

ANÁLISE GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DE *Enterococcus* spp. PROVENIENTES DE AMOSTRAS CLÍNICAS E DE ALIMENTO

GENOTYPIC AND PHENOTYPIC ANALYSIS OF *Enterococcus* spp. FROM CLINICAL AND FOOD SAMPLES

KÁTIA REAL ROCHA^{1*}, MARCIA REGINA TERRA¹, MÁRCIA CRISTINA FURLANETO², LUCIANA FURLANETO-MAIA³

1. Doutoranda em Microbiologia pela UEL; 2. Professora Doutora, Disciplina de Biologia Molecular, do curso de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina - UEL; 3. Professora Doutora, Disciplina de Microbiologia de Alimentos do curso de 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: 86057-970. krealrocha@gmail.com

Recebido em 07/05/2018. Aceito para publicação em 22/05/2018

RESUMO

Enterococos são bactérias ubíquas que habitam o trato gastrointestinal de humanos, bem como podem estar no solo e água. Alguns isolados apresentam importância clínica, sendo considerada uma das causas de morte em infecções hospitalares. Nesse estudo, foram identificados pelo método de PCR as espécies de enterococos provenientes de amostras de alimento (100) e clínicas (30), bem como à presença de cinco fatores de virulência (substância de agregação, *asa1*; gelatinase, *gelE*; adesina, *ace*; feromônio sexual, *cpd* e ativador da citolisina, *cylA*), quatro genes de resistência (tetraciclina, *tet(L)*; eritromicina, *erm(B)*; gentamicina, *aac6'aph2'-Ia*; e vancomicina, *vanA*). Foram avaliados a habilidade de produção de gelatinase, formação de biofilme e susceptibilidade a 3 antibióticos (eritromicina, tetraciclina e vancomicina). Obtivemos que *E. faecalis* (32,0%), *E. faecium* (61,0%) e três isolados apenas como *Enterococcus* sp estavam presentes em alimentos; *E. faecalis* (7,0%) e *E. faecium* (76,7%) em amostras clínicas. Comparando à presença de determinantes de virulência em ambas as amostras, obtivemos maior quantidade nos isolados provenientes de alimentos, exceto para o gene *gelE*. A produção de gelatinase e formação de biofilme foram similares para ambas às amostras, com destaque para os isolados *E. faecalis*. Os isolados clínicos apresentaram maior porcentagem de genes e fenótipo de resistência do que os de alimento, exceto para o gene *tet(L)*. Os *E. faecium* clínicos apresentaram maior incidência de resistência aos antimicrobianos avaliados. Estes resultados indicam a importância dos enterococos de alimento como um potencial veículo alimentar de transporte de genes de virulência e resistência para a microbiota humana.

PALAVRAS-CHAVE: Enterococos, fatores de virulência, gelatinase, biofilme.

ABSTRACT

Enterococci are bacteria that inhabit the gastrointestinal tract of humans and animals and are clinically important because of their ability to cause nosocomial infections due to their spread of antimicrobial resistance genes. In this study, species of enterococci from food samples (100) and clinical samples (30) were identified by the PCR method. The samples were compared for the presence of five virulence factors (aggregation substance, *asa1*, gelatinase, *gelE*, adhesin, sex pheromone, *cpd* and

cytolysin activator, *cylA*), four resistance genes (tetracycline, *tet(L)*, erythromycin, *erm(B)*, gentamicin, *aac6'aph2'-Ia*, and vancomycin, *vanA*). In addition, the ability to produce gelatinase, biofilm formation and susceptibility to 3 antibiotics (erythromycin, tetracycline and vancomycin) were evaluated. *E. faecalis* (7.0%) and *E. faecium* (61.0%) and three isolates only as *Enterococcus* sp, were present in food, while in clinical samples *E. faecalis* (7.0%) and *E. faecium* (76.7%). It observed the presence of virulence determinants in both samples, being higher for those of food, except for *gelE* gene. The production of gelatinase and formation of biofilm were similar for both samples, with emphasis on *E. faecalis* isolates. Clinical isolates had a higher percentage of genes and resistance phenotype than those of food, except for the *tet(L)* gene. Clinical *E. faecium* had a higher incidence of antimicrobial resistance. These results indicate the importance of food enterococci as a potential food vehicle for transporting virulence genes and resistance to the human microbiota.

KEYWORDS: Enterococci, virulence factors, gelatinase, biofilm.

1. INTRODUÇÃO

Enterococcus sp. são bactéria ácido láctica, cocos Gram-positivos com papel importante na saúde humana e de animal. Esses microrganismos são conhecidos por sobreviver e desenvolver em condições extremas, o que os capacita a habitar vários ambientes^{1,2}.

