

# ALIMENTO COMO POTENCIAL RESERVATÓRIO DE ENTEROCOCCUS QUE ALBERGAM DETERMINANTES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA

## FOOD AS A POTENTIAL RESERVOIR OF *ENTEROCOCCUS* THAT HOST DETERMINANTS OF VIRULENCE AND RESISTANCE

MÁRCIA REGINA TERRA<sup>1\*</sup>, LARISSA CRISTINA COSTA<sup>2</sup>, RAISA MOREIRA DARDAQUE MUCINHATO<sup>3</sup>, MÁRCIA CRISTINA FURLANETO<sup>4</sup>, LUCIANA FURLANETO-MAIA<sup>5</sup>

1. Doutoranda do curso de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina - UEL; 2. Mestre em Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal Tecnológica do Paraná - UTFPR; 3. Mestranda do curso de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP; 4. Professora Doutora, Disciplina de Biologia Molecular do curso de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina – UEL; 5. Professora Doutora, Disciplina de Microbiologia de Alimentos do curso Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal Tecnológica do Paraná - UTFPR.

\* Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 km 380, Campus Universitário, Caixa Postal 10.011, Londrina, Paraná, Brasil. CEP: 86.057-970. [marciraterra@hotmail.com](mailto:marciraterra@hotmail.com)

Recebido em 28/01/2018. Aceito para publicação em 15/02/2018

### RESUMO

*Enterococcus* spp. são bactérias Gram-positivas e são isoladas de plantas, solo, água e alimentos, predominando na microbiota do trato gastrointestinal de humanos e outros mamíferos. O gênero vem se destacando como agente etiológico de infecções em humanos que está associada não só à presença de resistência intrínseca e adquirida a uma ampla gama de antimicrobianos, bem como a presença de determinantes de virulência. O presente estudo tem como objetivo realizar uma atualização de literatura acerca do alimento como potencial reservatório de *Enterococcus* que albergam determinantes de virulência e resistência. Os resultados deste estudo mostram que os alimentos são transmissores de genes de virulência e resistência. Apesar destes fatores não estarem bem elucidados nos alimentos, os mesmos tornam-se grande risco para a saúde pública.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Enterococcus*, alimentos, fatores de virulência, resistência microbiana a antibióticos.

### ABSTRACT

*Enterococcus* spp. is Gram-positive bacteria and is isolated from plants, soil, water and food, predominating in the microbiotic of the gastrointestinal tract of humans and other mammals. The genus has been emphasizing an etiological agent of human infections that is associated with not only the presence of intrinsic and acquired resistance to a wide range of antimicrobials, as well as the presence virulence of determinants. The present study has as objective accomplishes an actualization of literature about food with potential reservoir of *Enterococcus* that harbors determinants of virulence and resistance. The results of this study show that foods are transmitters of virulence and resistance genes. Although these factors not being clear in food, they become a major public health risk.

**KEYWORDS:** *Enterococcus*, foods, microbial resistance to antibiotics.

### 1. INTRODUÇÃO

As bactérias Gram-positivas pertencentes ao gênero *Enterococcus* são ubíquas ao ser isoladas do solo, esgoto, água e em alimentos, como: leite e derivados; produtos cárneos; vegetais e frutas. Isso se deve à sua alta capacidade de adaptação a presença de NaCl (5 e 10%), sais biliares (40%) e ampla faixa de pH (4.6 a 9.9), além disso, é capaz de crescer em condições aeróbias e anaeróbias e de sobreviver a uma temperatura de 63,5° C por 30 minutos<sup>1</sup>.

*Enterococcus* spp. são de importância para a microbiologia de alimentos e médica, porque estão associadas com a deterioração de alimentos e o consumo de frutas, verduras ou vegetais contaminados pode ocasionar doenças em seres humanos<sup>2</sup>. Além disso, sua presença em alimentos pode indicar condições higiênico-sanitárias inadequadas durante a produção e processamento do alimento, onde sua prevalência resulta, principalmente, da resistência a condições relacionadas à tecnologia de produção, bem como a condições de armazenamento constituindo a microbiota residual em alimentos<sup>3,4</sup>.

Estudos como os realizados por Eaton e Gasson (2001)<sup>5</sup>, Franz *et al.* (2001)<sup>6</sup> e Valenzuela *et al.* (2009)<sup>7</sup> demonstram que, além de possuir caracteres de virulência que medeiam à colonização e a infecção no hospedeiro, cepas de *Enterococcus* spp. isoladas de alimentos possuem genes de resistência a antimicrobianos como a vancomicina. Sabe-se que um indicativo do *Enterococcus* resistente à vancomicina (ERV) foi adquirido pelo consumo de alimento é a presença de ERV em indivíduo que não foi hospitalizado ou submetido à antibioticoterapia<sup>8</sup>.

Devido à problemática exposta o presente estudo tem como objetivo realizar uma atualização de literatura acerca dos alimentos como potencial reservatório de *Enterococcus* spp. que albergam

determinantes de virulência e resistência.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo trata-se de uma revisão bibliográfica, exploratório-descritiva realizada por meio de revisão de literatura integrativa. Foram utilizadas como fontes as bases de dados eletrônicas Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS) e Bases de Dados de Enfermagem (BDENF) cruzando os descritores contemplados nos Descritores em Ciências da Saúde (DeCS): “*Enterococcus*”, “Alimentos”, “Fatores de Virulência”, “Resistência Microbiana a Medicamentos”. Foram usadas três estratégias de buscas: (I) “*Enterococcus*” e “Alimentos”; (II) “*Enterococcus*” e “Fatores de Virulência”; (III) “*Enterococcus*” e “Resistência Microbiana a Medicamentos”, bem como seus respectivos correspondentes na língua inglesa. A busca ocorreu entre agosto a novembro de 2017.

