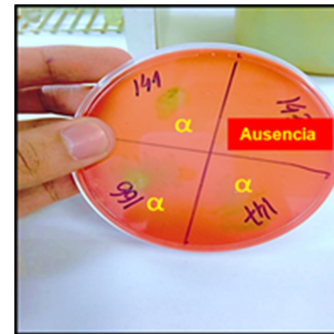


**Figura 1.** Producción de gelatinasa en caldo BHI con 4% de gelatina.

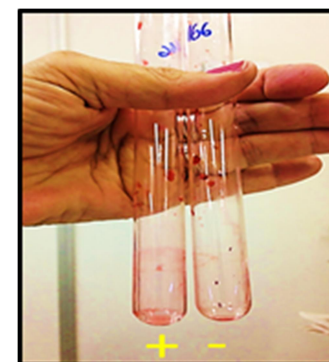
En este estudio, diferencias en la frecuencia de aparición de los factores de virulencia (solos o combinados) resultaron en diferentes perfiles de virulencia (7) mostrados por las estirpes evaluadas (Figura 5).

En nuestro estudio el mayor número de estirpes (43) presentaron resultados positivos para la forma-

ción de biofilm por lo que resultó el perfil que solo (BF= 36.36%) o combinado (con otro factor de virulencia – BF+Gel= 54.54%, BF+Gel+Agg= 4.54% y BF+Agg= 2.27%) presentó la mayor frecuencia de aparición (97,7%). Medeiros *et al.*, (2014) encontraron resultados similares (100%) en estirpes del género *Enterococcus* formadoras de biofilm de origen clínica y 94.5% de estirpes procedentes de alimentos (55) en Puerto Alegre, Brasil.



**Figura 2.** Hemólisis parcial y ausencia de hemólisis total en Agar BHI suplementado con 5% de hemáties de carnero.

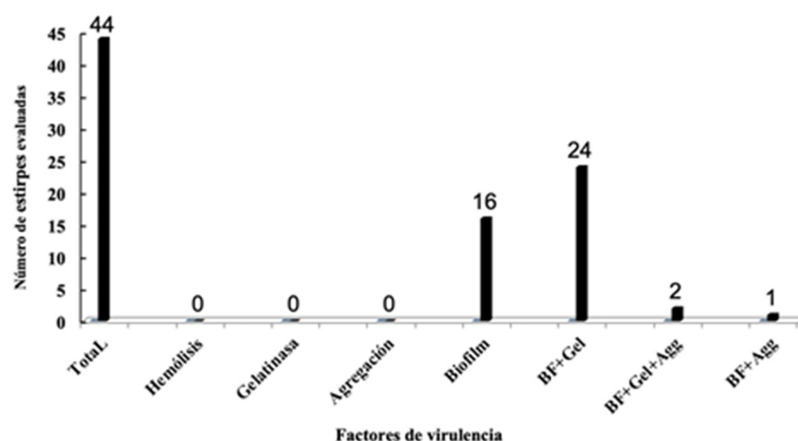


**Figura 3.** Agregación en vidrio.



**Figura 4.** Producción de biofilm en agar Rojo Congo.

El estudio de la formación de biofilm en bacterias del género *Enterococcus* cobra vital importancia debido a su importante papel en la transmisión de



**Figura 5.** Perfiles de virulencia de las diferentes estirpes de *Enterococcus* aisladas de aguas de galería y de mar, litoral de Fortaleza, Ceará, Brasil. BF: Biofilm; Gel: Gelatinasa; Agg: Agregación en vidrio

elementos genéticos, en la resistencia antibiótica y en la recurrencia de la infección (Soltani *et al.*, 2018; Fisher y Phillips, 2009).

Cassenege *et al.* (2013) en Brasil, observaron que *E. faecalis* aislados de pollos tratados con anticoccidiano mostraban mayor frecuencia de aparición de genes de virulencia y de perfiles de fuertes formadores de biofilm indicando la adaptabilidad de esta especie en el intestino de individuos saludables.