Os enterococos desempenham um papel importante na melhoria do desenvolvimento de sabor e qualidade, não só de queijo, mas também de outros alimentos fermentados tradicionais e embutidos. Além disso, são utilizados como bactérias ácido lácticas (BAL) produtoras de bacteriocinas¹. Porém os enterococos podem ser encontrados em alimentos por decorrência de contaminação seja fecal, água, solo dentre outros:^{1,2} assim como no ambiente clínico as espécies *E. faecium* e *E. faecalis* são as mais predominantes em diversos queijos da Europa^{1,3}. No Brasil a espécie de enterococos com maior prevalência em queijo é *E. faecium*⁴.

Contudo, sua maior importância está relacionada ao fato de algumas espécies deste gênero serem considerados patógenos oportunistas, provocando diversas doenças. Este fato está intimamente relacionado aos seus fatores de virulência^{5,6,7,8} e resistência intrínseca a diversos antimicrobianos comumente utilizados no tratamento de cocos Gram-positivos^{2,6,7,9}. Dentre as espécies de enterococos, as mais comuns isoladas de hospitais são *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, conhecidas por abrigar uma quantidade maior de fatores de virulência e apresentar uma maior resistência a antimicrobianos, respectivamente².

Entretanto, estudos já encontraram muitos genes responsáveis por codificarem fatores de virulência em isolados de alimento, como por exemplo: substância de agregação, ativador de citolisina, gelatinase, feromônio sexual, proteína de adesão ao colágeno, formação de biofilme dentre outros^{1,4,5,6,10,11}. O mesmo se verificou com os genes de resistência como a eritromicina, tetraciclina, gentamicina, vancomicina e muitos outros^{12,13,14,15,16}, sendo que muitos desses pesquisadores observaram também a resistência desses antimicrobianos por parte dos enterococos provenientes de alimentos.

O surgimento de cepas resistentes a antimicrobianos, aliados ao aumento de sua associação com doenças em humano vem despertando preocupação com o uso de enterococos como probiótico¹. Uma vez que os enterococos de alimentos que apresentem marcadores de virulência e/ou resistência têm a capacidade de transferir estes genes para enterococos presentes no trato gastrointestinal.

Assim sendo, são necessários estudos que busquem investigar os fatores de virulência e resistência, além de avaliar a susceptibilidade destes micro-organismos, obtidos de alimento e de origem clínica, e compará-los, o que pode prover subsídios para a elucidação de possíveis disseminações desta espécie fora do contexto hospitalar. Ainda, poderá servir de base para uma vigilância mais eficaz na produção destes alimentos, uma vez que estes micro-organismos podem representar um potencial fator de risco para a saúde humana.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Material Biológico

Foram analisados 130 isolados de enterococos sendo clínicos (30) e de alimento (100). Os isolados de alimento foram provenientes de queijo minas frescal e os clínicos de diversas fontes, e fazem parte da bacterioteca da profa Dra Luciana Furlaneto-Maia. Os isolados *E. faecium* deste estudo já foram caracterizados quanto a presença de genes de virulência e resistência¹⁷. Os isolados foram estocados em meio ágar Luria-Bertani (LB- Himedia) acrescido de 20% de glicerol e mantidos à -20°C.

Genotipagem de identificação e fatores de virulência

O DNA total foi obtido pela técnica da fervura, segundo proposto por Marques e Suzart (2004)¹⁸. Os isolados foram identificados ao nível de gênero/espécie e determinantes de virulência pela reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os oligonucleotídeos iniciadores, com seus respectivos tamanhos de amplicons (pares de base) (Tabela 1). A cepa ATCC *E. faecalis* 29212 foi utilizada como controle para os marcadores de virulência.

As reações foram realizadas em termociclador Techne-Tc3000, em volume final de 20 µL, contendo 10 µL de DNA, 0,17 mM de cada dNTP, 1 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (Forward e Reverse), 1,0U Taq DNA polimerase (Invitrogen), Tampão da Taq 10X, 2,5 mM de MgCl₂. O programa de amplificação seguiu protocolo descrito por Dutka-Malen et al. (1995). Os amplicons foram separados em gel de agarose a 1,0%, corados com brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta e fotografados com sistema de fotodocumentação computadorizado L-PIX ST (LOCCUS). O tamanho do amplicon foi comparado com o marcador de peso molecular de 1kb (Amersham Pharmacia Biotech).

Fenotipagem dos fatores de virulência

Produção de Gelatinase

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para identificação ao nível de gênero/espécie, genes de virulência e resistência em isolados de *Enterococcus* sp.