## 3. DESENVOLVIMENTO

### Características gerais de *Enterococcus*

Para enfatizar a origem intestinal deste micro-organismo Thiercelin, em 1899, o denominou de “entérococoque”<sup>9</sup>. No entanto, *Enterococcus* foi, inicialmente, classificado como *Streptococcus* sp. pertencente ao grupo D de Lancefield<sup>9</sup>.

Isolado, em 1906, de um paciente com endocardite por Andrewes e Holder, *S. faecalis* recebeu esse nome por fazer parte da microbiota intestinal humana. Um microrganismo com características de fermentação que diferiam de *S. faecalis* foi descrito, em 1919, por Orla-Jensen e o nomearam como *S. faecium*<sup>10</sup>.

Em 1970, baseado nas características fenotípicas e no arranjo celular Kalina propôs a criação de um novo gênero para os *Streptococcus* do grupo *Enterococcus*, mas a proposta não foi bem aceita<sup>11</sup>. Somente em 1984, o gênero *Enterococcus* e as espécies *S. faecalis* e *S. faecium* foram transferidas para este gênero, por que estudos de Schleifer e Kilpper-Bälz utilizando biologia molecular demonstraram que as espécies *S. faecium* e *S. faecalis* eram, suficientemente, distintas das outras espécies de *Streptococcus*<sup>4,12</sup>.

Possuindo cerca de 40 espécies<sup>13</sup>, o gênero *Enterococcus* spp. se caracteriza por bactérias Gram-positivas que possuem a forma de cocos com tamanho que varia de 0.6-2.5 µm, elas podem estar dispostas, isoladamente, aos pares ou curtas cadeias, não formam esporos e são móveis por conter poucos flagelos<sup>14-16</sup>.

São quimiorganotróficos e anaeróbios facultativos, ao fermentar uma ampla variedade de carboidratos como a lactose; não entendi quem faz a produção com produção de L (+)-ácido láctico sem a produção de gás, pertencendo ao grupo de bactérias ácido lácticas (BAL). Desse modo, as catalases são negativos e em presença de sangue as culturas são, em geral, gamas hemolíticas (não hemolíticas), mas apresentam beta ou

alfa hemólise e a temperatura de crescimento ótima é de ±35°C<sup>11</sup>.

São ubíquos, sendo comumente isolados de plantas, solo, água e alimentos, predominando na microbiota do trato gastrointestinal de humanos e outros mamíferos, mas podem ser isolados da orofaringe, trato genital feminino e da pele<sup>1</sup>. Isto pode resultar da tolerância natural as condições adversas como alta concentração de NaCl (6,5%) e a pH extremos (4,4 a 9,6) e ainda elevada temperatura (60°C por 30 minutos)<sup>4,8,11</sup>.

O gênero vem se destacando como agente etiológico de infecções em humanos o que está associado à presença de resistência intrínseca e adquirida a uma ampla gama de antimicrobianos, bem como a presença de determinantes de virulência<sup>17</sup>.

### Determinantes de virulência em *Enterococcus*

Estudos demonstram que para o estabelecimento do processo infeccioso alguns determinantes de virulência são essenciais, pois estão relacionados com a colonização, invasão do tecido e a mecanismos de defesa do hospedeiro<sup>2</sup>, como as citolisinas, gelatinase, proteína de superfície e substância de agregação as quais estão, intimamente, associadas com a virulência<sup>18</sup>.

As adesinas de superfície bacteriana que se ligam, especificamente, a proteínas da camada da matriz extracelular do hospedeiro como a laminina e o colágeno<sup>19,20</sup>. São denominadas *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules* (MSCRAMMs). A ACE (*Accessory colonization factor - adhesin to collagen of E. faecalis*) é uma MSCRAMMs encontrada em *E. faecalis*. Esta adesina possui um peptídeo sinal N-terminal composto por segmentos não repetitivos denominados região A, seguido da região B que possui um número variável de (2.4 a 5.4) sequências repetidas<sup>19</sup>, precedido do segmento C-terminal que um motivo LPXTG-like e uma região transmembrana hidrofóbica requerida para a fixação na parede celular. A presença da ACE está correlacionada com a adesão ao tecido do hospedeiro. Esse é essencial para que patógenos extracelulares como *E. faecalis* possa causar infecção<sup>21</sup>.

A citolisina (“hemolisina”) foi o primeiro fator de virulência estudado em *Enterococcus*, trata-se de uma toxina protéica modificada pós-tradução que é secretada para o meio extracelular na forma de duas subunidades estruturais (CylL-L e CylL-S) ao provocar lise de glóbulos vermelhos devido a sua atividade β-hemolítica e de diversas outras células humanas como macrófagos e neutrófilos<sup>22-24</sup>. Os genes relacionados à produção da citolisina *cyLL*, *cyLS*, *cyLM*, *cyLB*, *cyLA*, *cyll*, *cyLR1* e *cyLR2* formam um operon que pode estar localizado em ilhas de patogenicidade<sup>25</sup> ou em plasmídeos autotransmissíveis responsivos a feromônios como Pad1<sup>24,20</sup>. A produção de citolisina por *E. faecalis* caracteriza-se pelo desenvolvimento de um halo claro em torno das colônias em meio ágar sangue, aparecendo em até 60% dos isolados provenientes de surtos<sup>24</sup>. Desse modo, estudo em que

foi empregado ratos como modelo de infecção para *E. faecalis* os isolados onde foi identificada a expressão de citolisina foram mais virulentos quando comparados com isolados que não expressam citolisina<sup>23</sup>.