Comparando nuestros resultados con los encontrados en estirpes procedentes de muestras ambientales, Ahmad *et al.* (2014) realizaron un estudio de formadores de biofilm y determinantes de virulencia en 46 estirpes de género *Enterococcus*, 20 estirpes procedentes de agua de playa y 26 procedentes de arena de playa. Fue encontrada la más alta proporción de productores de biofilm (61.54%) en estirpes aisladas de arena en comparación con las estirpes procedentes de agua de mar (30%). Los autores encontraron propiedades de virulencia en ambas fuentes ambientales estudiadas basadas principalmente en la presencia del gen gelatinasa.

Dentro de los productores de biofilm, la gelatinasa fue el factor que combinado (BF-Gel = 24 y BF-Gel-Agg = 2), resultó el de mayor frecuencia de aparición entre las estirpes evaluadas.

En concordancia con el presente trabajo, Dada *et al.* (2012), estudiaron estirpes procedentes de aguas de la playa de Port Dickson en Malasia, reportando actividad gelatinasa entre las estirpes evaluadas, principalmente en *Enterococcus faecium* (69.23%). Los resultados encontrados por estos autores concuerdan con los de Franz *et al.* (2001) en alimentos y Creti *et al.* (2004) en muestras clínicas y ambientales.

Dada *et al.* (2013), estudiaron la resistencia a aminoglicósidos y las características de virulencia de estirpes enterocócicas aisladas de ambiente recreacional (playa) en Malasia. Los autores no detectaron actividad  $\beta$ -hemolítica entre las estirpes evaluadas

cuando utilizaron agar suplementado con hemáties de carnero. Resultados similares fueron detectados en nuestro estudio.

Por otra parte el factor de agregación fue detectado siempre combinado (BF-Gel-Agg = 2 y BF-Agg = 1). Es importante resaltar la detección de este factor en enterococos de origen ambiental debido a que esta sustancia media la formación de agregados bacterianos, promoviendo así la transferencia de plásmidos y la adhesión al tejido expuesto y dañado, favoreciendo así, la acción invasiva del patógeno

bacteriano (Rozdzinski *et al.*, 2001).

En el presente estudio fue detectada la presencia de factores de virulencia con la expresión fenotípica de la gelatinasa y sustancia de agregación que han sido implicados en la agregación celular y la formación de biofilme (Camargo *et al.*, 2008).

La alta frecuencia de aparición en relación a la formación de biofilm unida a la producción de gelatinasa y sustancia de agregación son factores de virulencia que contribuyen a la sobrevivencia, diseminación y persistencia de enterococos aislados del ambiente (Betancourth *et al.*, 2004).

## CONCLUSIONES

Fue demostrada la presencia de factores de virulencia tales como formación de biofilm, gelatinas y agregación en estirpes bacterianas del género *Enterococcus* aisladas de ambiente acuático, destacándose la importancia de su estudio para la vigilancia y control del ambiente y su posible asociación con el riesgo a la salud humana.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abriouel, H.; Omar, N.B.; Molinos, A.C.; López, R.L.; Grande, Ma.J.; Martínez-Viedma, P *et al.* Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. *International Journal of Food Microbiology* 2008; 123: 38-49.
- Abualtayef, M.T.; Fattahn, A.; Rabou, A.B.D.; Abu Foul, A.A.; Ghabayen, S.M.; Elsinwa, H.M. Microbial water quality of coastal recreational water in the Gaza Strip, Palestine. *Bioscience* 2014; 6: 26-32.
- Ahmad, A.; Dada, A.C.; Gires, U. Biofilm