Gene	Alvo	Sequência do nucleotídeo (5'- 3') ^a	Produto	Referência
<i>tuf</i>	<i>Enterococcus</i>	TACTGACAAACCATTTCATGATG	112 bp	19
		AACTTCGTCACCAACGCGAAC		
		GGTATCAAGGAAACCTC		
<i>vanc-1</i>	<i>E. gallinarum</i>	CTTCCGCCATCATAGCT	822 bp	
		CTCCTACGATTCTCTTG		
<i>vanc-2</i> , <i>vanc-3</i>	<i>E. casseliflavus</i> <i>E. flavencens</i>	CGAGCAAGACCTTAAG	439 bp	
		ATCAAGTACAGTTAGTCT		20
<i>ddl_{E.faecalis}</i>	<i>E. faecalis</i>	ACGATTCAAAGCTAACTG	941 bp	
		TAGAGACATTGAATATGCC		
<i>ddl_{E.faecium}</i>	<i>E. faecium</i>	TCGAATGTGCTACAATC	550 bp	
		ACTCGGGGATTGATAGGC		
<i>cylA</i>	Citolisina A	GCTGCTAAAGCTGCGT	688 bp	21
		GCACGCTATTACGAACTATGA		
<i>asa1</i>	Substância de agregação	TAAGAAAGAACATCACCACGA	375 bp	22
		AGTTTATGCTATTTTCTTAC		
<i>gelE</i>	Gelatinase	CTTCATTATTACAGTTTG	402 bp	
		AAAAGTAGAATTAGATCCACAC		23
<i>ace</i>	Adesina ao colágeno	TCTATCACATTCGGTTGCG	320 bp	
		TGGTGGGTTATTTTCAATTC		
<i>cpd</i>	Feromônio sexual	TACGGCTCGGCTTACTA	782 bp	5
		GTAGGCTGCGATATCAAAGC		
<i>vana</i>	Vancomicina	CGATTCAATTGCGTAGTCCAA	231 bp	24
		CAGAGCCTTGGGAAGATGAAG	330 bp	
<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>	Gentamicina	CCTCGTGAATTCATGTTCTGGC	348 bp	25
		CATTTAACGACGAACTGGC		
<i>erm(B)</i>	Eritromicina	GGAACATCTGTGGTATGGCG	405 bp	
		GTMGTTGCGGCTATATTC		26
<i>tet(L)</i>	Tetraciclina	GTGAAMGRWAGCCACCTAA	696 bp	

Ta(°C), temperatura de pareamento/(°)M= A or C; R= A or G; W = A or T.

Todos os isolados foram cultivados a 37 °C por 18 horas em meio Ágar Nutriente (AN). Em seguida, a

bactéria foi semeada na superfície do meio AN suplementado com 3% de gelatina. As placas foram incubadas a 28 °C por 24 horas. Zonas claras ao redor das colônias indicam produção da enzima gelatinase. Como controle positivo foi utilizado um isolado clínico de *Serratia marcescens*. O experimento foi conduzido em duplicata.

Tabela 2. Distribuição de fatores de virulência e expressão fenotípica de gelatinase e formação de biofilme entre isolados de enterococos de alimento e clínicos.

Isolados	Fatores de virulência					Ensaio fenotípico	
	Presença de genes de virulência (%)					GEL	BioF
	<i>asa1</i>	<i>gelE</i>	<i>ace</i>	<i>cpd</i>	<i>cylA</i>		
Alimentos							
<i>E. faecalis</i> 36	35 (97,2)	29 (80,5)	36 (100,0)	19 (52,8)	0 (0,0)	18 (50,0)	18* (50,0)
<i>E. faecium</i> 61	39 (63,9)	15 (24,6)	19 (31,1)	5 (8,2)	0 (0,0)	4 (6,5)	4* (6,5)
<i>Enterococcus</i> spp. 3	3 (100,0)	0 (0,0)	2 (66,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Total = 100	77 (77,0)	44 (44,0)	57 (57,0)	24 (24,0)	0 (0,0)	22 (22,0)	22* (22,0)
Clínicos							
<i>E. faecalis</i> 7	5 (71,4)	7 (100,0)	6 (85,7)	5 (71,4)	1 (14,3)	5 (71,4)	5** (71,4)
<i>E. faecium</i> 23	4 (17,4)	13 (56,5)	3 (13,0)	1 (4,3)	0 (0,0)	2 (8,7)	2* (8,7)
Total = 30	9 (30,0)	20 (66,7)	9 (30,0)	6 (20,0)	1 (3,3)	7 (23,3)	7* (23,3)

Formação de biofilme

Os isolados gelatinase positivos, foram cultivadas a 37 °C por 24 horas em meio ágar BHI (Brain Heart Infusion). Em seguida, as células foram suspensas em solução de NaCl 0,85%, até atingirem a turbidez da escala 0,5 de McFarland. Em seguida foram diluídas 1:100 (v/v) em BHI suplementado de 1% glicose. Uma alíquota de 200 µL de cada suspensão foi transferida para placa de poliestireno de 96 poços. As placas foram incubadas a 37 °C por 15 horas. Após o período de incubação, o meio foi removido das placas, e os poços lavados com solução de NaCl (0,85%). As bactérias aderidas foram fixadas a 37 °C por 1 hora e 30 minutos e então coradas com 200 µL de cristal violeta de Hucker por 5 min. O excesso do corante foi retirado e lavado com solução de NaCl (0,85%) esterilizada. Após este período as placas foram submetidas à secagem a 37 °C por 30 minutos.