O antígeno de endocardite de *Enterococcus* (EfaA) é uma proteína com peso molecular de, aproximadamente, 34 kDa codificado pelo gene *efaA<sub>fs</sub>* e *efaA<sub>fm</sub>* em *E. faecalis* e *E. faecium*, respectivamente<sup>5,26</sup>. O gene *efaA* faz parte do operon *afaCBA* que codifica o transportador ABC (permease), regulada por íons de magnésio<sup>27</sup>.

A proteína de superfície de *Enterococcus* (Esp) está alocada na superfície extracelular e possui alto peso molecular ao estar relacionada a colonização, persistência do *Enterococcus* no trato urinário e com a formação de biofilme em superfícies abióticas<sup>28</sup>.

Outro importante fator secretado por *E. faecalis* é a gelatinase. Trata-se de uma metaloproteinase codificada pelo gene cromossomal *gelE* de *E. faecalis*. Esta enzima atua na degradação de tecido do hospedeiro hidrolisando substâncias como a gelatina, colágeno, caseína, hemoglobina dentre outros compostos bioativos ao disponibilizar nutrientes para a bactéria<sup>29,30</sup>. Além disso, parece atuar na modulação da resposta imune do hospedeiro<sup>31</sup>.

A regulação dos determinantes que codificam estas proteases em *E. faecalis* é realizado pelo sistema Fsr *quorum sensing*<sup>32</sup> e tem sido demonstrado que afetam a patogênese de algumas infecções causadas por *E. faecalis*<sup>33</sup>. A atividade do gene *gel* é modulada por alguns fatores ambientais. Por exemplo, o ambiente encontrado no trato gastrointestinal, o equilíbrio do microrganismo na microbiota intestinal e efeitos do sinergismo bacteriano, assim, há presença e persistência de um grande número de *Enterococcus* spp. viáveis<sup>5</sup>.

A hialuronidase é uma proteína de alto peso molecular com 45 kDa e atua destruindo mucopolissacarídeos do tecido conjuntivo, é codificada pelo gene *hyl*<sup>34,35</sup>. Além de *E. faecalis* e *E. faecium*, este fator de virulência é detectado em *E. casseliflavus*, *E. durans* e *E. mundtii* isolados de alimentos<sup>36</sup>.

A substância protéica de agregação (AS) é uma glicoproteína de superfície associada à parede de bactérias Gram-positivas<sup>37,38</sup>. Os genes plasmidiais *asa1*, *asc10*, *asa 373* e *ash 701* podem ser encontrados em quatro plasmídeos de *E. faecalis* pAD1, pCF10, pD1 e pAM373A que estão relacionados com a expressão da proteína AS, é, raramente, encontrada em *E. faecium*<sup>38</sup>.

A AS atua sobre células eucarióticas ao impedir ou retardar a formação do fagolisossomo. Dessa forma, promove a sobrevivência intracelular de *E. faecalis* em neutrófilos e pode aumentar a aderência de *Enterococcus* spp. a células do intestino e do epitélio renal<sup>38</sup>. Em células procarióticas facilitam o processo conjugativo, pois a linhagem doadora é induzida a sintetizar a AS quando exposta a feromônios sexuais bacterianos secretados pela linhagem receptora, que modifica a superfície da bactéria doadora ao promover

a adesão à célula receptora, o que causa agregação celular e potencializa a transferência do plasmídeo<sup>37</sup>.

### Determinantes de resistência em *Enterococcus*

Este gênero de microrganismos compreende um grupo de extrema complexidade e importância ao que se refere a interação microrganismo e seres humanos<sup>11</sup>.

Posteriormente, ao surgimento dos antimicrobianos por meio de reações inibitórias entre colônias de microrganismos, sua introdução como agente terapêutico foi promissora. Entretanto, apesar de sua relevância clínica, o uso indiscriminado desses fármacos trouxe à tona preocupações acerca da ameaça de cepas resistentes, inclusive fora do âmbito hospitalar, em particular em alimentos<sup>2</sup>. Apontada como a maior ameaça à saúde humana, a resistência aos antimicrobianos observado em *Enterococcus* spp. pode ser intrínseca, esta própria da espécie, onde os genes determinantes de resistência estão localizados nos cromossomos ou extrínseca (adquirida), mediada por genes plasmidiais ou por transposons<sup>1</sup>.

A aquisição de determinantes de resistência a antimicrobianos pode ocorrer em consequência de mutação do DNA original ou virtude dos mecanismos de Transferência Horizontal de Genes (THG). No que lhe concerne, este é subdividido três mecanismos: transformação, transdução e conjugação, tem-se a conjugação o principal mecanismo de THG observado em *Enterococcus*<sup>39,40</sup>.

A resistência intrínseca a Cefalosporinas, sulfonamidas,  $\beta$ -lactamas e aos baixos níveis de aminoglicosídeos, já foram detectadas em *Enterococcus*. Dentre os exemplos de resistências adquiridas estão os cloranfenicóis, eritromicina, altos níveis de clindamicina e aminoglicosídeos, tetraciclina, altos níveis de  $\beta$ -lactâmicos, fluoroquinolonas e glicopeptídeos, como por exemplo, a vancomicina<sup>10</sup>.

Em estudo com amostras de alimentos e clínicas realizado por Abriouel *et al.* (2008)<sup>41</sup> foi possível detectar isolados resistentes aos antimicrobianos eritromicina, tetraciclina, cloramfenicol, ciprofloxacina, levofloxacina, gentamicina e streptomycin para *E. faecalis*, e quinupristin/dalfopristin, ampicilina, penicilina, ciprofloxacina, levofloxacina, rifampicina, cloramfenicol, gentamicina e nitrofurantoin para *E. faecium*.