- Formation, *gel* and *esp* Gene Carriage among Recreational Beach Enterococci. *Global Journal of Health Science* 2014; 6: 241-252.
- Alipour, M.; Hajiesmaili, R.; Talebjannat, M.; Yahyapour, Y. Identification and Antimicrobial Resistance of *Enterococcus* Spp. Isolated from the River and Coastal Waters in Northern Iran. *The Scientific World Journal* 2014; 2014: 1-5.
- Anderson, A.C.; Jonas, D.; Huber, I.; Karygianni, L.; Wolber, J.; Helling, E.; Arweiler, N.; Vach, K.; Wittmer, A.; Al-Ahmad, A. *Enterococcus faecalis* from Food, Clinical Specimens, and Oral Sites: Prevalence of Virulence Factors in Association with Biofilm Formation. *Frontiers in Microbiology* 2016; 6: 14 p.
- Arias, C. A.; Murray, B. E. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nature Reviews Microbiology* 2012; 10: 266 – 278.
- Barbosa, J.; Gibbs, P.A.; Teixeira, P. Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in the North of Portugal. *Food Control* 2010; 21: 651-656.
- Betancourth, M.; Botero, J.E.; Rivera, S.P. Biopelículas: una comunidad microscópica en desarrollo. *Colombia Médica* 2004; 35: 34-39.
- Boehm A.B.; Sassoubre L.M. Enterococci as indicators of environmental fecal contamination. *In*: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, et al., editors. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190421/>
- Borges, K.A.; Furian, T.Q.; Souza, S.N.; Menezes, R.; Tondo, E.C.; Salle, C.T.P *et al.* Biofilm formation capacity of *Salmonella* serotypes at different temperature conditions. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 2018; 38: 71-76.
- Camargo, I.L.B.C.; Zanella, R.C.; Gilmore, M.S.; Darini, A.L.C. Virulence factors in vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus faecalis* from Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 2008; 39: 273-278.
- Campuzano, S.; Jiménez, L.; Hernández, D.M. La formación de biopelículas y la calidad del agua en la consulta odontológica. *NOVA* 2018; 16: 39-49.
- Cassenege, A.P.V.; Ellwanger, J.; d’Azevedo, P.A.; Ribeiro, A.M.L.; Frazzon, J.; Frazzon, A.P.G. Virulência e formação de biofilme microbiano por *Enterococcus faecalis* isolados de swabs cloacais de frangos de corte infectados com *Eimeria* spp. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 2013; 33: 1433-1440.
- Chajacka-Wierzchowska, W.; Zadernowska, A.; Łaniewska-Trokenheim, L. Virulence factors of *Enterococcus* spp. presented in food. *Food Science and Technology* 2017; 75: 670-676.
- Christensen, G. D.; Simpson, W. A.; Bisno, A. L.; Beachey, E. H. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infectious and Immunity* 1982; 37: 318-326.
- Claus, G. W. *Understanding Microbes: A Laboratory Textbook for Microbiology*. New York. W. H. FREEMAN. 1989; 250 – 252.
- Comerlato, C.B.; de Resende, M.C.C.; Caierão, J.; d’Azevedo, P.A. Presence of virulence factors in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* susceptible and resistant to vancomycin. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 2013; 108: 590-595.
- Creti, R.; Imperi, M.; Bertuccini, L.; Fabretti, F.; Orefici, G.; Di Rosa, R *et al.* Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different Sources. *Journal of Medical Microbiology* 2004; 53: 13-20.
- Dada, A.C.; Ahmad, A.; Usup, G.; Heng, L.Y.; Hamid, R. High-level aminoglycoside resistance and virulence characteristics among *Enterococci* isolated from recreational beaches in Malaysia. *Environmental Monitoring and Assessment* 2013; 185: 7427-7443.
- Dada, A.; Ahmad, A.; Usup, G.; Heng, L.Y. Antibiotic resistance and virulence among *Enterococci* isolated from Teluk Kemang Beach, Malaysia. *Our Nature* 2012; 4: 113-122.
- DSMZ (Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen). 2020. <https://lpsn.dsmz.de/genus>.
- Eaton, T. J.; Gasson, M. J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 2001; 67: 1628-1635.
- Fisher, K.; Phillips, C. The ecology, epidemiology & virulence of *Enterococcus* sp: a review. *Microbiology* 2009; 155:1749-1757.
- Franz, C.M.A.P.; Muscholl-Silberhorn, A.B.; Yousif, N.M.K.; Vancanneyt, M.; Swings, J.; Holzapfel, W.H. Incidence of Virulence Factors and Antibiotic Resistance among *Enterococci* Isolated from Food. *Applied and Environmental Microbiology* 2001; 67: 4385–4389.
- Freeman, D. J.; Falkiner, F. R.; Keane, C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology* 1989; 42: 872-874.
- Golinska, E.; Tomusiak, A.; Gosiewski, T.; Wiecek, G.; Machul, A.; Mikolajczk, D *et al.* Virulence factors of *Enterococcus* strains isolated from patients with inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology* 2013; 19: 3562-3572.
- Gülhan, T.; Aksakal, A.; Ekkin, Ü.H.; Savaşan, S.; Boynukara, B. Virulence factors of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains isolated from humans and pets. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 2006; 30: 477-482.
- Hamzah, A.; Kipli, S.H.; Ismail, S.R.; Una, R.; Sarmani, S. Microbiological Study in Coastal Water of Port Dickson, Malaysia. *Sains Malaysiana* 2011; 40: 93–99.