A formação de biofilme foi determinada pela leitura da densidade óptica foi medida a 540 nm usando um leitor de microplaca (ELx808™ Absorbance Microplate Reader-BioTek). Controle negativo foi o meio BHI sem a presença de células. A intensidade da formação de biofilme foi definida segundo os critérios estabelecidos por Stepanovic²⁷.

Teste de susceptibilidade a antimicrobianos

A susceptibilidade antimicrobiana de isolados dos enterococos foi testado usando método Kirby-Bauer (método disco difusão) em ágar Mueller-Hinton (MHA) para três antimicrobianos (eritromicina-15 µg, tetraciclina-30 µg e vancomicina-30 µg) de acordo com o Clinical Laboratory (CLSI)²⁸. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi usado como cepa controle.

3. RESULTADOS

Todos os isolados foram identificados ao nível de gênero para enterococos. Os 30 isolados clínicos foram identificados por PCR com oligonucleotídeos específicos como sendo de duas espécies *E. faecalis* (7) e como *E. faecium* (23), nas proporções 23,3% e 76,7% respectivamente. Enquanto na amostra de alimentos foram identificadas as espécies *E. faecalis* (36), *E. faecium* (61) e *Enterococcus* spp (3) nas proporções de 36,0%, 61,0% e 3,0% respectivamente (Tabela 2). Em contrapartida não foi identificado *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* e *E. flavescens*.

Em relação aos fatores de virulência, foram encontrados todos os genes avaliados nos isolados de enterococos, sendo que os isolados de alimento tiveram maior frequência de genes de virulência em ordem decrescente *asa1* (77,0%), *ace* (57,0%), *gelE* (44,0%) e *cpd* (24,0%) enquanto que nos clínicos o gene *gelE* (66,7%), *ace* (30,0%), *asa1* (30,0%), *cpd* (20,0%) e por último o *cylA* (3,3%). Não foi observado o gene *cylA* nos isolados de alimento. Para todos os genes de virulência avaliados houve maior incidência na espécie *E. faecalis* (Tabela 2). Nenhum isolado identificado apenas como *Enterococcus* sp apresentaram o gene *gelE*.

A atividade de gelatinase foi analisada em todos os isolados, independente da presença do gene *gelE* no genoma, sendo que a porcentagem da expressão fenotípica da gelatinase foi similar para os enterococos de alimento (22,0%) e clínico (23,3%) (Tabela 2).

A espécie que mais apresentou atividade de gelatinase foi *E. faecalis*, sendo 50,0% nos isolados de alimento e 71,4% nos clínicos. Já a espécie *E. faecium*, apresentou uma frequência de 6,5% e 8,7% para os isolados de alimento e clínicos, respectivamente. Em relação à expressão da enzima gelatinase, alguns isolados apresentaram o gene *gelE*, porém não expressaram a enzima nas condições testadas.

É sabido que a gelatinase também pode estar envolvida com a formação de biofilme, para tal foi selecionado os 29 isolados que expressaram esta enzima (7 clínicos e 22 de alimento) para serem submetidos ao teste de formação de biofilme em superfície abiótica. Todos os isolados foram capazes de formar biofilme (Tabela 2).

Genes= *asa1*: substância de agregação; *gelE*: gelatinase; *ace*= adesina; *cpd*: feromônio sexual; *cylA*: citolisina; BioF: formador de biofilme; *fracamente formador de biofilme. **fortemente formador biofilme.

A distribuição dos genes de resistência *tet(L)*, *erm(B)*, *aac(6')-Ie-aph(2'')*-Ia e *vanA* avaliados pela PCR entre os isolados clínicos e de alimento apresentaram-se em maior frequência nos isolados

clínicos, exceto para o gene *tet(L)* (Tabela 3).

virulências entre as espécies analisadas (Tabela 2).

Tabela 3. Distribuição dos genes de resistência por PCR e expressão fenotípica usando o método de disco-difusão.