Ao isolar *Enterococcus* spp. de queijo tipo “Minas frescal” e avaliar a resistência aos antimicrobianos destas cepas Furlaneto-Maia *et al.*, (2014)<sup>42</sup> observou a presença de fenótipos e genótipos de resistência aos antimicrobianos, bem como multirresistência aos antimicrobianos administrados em seres humanos como, por exemplo, vancomicina, eritromicina, tetraciclina, amicacina, norfloxacin, cefalotina e ácido nalidíxico resultando em falha terapêutica.

Giraffa (2002)<sup>1</sup> constatou a disseminação da resistência aos antimicrobianos em produtos cárneos, lácteos e os denominados pronto para consumo. Especificamente, em amostras de queijos provenientes

da Europa, foram detectadas resistência de *E. faecalis* e *E. faecium* à penicilina, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, lincomicina, rifampicina, ácido fusídico e vancomicina com dimensionamento desigual.

A resistência aos antimicrobianos ocorrem, principalmente por meio de alterações no sítio-alvo dos antimicrobianos em *Enterococcus* spp. e pode ocorrer por diferentes mecanismos<sup>43</sup>, como:

- Alteração na parede celular: a classe de antimicrobianos responsáveis pela atuação na parede celular são cefalosporinas,  $\beta$ -lactâmicos, glicopeptídeos. A respeito das cefalosporinas, seu mecanismo de ação é semelhante aos  $\beta$ -lactâmicos, o que os difere é que a base molecular destas não é, totalmente, entendida. A resistência intrínseca é correlacionada a redução da afinidade entre a cefalosporinas e PBPs (enzimas transpeptidases - penicillin binding proteins), sobretudo a PBP5. Em relação aos  $\beta$ -lactâmicos inibidores da síntese de peptidoglicanos, ligam-se as PBPs, impedindo-as de catalisar a transpeptidação e, conseqüentemente, não ocorre à ligação cruzada na parede celular da bactéria. As enzimas PBPs são catalogadas como de classe A e de B, onde, respectivamente, são bifuncionais por portar tanto D e D-transpeptidase e atividade transglicosilase; enquanto a outra necessita da atividade de outras enzimas e dispõe apenas do domínio transpeptidase<sup>43</sup>.

Nove genes são responsáveis pela resistência aos glicopeptídeos, formadores do cluster *van*. Na região das Américas, sudeste Asiático e leste Europeu os genes de *van* mais predominantes em *E. faecium* são *vanA*, seguido de *vanB* e *vanC*<sup>8,44</sup>.

- Alteração na membrana celular: representado por antimicrobianos relativo à classe dos lipopeptídios. Estes, por sua vez, em países como EUA, não são aprovados pelo FDA como recurso terapêutico originado por ERV. Para que haja a interação e incorporação entre o sítio de ação e os fosfolipídios, é fundamental a presença de  $Ca^{2+}$ . Após a entrada no interior da membrana, originam-se poros que interrompem a continuidade e funcionalidade da membrana celular, resultando na morte da célula. Nos *E. faecalis* a resistência se dá a transfiguração da interação com a membrana, sendo crucial a presença de proteína de membrana do tipo LiaF e enzimas como as pertencentes à família da glicerofosforil diéster fosfodiesterase (GdpD) e cardiolipina sintase (Cls)<sup>45-47</sup>.

- Alteração da síntese protéica: esta advém da interação do ribossomo com as classes de antimicrobianos aminoglicosídeos, fenicols, estreptograminas, macrolídeos e tetraciclina, ocasionando interrupção da tradução. A título de exemplo a estreptomina e seus similares (neomicina, gentamicina, entre outros) são uns dos antimicrobianos representantes da classe dos aminoglicosídeos, dada sua toxicidade é utilizada como alternativa a falha de outros. Seu alvo é a subunidade ribossomal 30S. A expressão das enzimas acetiltransferases (AAC),

fosfotransferases (APHs) e nucleotíditransferases (ANT) ocorrem, especificamente nos *Enterococcus* spp., por genes localizados em transposons e plasmídeos, que por sua vez, detêm de alta capacidade de disseminação. Por outro lado, o gene *erm* (eritromicina ribossomo metilase) é responsável pela resistência aos macrolídeos. Vale ressaltar, que devido à codificação da expressão da metilação na região 23S RNAr, ocorre à resistência cruzada<sup>16,48</sup>.

Caracterizado por seu amplo espectro de ação e a estrutura química constituída de um sistema de anel naftaceno, o antimicrobiano tetraciclina é amplamente empregado na clínica médica. Aproximadamente 40 genes são relacionados a codificação da resistência a tetraciclina, podendo estar contido no cromossomo bacteriano ou em elementos genéticos móveis como os plasmídeos de resistência. Em relação à linezolida, seu sítio de ligação no rRNA58 sofre interferência no posicionamento dos nucleotídeos, devido às mutações nos genes responsáveis pela codificação de 23S para o domínio V, em *Enterococcus*. Essa classe de antimicrobiano tem seu uso disseminado mundialmente como forma terapêutica de ERV<sup>49,50</sup>.

- Alteração da inibição da síntese de DNA: primordial à sobrevivência da bactéria, as enzimas tetrâmeras DNA girase ou topoisomerase IV são impulsionados pelas classes de antimicrobianos denominados de quinolonas e fluoquinolonas. Ambas as enzimas são heterogêneas, sendo constituída de 2 subunidades: a DNA girase por GyrA e GyrB, enquanto a topoisomerase IV, ParC e ParE. Como consequência da inibição dessas enzimas, nota-se o preenchimento maior no interior da bactéria pela molécula de DNA, enquanto as extremidades livres levam a síntese desordenada de RNAm e proteínas, culminando da morte da bactéria<sup>43,16,51</sup>.