- Hashem, Y.A.; Amin, H.M.; Essam, T.M.; Yassin, A.S.; Aziz, R.K. Biofilm formation in enterococci: genotype-phenotype correlations and inhibition by vancomycin. *Scientific Reports* 2017; 7: 5733-5745.
- Kandričáková, A.; Lauková, A.; Stropfová, V. Characteristic and susceptibility to enterocins of enterococci in pheasants possessing virulence factor genes. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 2015; 18: 507-514.
- Kashef, M.; Alvandi, A.; Hasavand, B.; Azizi, M.; Abiri, R. Virulence factor and biofilm formation in clinical enterococcal isolates of the west of Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology* 2017; 10: e14379.
- Kreft, B.; Marre, R.; Schramm, U.; Wirth, R. Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. *Infection and Immunity* 1992; 60: 25-30.
- Lata, P.; Ram, S.; Agrawal, M.; Shanker, R. Enterococci in river Ganga surface waters: Propensity of species distribution, dissemination of antimicrobial-resistance and virulence-markers among species along landscape. *BioMed Central (BMC) Microbiology* 2009; 9: 10 p.
- Lawley, T.D.; Walker, A.W. Intestinal colonization resistance. *Immunology* 2012; 138: 1-11.
- Lima, P.G.; Cabral, J.P.L.; Silva, T.M.; Esper, L.M.R.; Gonzalez, A.G.M.; Franco, R.M. Formação de biofilmes de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga sorotipos O153:H25, O113:H21 e O111:H8 em superfície de aço inoxidável e eficácia de sanitizante. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* 2015; 74: 134-139.
- Manero, A.; Blanch, A.R. Identification of *Enterococcus* spp. with a Biochemical Key. *Applied and Environmental Microbiology* 1999; 65: 4425-4430.
- Marinho, A.R.; Martins, P.D.; Ditmer, E.M.; d'Azevedo, P.A.; Frazzon, J.; Van Der Sand, S.T *et al.* Biofilm formation on polystyrene under different temperatures by antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from food. *Brazilian Journal of Microbiology* 2013; 44: 423-426.
- Medeiros, A.W.; Pereira, R.I.; Oliveira, D.V.; Martin, P.D.; d'Azevedo, P.A.; Van der Sand, S *et al.* Molecular detection of virulence factors among food and clinical *Enterococcus faecalis* strains in South Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 2014; 35: 327-332.
- Mohamed, J.A.; Huang, D.B. Biofilm formation by enterococci. *Journal of Medical Microbiology* 2007; 56: 1581-1588.
- Molale, L.G.; Bezuidenhout, C.C. Virulence determinants and production of extracellular enzymes in *Enterococcus* spp. from surface water sources. *Water Science and Technology* 2016; 73:1817-1824.
- Mundy, L. M.; Sahn, D. F.; Gilmore, M. S. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 2000; 13: 513- 522.