Isolados	Genes de resistência				Resistência		
	<i>tet(L)</i>	<i>erm(B)</i>	<i>aac6aph2-Ia</i> ⁺	<i>van(A)</i>	ERY	TET	VAN
Alimentos							
<i>E. faecalis</i> 36	9 (25,0)	0 (0,0)	4 (11,1)	31 (86,0)	7 (19,4)	13 (36,1)	2 (5,5)
<i>E. faecium</i> 61	16 (26,2)	2 (3,3)	0 (0,0)	20 (32,8)	12 (19,7)	2 (3,3)	1 (1,6)
<i>Enterococcus</i> spp.3	3 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (33,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Total = 100	28 (28,0)	2 (2,0)	4 (4,0)	52 (52,0)	18 (18)	15 (15,0)	3 (3,0)
Clínicos							
<i>E. faecalis</i> 7	4 (57,1)	5 (71,4)	1 (14,3)	3 (42,8)	4 (57,1)	2 (28,6)	1 (14,3)
<i>E. faecium</i> 23	3 (13,0)	21 (91,3)	19 (82,6)	22 (95,6)	20 (86,9)	10 (43,5)	18 (78,3)
Total = 30	7 (23,3)	26 (86,7)	20 (66,7)	25 (83,3)	24 (80,0)	12 (40,0)	19 (63,3)

Dos isolados de enterococos trabalhados tem-se que 100,0% e 47,5% dos *E. faecium* e 85,7% e 91,7% dos *E. faecalis* clínicos e alimento, respectivamente abrigaram ao menos um gene de resistência.

Em relação aos genes de resistência analisados houve predomínio nos isolados clínicos para o gene *erm(B)* (86,7%); *vanA* (83,3%); *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* (66,7%). No entanto para os enterococos de alimento houve um predomínio para *tet(L)* (28,0%) em relação aos clínicos com (23,3%).

Dados de expressão de resistência pelo método de disco difusão mostraram uma maior porcentagem de resistência para os isolados clínicos sendo 80,0%, 40,0% e 63,3% para eritromicina, tetraciclina e vancomicina respectivamente, enquanto para os de alimento não ultrapassou 18% dos isolados (Tabela 3). Dentre os isolados clínicos foi observado que 90,0% do enterococos foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano, enquanto que para os oriundos de alimento, 27,0%. Os *E. faecium* clínicos foram os que apresentaram maior resistência aos antimicrobianos avaliados. De maneira geral, tem-se que os isolados clínicos apresentaram maior frequência de resistência aos antimicrobianos avaliados, em relação aos isolados de alimento, sendo a menor resistência nesta amostragem para a vancomicina (3,0%).

4. DISCUSSÃO

As espécies de enterococos mais prevalentes são *E. faecalis* e *E. faecium* em queijos^{3,1,4} e em ambiente hospitalar². Como nossas amostras se tratavam de queijo tipo frescal, provavelmente a presença de enterococos se deu pela contaminação durante o processo de produção. A presença desta bactéria em produtos lácteos também pode ser considerada um indicador de condições sanitárias inadequadas durante a produção e processamento do leite^{3,1}.

Tanto os isolados de alimento como os clínicos foram caracterizados quanto à presença dos genes de virulência para substância de agregação (*asa1*), gelatinase (*gelE*), adesina ao colágeno (*ace*), citolisina (*cylA*) e feromônio sexual (*cpd*). A amplificação dos produtos de PCRs com *primers* específicos revelou distintas porcentagens em relação a fatores de

A substância de agregação, codificada pelo gene *asa1*, é uma proteína de superfície induzida por feromônio de *E. faecalis*, responsável por formar agregados durante a conjugação, promovendo o contato célula-célula doadora com receptora^{1,2}, o que permite a transferência de plasmídeo carregando genes de virulência e resistência. Neste trabalho observamos que este gene foi prevalente entre os isolados de alimento (77,0 %). *E. faecalis* proveniente de alimentos

e amostra clínica foi a espécie predominante para a presença deste gene. Alguns autores também encontraram alta frequência do gene *asa1* em isolados de *E. faecalis* provenientes de queijo⁹ e peixe¹⁶.

O gene *gelE* esteve presente em 44,0% e 66,7% dos enterococos de alimento e clínico, respectivamente. Todos os *E. faecalis* clínicos apresentaram este gene, o mesmo foi observado no trabalho de Zoletti. *et al.* (2010)²⁹.

A gelatinase, codificada pelo gene *gelE*, tem um papel importante na patogenicidade dos enterococos pois fornece nutrientes a bactéria, uma vez que ela é capaz de hidrolisar a gelatina, hemoglobina, caseína, dentre outros compostos, além de participar da formação de biofilme².

Genes: *erm(B)*= eritromicina, *tet(L)*= tetraciclina, *vanA*= vancomicina, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*= gentamicina; resistência: ERY=eritromicina, TET=tetraciclina, VAN= vancomicina.

Franz *et al.* (2001)⁶ sugere que a atividade da gelatinase encontrada em enterococos obtido de queijo, permite que a bactéria utilize o queijo como fonte de aminoácido, uma vez que este alimento é considerado uma fonte de proteínas. Contudo, nem todos os isolados de *E. faecalis* que apresentaram o gene *gelE* foram produtores da gelatinase. Klibi *et al.* (2013)³¹ observaram que todos os enterococos provenientes de alimentos cárneos que apresentaram o gene *gelE* foram produtores da enzima. Em contrapartida, Biavasco *et al.* (2007)³² observaram que nem todos enterococos provenientes de alimentos possuíam o gene *gelE* codificaram a enzima, corroborando com esse trabalho. Estudos realizados por Roberts *et al.* (2004)³³ mostraram que a deleção em uma porção do *locus* da região *fsr*, responsável pela produção da gelatinase, pode explicar o fato de alguns isolados de enterococos apresentarem o gene *gelE* porém não expressarem a atividade enzimática.