- Inibição competitiva da síntese de ácido fólico: possui efeito bacteriostático, como as sulfonamidas, exemplificada pelo sulfametazol. Em teste *in vivo* foi observada a ineficácia deste fármaco devido a habilidade do *Enterococcus* em usar fontes externas de folato. Em contrapartida, *in vitro*, o comportamento desse microrganismo foi dispare, expressando vulnerabilidade ao antimicrobiano<sup>52-54</sup>.

- Inibição da síntese de RNA: ansamicinas e rifampicina são as classes de antimicrobianos com capacidade inibir a síntese de RNA. O desenvolvimento de mutações em sítios específicos no gene que codifica a subunidade beta da RNA polimerase, atenuando a afinidade da rifampicina para a RNA polimerase resultando em resistentes a estes fármacos<sup>55</sup>.

### **Enterococcus em alimentos**

O gênero *Enterococcus* tem importante implicação na indústria de alimentos podendo ser utilizado como probiótico ou cultura iniciadora<sup>56</sup>.

Probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro<sup>13</sup>. Para um

microrganismo ser considerado probiótico deve possuir como características ser seguro, não invasivo, não carcinogênico e não patogênico, conseguir formar coagregados na microbiota normal em equilíbrio, aderir às células, persistir e se multiplicar, reduzir ou excluir a aderência de microrganismos patogênicos, produzir bacteriocinas, ácidos e peróxido de hidrogênio antagonico ao patógeno em crescimento<sup>4</sup>. Os probióticos são empregados em alimentos como iogurtes, leite fermentado e não fermentado e preparações farmacêuticas<sup>4</sup>. Os *Enterococcus* são utilizados como culturas iniciadoras (*starters*) que consistem em bactérias viáveis adicionadas aos alimentos com o intuito de aprimorar as características sensoriais ao prover qualidades organolépticas, a conservação e a segurança do alimento por meio da antibiose ao prevenir o aparecimento de microrganismos que causem danos aos alimentos ou a saúde humana<sup>57</sup>.

### **Alimentos como potencial reservatório de *Enterococcus* que albergam determinantes de virulência e resistência**

O papel dos fatores de virulência e resistência de *Enterococcus* isolados de alimentos não está elucidado. No entanto, a matriz alimentar que apresenta tais fatores é considerada um reservatório de genes de virulência e de resistência<sup>58</sup>.

O aumento da prevalência de bactérias patogênicas resistentes à antimicrobianos resulta, principalmente, da pressão seletiva devido a utilização generalizada de antimicrobianos na medicina humana e veterinária, nutrição de animais e agricultura. Dessa forma, à capacidade das bactérias serem, altamente, resistentes a muitos antimicrobianos utilizados<sup>59,60</sup>. Nesse sentido, o consumo de alimentos produzidos com matéria-prima contaminada propiciou a transmissão de *E.faecium* resistente a glicopeptídeos para seres humanos através da cadeia alimentar<sup>61-63</sup>.

Segundo Riboldi *et al.* (2009)<sup>64</sup> o plasmídeo de resistência *pAMβ1* transferido de *E.faecalis*, *E.faecium* e *Lactobacillus reuteri* do trato digestivo de camundongos foram transferidos entre cepas de *Lactobacillus curvatus* em salsichas corroborando, assim, com a hipótese de que os *Enterococcus* resistentes podem colonizar os alimentos e, o ser humano ao ingerir tais alimentos entra no trato gastrointestinal colonizando-os e transmitindo seus genes de resistência, o que se torna grande risco para a saúde pública.

Busani *et al.* (2004)<sup>65</sup> relataram a resistência de 95% dos *E. faecium* e 81% dos *E. faecalis* resistentes a Tetraciclina e 55% de *E. faecalis* resistentes à eritromicina, ambas isoladas em carne de frango crua e de porco.

Estudos realizado por Campos *et al.* (2013)<sup>66</sup> isolaram em amostras de carcaças de frangos 50 cepas de *Enterococcus* e 93% das cepas foram resistentes à tetraciclina com o gene *tet(M)*, 85% apresenta resistência à eritromicina com o gene *erm(B)* e todas as

amostras estudadas apresentaram resistências à gentamicina apresentando o gene *aac (6')-Ie-aph (2'')-Ia*.

A resistência ao cloranfenicol foi relatada por cepas de *E. faecium* isolada em salmão frio defumado<sup>41,67</sup>. Já Çitak *et al.* (2004)<sup>68</sup> isolaram 101 cepas de *Enterococcus* spp. em queijo turco e relataram que 76% das cepas de *E. faecalis* apresentaram resistências à estreptomicina, eritromicina, oxacilina e vancomicina.

Çitak *et al.* (2004)<sup>68</sup> afirmam que a presença de cepas de *Enterococcus* resistentes à antimicrobianos em alimentos reforça o papel dos alimentos na veiculação e transmissão de cepas com resistência à antimicrobianos. No entanto, a presença de genes de resistência, isoladamente, não indica patogenicidade de uma estirpe, mas quando combinada com a presença de fatores de virulência podem causar infecções graves<sup>69</sup>.

Genes de virulência são comumente relatados em isolados de alimentos como observado por Eaton e Gasson (2001)<sup>5</sup> que isolaram cepas de *E. faecalis* provenientes de vários alimentos como queijo, carne, leite entre outras fontes, e detectaram que 78% das cepas possuíam o gene de virulência *gelE*.

Em estudo realizado por Abriouel *et al.* (2008)<sup>41</sup> isolaram *E. faecalis* em amostras de vegetais e detectaram os genes de virulência gelatinase – *gelE* (76,5%), genes de proteína de superfície - *esp* (23,5%), genes de antígeno da endocardite – *efaA* (76,5%) e genes de substância de agregação – *agg* (76,5%).