- Pereira, R.I.; Prichula, J.; Santestevan, N.A.; d'Azevedo, P.A.; Motta, A.S.; Frazzon, A.P.G. Virulence profiles in *Enterococcus* spp. isolated from raw Buffalo's milk in south Brazil. *Research Journal of Microbiology* 2017; 12: 248-254.
- Popovic', N.; Dinic, M.; Tolinački, M.; Mihajlovic, S.; Terzic'- Vidojevic', A.; Bojic', S. New insight into biofilm formation ability, the presence of virulence genes and probiotic potential of *Enterococcus* sp. dairy isolates. *Frontiers in Microbiology* 2018; 9: 10 p.
- Rozdzinski, E.; Marre, R.; Susa, M.; Wirth, R.; Muscholl-Silberhorn, A. Aggregation substance-mediated adherence of *Enterococcus faecalis* to immobilized extracellular matrix proteins. *Microbial Pathogenesis* 2001; 30: 211-20.
- Ryan-Payseur, B.K.; Freitag, N.E. *Bacillus subtilis* biofilms: A matter of individual choice. *Molecular Biology and Physiology* 2018; 9: e02339.
- Schell, C.; Sparo, M.; Bernstein, J.; Grenóvero, S.; Delpech, G.; Pourcel, G *et al.* Factores de virulencia y multirresistencia en cepas de *Enterococcus faecalis* aisladas de infecciones invasivas humanas. *Revista Argentina de Zoonosis y Enfermedades Infecciosas Emergentes* 2014; 9: 39- 40.
- Silva, V.C.; Nascimento, A.R.; Mourão, A.P.C.; Neto, S.V.C.; Costa, F.N. Contaminação por Enterococcus da água das praias do município de São Luís, Estado do Maranhão. *Acta Scientiarum Technology. Maringá-Eduem* 2008; 30: 187-192.
- Singh, A.K.; Prakash, P.; Achra, A.; Singh, G.P.; Das, A.; Singh, R.K. Standardization and classification of *In vitro* biofilm formation by clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Global Infectious Diseases* 2017; 9: 93-101.
- Soltani, S.; Arshadi, M.; Getso, M.I.; Aminharati, F.; Mahmoudi, M.; Pourmand, M.R. Prevalence of virulence genes and their association with biofilm formation in VRE *faecium* isolates from Ahvaz, Iran. *Journal of Infection in Developing Countries* 2018; 12: 970-977.
- Stępień-Pyśniak, D.; Hauschild, T.; Kosikowska, U.; Dec, M.; Urban-Chmiel, R. Biofilm formation capacity and presence of virulence factors among commensal *Enterococcus* spp. from wild birds. *Scientific Reports* 2019; 9: 11204- 11211.
- Toledo-Arana, A.; Valle, J.; Solano, C. ; Arrizubieta, M. J.; Cucarella, C.; Lamata, M *et al.* The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology* 2001; 67: 4538-4545.
- Upadhyaya, P.M.G.; Ravikumar, K.L.; Umapathy, B.L. Review of virulence factors of enterococcus: an emerging nosocomial pathogen. *Indian Journal of Medical Microbiology* 2009; 27: 301-30.

Yang, Y.; Mao, M.; Lei, L.; Li, M.; Yin, J.; Ma, X *et al.* Regulation of water-soluble glucan synthesis by the *Streptococcus mutans dexA* gene effects

biofilm aggregation and cariogenic pathogenicity. *Molecular Oral Microbiology* 2019; 34: 51-63.