Tanto os isolados de alimento quanto os clínicos apresentaram atividade de gelatinase, sendo que houve maior frequência de atividade para *E. faecalis*. Kibi *et al.* (2013)³¹ também observaram uma maior quantidade de isolados de *E. faecalis* apresentando a atividade de gelatinase do que os *E. faecium*. Em contrapartida

muitos autores não observaram a atividade da gelatinase em *E. faecium*, seja para enterococos de alimento^{5,6,4,32} ou clínico^{34,5,32}.

O gene *ace* também foi predominante nos isolados *E. faecalis* de alimentos seguido dos isolados clínicos. Este gene codifica a proteína de adesão ao colágeno, e esteve presente em 90,0% dos *E. faecalis* clínicos analisados por Zoletti *et al.* (2010)²⁹ e 100,0% dos isolados provenientes de alimentos⁴, corroborando com nossos estudos.

O gene que codifica fator de feromônio sexual (*cpd*), importante na conjugação bacteriana foi mais prevalente nos isolados de *E. faecalis* clínicos. Eaton; Gasson (2001)⁵ encontraram o gene feromônio sexual em todos os isolados de *E. faecalis* provenientes de amostras de alimentos e clínicas, porém não observaram em isolados de *E. faecium*, o que difere dos dados obtidos no presente estudo.

O gene responsável por codificar uma ativadora de citolisina, *cylA*, foi encontrado em um único isolado clínico de *E. faecalis*. Martín-Platero⁹ *et al.*, (2009), também não observaram a presença deste gene em enterococos isolados de alimento. Em contrapartida, Aslam *et al.* (2012)¹⁰ e Jahan *et al.* (2014)¹¹ encontraram este gene em enterococos provenientes de alimentos cárneos.

Nossos resultados corroboram com diversos estudos^{4,5,6,11,16,30} sendo que a maior incidência de genes de virulência em isolados de *E. faecalis* mostra o papel desta espécie como um importante patógeno nosocomial dentre os enterococos.

A presença de fatores de virulência em enterococos de alimento, é importante na sobrevivência do mesmo, uma vez que estes fatores os auxiliam na competição com outras bactérias contidas no meio. Já em relação aos clínicos a ocorrência desses marcadores podem favorecer o acesso e permanência desses enterococos em infecções hospitalares.

Apesar dos fatores de virulência ser mais comumente relacionado aos isolados clínicos, este estudo assim como o de Eaton; Gasson, (2001)⁵ e Cariolato *et al.*, (2008)³⁰ vem demonstrando a incidência de fatores de virulência para os isolados de alimentos numa taxa igual ou até maior que os clínicos. Isto é muito preocupante, uma vez que estes fatores de virulência encontrados em enterococos oriundos de alimentos podem ser transferidos por conjugação para enterococos ou até mesmo outras bactérias patogênicas ou não do trato gastrointestinal.

A formação do biofilme necessita de diversos fatores de virulência e um deles é a atividade de gelatinase. A mutação no locus *fsr*, que codifica a enzima gelatinase, reduz a formação de biofilme em isolados enterococos². Já se sabe que há outros fatores de virulência que podem contribuir com a formação do biofilme, como *ebp* (pili associado a formação de biofilme e endocardite)³⁵ e *bee* (intensificador de biofilme em *Enterococcus*)³⁶. O presente estudo corrobora com o descrito por Gomes *et al.* (2008)⁴, que analisaram *E. faecalis* e *E. faecium* provenientes de

alimentos, como não formadores ou fracamente formador de biofilme. Apenas um isolado (clínico) foi fortemente formador de biofilme.

Ao comparar os genes de resistência (*tet(L)*, *erm(B)* e *vanA* e o fenótipo pelo método de disco difusão para tal, têm se que a concordância, foi de 66,0% e 70,0%; 79,0% e 80,0% e 53,0% e 76,7%, para os isolados de alimento e clínicos, respectivamente.

Os genes de resistência *erm(B)*, *vanA* e *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* foram observados em ambas amostras, sendo que houve maior presença nos isolados clínicos, com exceção do *tet(L)*. No estudo de Vignaroli *et al.*, (2011)¹⁵ no qual foram avaliados 11 genes de resistência em isolados oriundos de carnes e fezes de animais observaram que os genes *erm(B)*, *vanA* e *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* estiveram entre os mais frequentemente detectados. Assim como para a prevalência de genes o fenótipo de resistência (eritromicina, tetraciclina e vancomicina) também foi maior para os isolados clínicos, em especial para os *E. faecium*.