Ass *Enterococcus* isolados de amostras de alimentos no varejo, amostras cozidas e de camarões prontos para o consumo apontaram a presença de genes de feromônio sexuais como *cpd*, *cob* e *ccf* nas porcentagens de 100%, 94,3% e 94,3%, respectivamente<sup>70</sup>.

Em amostras de produtos lácteos foram isolados *E. faecium* onde 47,5% possuíam o gene *efaA*<sup>71</sup>. O gene de virulência citolisina (*cylB*) isolado por *Enterococcus* foi encontrado em queijo branco<sup>72</sup> enquanto que o gene *cylA* foi encontrado em leite cru<sup>73</sup>.

Estudos realizados por Rocha *et al.* (2015)<sup>74</sup>, analisaram 100 isolados de *Enterococcus* provenientes de amostras alimentares onde foram analisados quanto aos fatores de virulência e resistência presentes nas amostras. O estudo constatou que do total das espécies de *Enterococcus* 61% eram de isolados de *E.faecium* e desses foram observadas presenças de genes de virulência como *asa1* (63,9%), *gelE* (24,6%), *ace* (31,1%), *cpd* (8,2%) e 32,8 dos isolados foram resistentes a vancomicina quando submetidos ao teste de disco-difusão.

## **4. DISCUSSÃO**

Apesar dos benefícios trazidos pelo uso do *Enterococcus* na microbiologia de alimentos este microrganismo pode ser encontrado como um contaminante, que é considerado um indicador de condições sanitárias insuficientes durante a produção e transformação de leite. Dessa forma, coloniza-se

alimentos crus como leite e carne e multiplicar nestes substratos durante a fermentação, sobrevive até mesmo aos processos de conservação como pasteurização, salgas e defumação. Isto se deve a sua habilidade de resistir a condições extremas de temperatura, pH e de salinidade, podendo se multiplicar em números elevados e atuar como agentes deterioradores em carnes e produtos lácteos processados<sup>1</sup>.

Além disso, um fator preocupante é o uso de *Enterococcus* spp. em alimentos, pois este microrganismo é relacionado não somente a infecções nosocomiais, mas também a infecções adquiridas na comunidade<sup>28</sup> onde já foram detectadas a presença de determinantes de virulência e de resistência e alguns destes podem ser transferidos por meio de THG. Por esse prisma, haja visto a habilidade de *Enterococcus* realizar a transferência intra e interespecífica de plasmídeos por conjugação propiciando a disseminação de cepas patogênicas<sup>13</sup>.

Chajęcka *et al.* (2017)<sup>3</sup> afirmam que os genes de virulência e de resistência detectados em isolados de alimentos é dependente da espécie e não da matriz alimentar em si. Sendo que as espécies *E. faecium* e *E. faecalis* são as mais comumente isoladas.

A combinação da presença de genes de resistência e a presença de fatores de virulência indicam a patogenicidade de uma estirpe ao provocar infecções graves<sup>69</sup>, incluindo artrite séptica, bacteremia, endocardite, infecção no trato urinário, infecção intra-abdominal, infecção pélvica, infecção nos tecidos moles, infecção no sistema nervoso central, osteomielite, pneumonia, infecção feridas, infecção em sítio cirúrgico<sup>2,5</sup>.

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que os alimentos são um importante reservatório de *Enterococcus* que albergam determinantes de virulência e resistência à medida que contribui por meio da cadeia alimentar com a disseminação de isolados potencialmente patogênicos.

## 6. AGRADECIMENTOS

Aos órgãos de fomento Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Araucária que subsidiam a realização dos estudos do grupo.

## REFERÊNCIAS

[1] Giraffa G. Enterococci from foods. *FEMS Microbiol Rev* 2002; 26(2):163-171.  
 [2] Franz CM, Stiles ME, Schleifer KH, *et al.* Enterococci in foods—a conundrum for food safety. *Int J of Food Microbiol* 2003; 88(2):105-122.  
 [3] Chajęcka-Wierzchowska W, Zadernowska A, Laniewska-Trohenheim L. Virulence factors of

*Enterococcus* spp. presented in food. *LWT- Food Sci Technol* 2017; 75: 670-676.  
 [4] Foulquié Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, *et al.* The role and application of *enterococci* in food and health. *Int J Food Microbiol* 2006; 106(1): 1-24.  
 [5] Eaton TJ, Gasson M. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *App Environ Microbiol* 2001; 67(4): 1628-1635.  
 [6] Franz CMAP, Muscholl-Silberhorn AB, Yousif NMK *et al.* Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among *enterococci* isolated from food. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67(9): 4385–4389.  
 [7] Valenzuela AS, Ben Omar N, Abriouel H *et al.* Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in *enterococci* from artisan foods of animal origin. *Food Control* 2009; 20(4): 381-385.  
 [8] Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiol* 2009; 155(6): 1749–1757.  
 [9] Stiles ME, Holzapfel WH. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J of Food Microbiol* 1997; 36(1): 1-29.  
 [10] Murray BE. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev* 1990; 3(1):46-65.  
 [11] Facklam RR, Sahn DF, Teixeira LM. *Enterococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. *Manual of Clinical Microbiology*. 7 ed. Washington: American Society for Microbiology Press 1999; 297-305.  
 [12] Schleifer KH, Kilpper-Bälz R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom.rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 1984; 34(1): 31-34.  
 [13] Franz CM, Huch M, Abriouel H, *et al.* Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int J of Food Microbiol* 2011; 151(2): 125-140.  
 [14] Dunny GM, Antipora MH, Hirt H. Peptide pheromone-induced and transfer of plasmid pCF10 in *Enterococcus faecalis*: probing the genetic and molecular basis for specificity of the probe response. *Peptides* 2001; 22(10): 1529-1539.  
 [15] Huycke MM, Sahn DF, Gilmore MS. Multiply resistant *enterococci*: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerg Infect Dis* 1998; 4(2): 239–249.  
 [16] Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. *Microbiologia de Brock*. 12. ed Porto Alegre: Artmed, 2010.  
 [17] Maietti L, Bonvini B, Huys G *et al.* Incidence of antibiotic resistance and virulence determinants among *Enterococcus italicus* isolates from dairy products. *Syst Appl Microbiol* 2007; 30(6): 509–517.  
 [18] Shankar V, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindahl G, Gilmore M. Infection derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein. *Infect Immun* 1999; 67(1): 193-200.  
 [19] Nallapareddy SR, Qin X, Weinstock G.M, *et al.* *Enterococcus faecalis* adhesin, ace, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. *Infect Immun* 2000; 68(9): 5218-5224.  
 [20] Koch S, Hufnagel M, Theilacker C, *et al.* Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine* 2004; 22(7):822–830.

- [21] Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, *et al.* MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol* 1994; 48(1): 585-617.
- [22] Garza-Velasco R, Hernández-Acosta K, Mejía-Chávez A, *et al.* Los factores de virulencia y la actual importancia clínica de *Enterococcus faecalis*. *Lab-Acta* 2002; 14(1): 9-10.
- [23] Ike Y, Hashimoto H, Clewell DB. Hemolysin of *Streptococcus faecalis* subspecies zymogenes contributes to virulence in mice. *Infect Immun* 1984; 45(2): 528-530.
- [24] Ike Y, Clewell DB, Segarra RA, Gilmore MS. Genetic analysis of the pAD1 hemolysin/bacteriocin determinant in *Enterococcus faecalis*: Tn917 insertional mutagenesis and cloning. *J Bacteriol* 1990; 172(1): 155-163.
- [25] Shankar N, Baghdayan AS, Gilmore MS. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature* 2002; 417(6890): 746-750.
- [26] Sava IG, Heikens E, Huebner J. Pathogenesis and immunity in *enterococcal* infections. *Clin Microbiol and Infect* 2010; 16(6): 533-540.
- [27] Abrantes MC, De Fátima Lopes M, Kok J. Impact of manganese, copper and zinc ions on the transcriptome of the nosocomial pathogen *Enterococcus faecalis* V583. *PLoS One* 2011; 6(10): e26519.
- [28] Semedo T, Santos MA, Martins P, *et al.* 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* 2003, 41(6): 2569-2576.
- [29] Su YA, Sulavik MC, He P, *et al.* Nucleotide sequence of the gelatinase gene (*gelE*) from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. *Infect Immun* 1991; 59(1): 415-420.
- [30] Vergis EM, Shankar N, Chow JW, *et al.* Association between the presence of *enterococcal* virulence factors gelatinase, hemolysin, and *enterococcal* surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. *Clin Infect Dis* 2002; 35(5): 570-575.
- [31] Park SY, Shin YP, Kim CH, *et al.* Immune evasion of *Enterococcus faecalis* by an extracellular gelatinase that cleaves C3 and iC3b. *J Immunol* 2008, 181(9): 6328-6336.
- [32] Qin X, Singh KV, Weinstock GM, *et al.* Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* Genes on Production of Gelatinase and a Serine Protease and Virulence. *Infect Immun* 2000; 68(5): 2579-2586.
- [33] Pinkston KL, Gao P, Diaz-Garcia D, *et al.* The Fsr Quorum-Sensing System of *Enterococcus faecalis* Modulates Surface Display of the Collagen-Binding MSCRAMM Ace through Regulation of *gelE*. *J Bacteriol* 2011; 193(17): 4317-4325.
- [34] Archimbaud C, Shankar N, Forestier C, *et al.* In vitro adhesive properties and virulence factors of *Enterococcus faecalis* strains. *Res in Microbiol* 2002; 153(2): 75-80.
- [35] Vankerckhoven V, Autgaerden TV, Vael C, *et al.* Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in *enterococci* and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 2004; 42(10): 4473-4479.
- [36] Trivedi K, Cupakova S, Karpiskova R. Virulence factors and antibiotic resistance in *enterococci* isolated from food-stuffs. *Vet Med* 2011; 56(7): 352-357.
- [37] Clewell DB, Flannagan SE. The conjugative transposons of gram-positive bacteria. In: *Bacterial conjugation*. Springer US, 1993; 369-393.
- [38] Mundy LM, Sahn DF, Gilmore M. Relationships between *Enterococcal* virulence and antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13(4): 513-522.
- [39] Stecher B, Maier L, Hardt WD. 'Blooming' in the gut: how dysbiosis might contribute to pathogen evolution. *Nat Rev Microbiol* 2013; 11(4): 277-284.
- [40] Zarrilli R, Tripodi MF, Popolo AD, *et al.* Molecular epidemiology of high-level aminoglycoside-resistant *enterococci* isolated from patients in a university hospital in southern Italy. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56(5): 827-835.
- [41] Abriouel H, Ben Omar N, Molinos AC *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. *Int J Food Microbiol* 2008; 123(1): 38-49.
- [42] Furlaneto-Maia L, Rocha KR, Henrique FC, Giazzi A, Furlaneto MC. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* sp isolated from soft cheese in Southern Brazil. *Adv in Microbiol* 2014; 4(3): 175.
- [43] Miller WR, Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2014; 12(10): 1221-1236.
- [44] Courvalin PM. Vancomycin resistance in Gram-positive cocci. *Clin Infect Dis* 2006, 42 Suppl, 1: S25-34.
- [45] Arias CA, Panesso D, McGrath DM, *et al.* Genetic basis for in vivo daptomycin resistance in *Enterococci*. *N Engl J Med* 2011; 365(10): 892-900.
- [46] Steenbergen JN, Alder J, Thorne GM, *et al.* Daptomycin: a lipopeptide antibiotic for the treatment of serious Gram-positive infections. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55(3): 283-288.
- [47] Fantin B, Leclercq R, Garry L, *et al.* Influence of inducible cross-resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramin B-type antibiotics in *Enterococcus faecium* on activity of quinupristin-dalfopristin in vitro and in rabbits with experimental endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother* 1997; 41:931-935.
- [48] Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM. Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob Agents Chem* 1999; 43(4): 727-737.
- [49] Chow JW. Aminoglycoside resistance in *Enterococci*. *Clin Infect Dis* 2000; 31(2): 586-589.
- [50] Wright GD, Thompson PR. Aminoglycoside Phosphotransferases: Proteins, Structure, and Mechanism. *Front Biosci* 1999; 4:D9-21.
- [51] Hawkey, PM. Mechanisms of quinolone action and microbial response. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51(suppl 1):29-35.
- [52] Grayson ML, Thauvin-Eliopoulos C, Eliopoulos GM, *et al.* Failure of trimethoprim-sulfamethoxazole therapy in experimental *enterococcal* endocarditis. *Antimicrob Agents Chem* 1990; 34(9): 1792-1794.
- [53] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI/NCCLS). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. CLSI/NCCLS document M100-S21, 2011.
- [54] Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiologia*, 10 ed. Porto Alegre: Artmed; 2012.
- [55] Floss HG, Yu Tw. Rifamycin - mode of action,