Enterococos resistentes a antimicrobiano são amplamente encontrados em diversos tipos de alimentos, e até mesmo em enterococos utilizados como probiótico, em geral eles não apresentam resistência a antimicrobiano clinicamente importantes¹. Porém, estes enterococos resistentes a antimicrobianos, em especial para os enterococos resistentes a vancomicina (VRE) desempenham um papel importante no que diz respeito a transferência destes marcadores de resistência no ambiente, e por conseguinte via cadeia alimentar para animais e seres humanos^{1,3}.

Nieto-Arribas *et al.* (2011)¹³, analisando a susceptibilidade de enterococos isolados de queijos, encontraram uma frequência de resistência para tetraciclina, eritromicina e vancomicina de aproximadamente, 20,0%, 20,0%, e 6,0%, respectivamente. Estes dados foram similares ao encontrados no presente estudo. Em contrapartida Triveldi *et al.*, (2011)¹⁴ não encontraram gene *vanA* e resistência à vancomicina em enterococos de produtos lácteos, sendo que 0,0% dos *E. faecalis* e 7,0% dos *E. faecium* apresentaram resistência a eritromicina.

A incidência do gene *tet(L)* foi maior nos isolados de alimento (28,0% para 23,3% clínicos), porém a frequência de resistência da tetraciclina foi bem maior nos clínicos (Tabela 3). Provavelmente, estes dados sugerem que outros determinantes de resistência para tetraciclina estejam envolvido, tendo em vista que em *Enterococcus* spp., a resistência à tetraciclina é conferida por um ou mais gene *tet*³⁷. Dos genes envolvidos na resistência a tetraciclina foi observado que em amostras de alimento e clínica os mais encontrados foram o *tet(M)* e *tet(L)*³⁸.

Assim como verificado para a tetraciclina, alguns isolados não apresentaram o gene para *erm(B)* e *vanA* porém expressaram resistência no antibiograma. Isto sugere que outros determinantes de resistência estejam envolvidos com este fenótipo, assim como foi visto em

estudos de Vignaroli *et al.*, (2011)¹⁵ onde enterococos resistentes a eritromicina não possuíam nenhum dos três genes relacionados com a eritromicina (*erm(A)*, *erm(B)* e *erm(C)*). Os VRE podem possuir um dos 6 cluster gênicos *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE* e *vanG*, sendo os principais *vanC*, *vanA* e *vanB*².

Para o gene *erm(B)* encontrou-se uma maior frequência para os isolados de amostras clínicas, resultados similares foram obtidos na expressão no antibiograma, no qual 73,3% apresentaram gene para *erm(B)* e resistência para a mesma. Enquanto em trabalhos de Hammad *et al.* (2014)¹⁶ o gene *erm(B)* foi observado em 13 dos 14 enterococos resistente a eritromicina. Assim como o gene *erm(B)* o *vanA* foi mais frequente em isolados clínicos, nos quais também foi encontrada a maior frequência de resistência para vancomicina. O antimicrobiano gentamicina não foi avaliado.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que os isolados de *Enterococcus* provenientes de alimentos apresentaram igual ou maior frequência de genes e expressão de fatores de virulência, quando comparados aos enterococos provenientes de amostras clínicas; já estes abrigaram genes e apresentaram fenótipos de resistência a antimicrobianos importantes. Assim sendo, sugere-se que os alimentos podem ter um papel importante na disseminação de enterococos com potencial virulento por meio da cadeia alimentar de humanos. Este fato pode fornecer riscos à saúde, uma vez que os enterococos podem transferir estes determinantes de risco para enterococos e outras bactérias encontrados na microbiota humana.

AGRADECIMENTOS

Fundação Araucária e CNPq, pelo apoio financeiro; ao Programa de Pós em Microbiologia/UDEL pelo apoio no desenvolvimento do trabalho; ao programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos/UTFPR-Londrina.