- resistance and biosynthesis. *Chem Rev* 2005; 105(2): 621-632.
- [56] Gelsomino R, Vancanneyt M, Condon S, *et al.* *Enterococcal* diversity in the environment of an Irish Cheddar-type cheesemaking factory. *Int J Food Microbiol* 2001; 71(2): 177-188.
- [57] Leroy F, De Vuyst L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci Technol* 2004; 15(2): 67-78.
- [58] Hayes JR, English LL, Carr LE *et al.* Multiple-antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. isolated from commercial poultry production environments. *App and Env Microbiol* 2004; 70(10): 6005-6011.
- [59] Mathur S, Singh R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria – a review. *Int J of Food Microbiol* 2005; 105: 281-295.
- [60] Grohmann E, Muth G, Espinosa M. Conjugative Plasmid Transfer In Gram-Positive. *Bacteria microbiology and molecular biology*. *Microbiol and Mol Biol Rev* 2003; 67(2): 277-301.
- [61] Bager F, Madsen M, Christensen J, *et al.* A Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. *Prev Veteret Med* 1997; 31(1-2): 95-112.
- [62] Klare H, Heier H, Claus G, *et al.* *Enterococcus faecium* strains with *vanA*-mediated high-level glycopeptide resistance isolated from animal foodstuffs and fecal samples of humans in the community. *Microb Drug Resist* 2009; 1(3): 265-272.
- [63] Schouten MA, Voss A, Hoogkamp-Korstanje JAA. VRE and meat. *The Lancet* 1997; 349, 1258.
- [64] Riboldi GP, Frazzon J, Azevedo PA, *et al.* Antimicrobial resistance profile of *Enterococcus* spp. isolated from food in Southern Brazil. *Braz J Microbiol* 2009; 40(1): 125-128.
- [65] Busani L, Grosso MD, Paladini C, *et al.* Antimicrobial susceptibility of vancomycin-susceptible and -resistant *Enterococci* isolated in Italy from raw meat products, farm animals, and human infections. *Int. J. Food Microbiol* 2004; 97(1): 17-22.
- [66] De Campos ACFB, Souza NR, Da Silva PH, *et al.* Resistência antimicrobiana em *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* isolados de carcaças de frango. *Pesq. Vet Bras* 2013; 33(5): 575-580.
- [67] Tomé E, Gibbs PA, Teixeira PC. Growth control of *Listeria innocua* 2030c on vacuum-packaged cold-smoked salmon by lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 2008; 121(3): 285-294.
- [68] Çitak S, Nihal Y, Sati O. Antibiotic resistance and incidence of *Enterococcus* species in Turkish white cheese. *Int J of Dairy Technol* 2004; 57(1): 27-31.
- [69] Heidari H, Emaneini M, Dabiri H, *et al.* Virulence factors, antimicrobial resistance pattern and molecular analysis of *Enterococcal* strains isolated from burn patients. *Microb Pathog* 2016; (90): 93-97.
- [70] Chajęcka-Wierzchowska W, Zadernowsk A, Laniewska-Trokenheim L. Virulence factors, antimicrobial resistance and biofilm formation in *Enterococcus* spp. isolated from retail shrimps. *LWT-Food Sci and Technol* 2016; 69: 117-122.
- [71] Mannu L, Paba A, Daga E, *et al.* Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *Int J of Food Microbiol* 2003; 88(2): 291-304.
- [72] İspirli H, Fatmanur D, Enes D. Characterization of functional properties of *Enterococcus* spp. isolated from Turkish white cheese. *LWT-Food Sci and Technol* 2017; (175): 358-365.
- [73] Hammad AM, Hamdy AH, Tadashi S. Prevalence, antibiotic resistance and virulence of *Enterococcus* spp. in Egyptian fresh raw milk cheese. *Food Control* 2015; 50: 815-820.
- [74] Rocha KR, Furlaneto-Maia L, Terra MR, *et al.* Ocorrência de fatores de virulência e resistência em isolados de *Enterococcus faecium* provenientes de amostras clínicas e de alimentos. *Biosaúde* 2016; 17(2): 46-54.