REFERÊNCIAS

- [1] Fouquié-Moreno MR, *et al.* The role and application of enterococci in food and health. *Int J Food Microbiol.* 2006; 106(1):1-24.
- [2] Fisher K, Philips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiol.* 2009; 155(6):1749-1757.
- [3] Giraffa G. Enterococci from foods. *FEMS Microbiol Rev.* 2002; 26(2):163-171.
- [4] Gomes BC, *et al.* Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. *Food Microbiol.* 2008; 25(5):668-675.
- [5] Eaton TJ, Gasson MJ. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67(4):1628-1635.
- [6] Franz CMAP, *et al.* Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67(9):4385-4389.
- [7] Kayser FH. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *Int J Food Microbiol Microbiology.* 2003; 88(2-3):255-262.
- [8] Vankerhoven V *et al.* Development of a multiplex PCR for the Detection of *asaI*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl*, genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology.* 2004; 42:4473-4479.
- [9] Martín-Platero AM, *et al.* Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses. Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses. 2009; 132(1):24-32.
- [10] Aslam M, Diarra M S, Checkley S, Bhaychuk V, Masson L. Characterization of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus* spp. isolated from retail meats in Alberta, Canada. *Int J Food Microbiol.* 2012; 156(3):222-230.
- [11] Jahan M, Holley R. Incidence of virulence factors in enterococci from raw and fermented meat and biofilm forming capacity at 25 C and 37 C. *Int J Food Microbiol.* 2014; 170:65-69.
- [12] Huys G, *et al.* Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from food. *App Environ Microbiol.* 2004; 70(3):1555-1562.
- [13] Nieto-Arribas P, *et al.* *Enterococcus* populations in artisanal Manchego cheese: Biodiversity, technological and safety aspects. *Food Microbiol* 2011; 28(5):1-9.
- [14] Triveldi K, *et al.* Virulence factors and antibiotic resistance in enterococci isolated from food-stuffs. *Vet Med.* 2011; 56(7):352-357.
- [15] Vignaroli C. *et al.* Multidrug-resistant enterococci in animal meat and faeces and co-transfer of resistance from na *Enterococcus durans* to a human *Enterococcus faecium*. *Curr Microbiol.* 2011; 62(5):11438-1447.
- [16] Hammad AM, Shimamoto T, Shimamoto T. Genetic characterization of antibiotic resistance and virulence factors in *Enterococcus* spp. from Japanese retail ready-to-eat raw fish. *Food Microbiol.* 2014; 38:62-66.
- [17] Rocha K *et al.* Ocorrência de fatores de virulência e resistência em isolados de *Enterococcus faecium* provenientes de amostras clínicas e de alimentos. *Biosaúde.* 2015; 17(2): 46-54.
- [18] Marques EB, Suzart S. Occurrence of virulence-associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina. *J Med Microbiol* 2004; 53(11):1069-1073.
- [19] Ke D, *et al.* Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(11):3497-3503.
- [20] Dukta-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol.* 1995; 33(1):24-27.
- [21] Creti R, *et al.* Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. *J Med Microbiol.* 2004; 53(1):13-20.
- [22] Galli D, Lottspeich F, Wirth R. Sequence analysis of *Enterococcus faecalis* aggregation substance encoded

- by the sex pheromone plasmid pAD1. *Mol Microbiol.* 1990; 4(6):895-904.
- [23] Mannu L, *et al.* Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *Int J Food Microbiol.* 2003; 88(2-3):291-304.
- [24] Bell IM, Paton JC, Turnidge J. Emergence of vancomycin-resistant enterococci in Australia: phenotypic and genotypic characteristics of isolates. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(8):2187-2190.
- [25] Vakulenko SB, *et al.* Multiplex PCR for detection of aminoglycoside resistance genes in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47(4):1423-1426.
- [26] Gevers D, Danielsen M, Huys G, Swings J. Molecular characterization of *tet(M)* genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry sausage. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69(2):1270-1275.
- [27] Stepanovic S. *et al.* A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods.* 2000; 40:175-179.
- [28] CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing; Twenty-First Informational Supplement Approved standard. M100-S21. 2011; v.31.
- [29] Zoletti GO. *et al.* Characterization of virulence factors and clonal diversity of *Enterococcus faecalis* isolates from treated dental root canals. *Research in Ç~Microbiology.* 2011; 162:151-158.
- [30] Cariolato D, Andrigheto C, Lombardi A. Occurrence of virulence factors and antibiotic resistances in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* collected from dairy and human samples in North Italy. *Food Control.* 2008; 19:886-892.
- [31] Klibi N, *et al.* Species distribution, antibiotic resistance and virulence traits in enterococci from meat in Tunisia. *Meat Sci.* 2013; 93(3):675-680.
- [32] Biavasco F *et al.* VanA-type enterococci from humans, animals, and food: species distribution, population structure, Tn1546 typing and location, and virulence determinants. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73(10):3307-3319.
- [33] Roberts JC *et al.* Molecular epidemiology of the *fsr* locus and of gelatinase production among different subsets of *Enterococcus faecalis* isolates. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(5):2317-2320.
- [34] Elsner HA, *et al.* Virulence Factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Blood Culture Isolates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000; 19(1):39-42.
- [35] Nallapareddy SR *et al.* Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*. *J Clin Invest.* 2006; 116(10):2798-2807.
- [36] Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. Putative surface protein encoded within a novel transferable locus confer a high- biofilm phenotype to *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol.* 2006; 188(6):2063-2072.
- [37] Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2001; 65(2): 232-260.
- [38] Huys G. *et al.* Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from food. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70(3):1555-1562.