

Ocorrência de fatores de virulência e resistência em isolados de *Enterococcus faecium* provenientes de amostras clínicas e de alimentos

Occurrence of virulence factors and resistance in *Enterococcus faecium* isolates from clinical and food samples

Kátia Real Rocha¹, Luciana Furlaneto-Maia², Marcia Regina Terra¹, Giovanna Caroline Santana¹, Alison Henrique Marcelino¹, Márcia Cristina Furlaneto¹

¹Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina-UEL- Paraná, Brasil.

²Departamento de Tecnologia de Alimento, Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, Brasil

Endereço para correspondência:

Profa. Dra. Luciana Furlaneto-Maia

Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Departamento de Tecnologia de Alimento - UTFPR campus Londrina

Av. dos Pioneiros 3131, 86036-370, Londrina, Paraná. Telefone: (43) 3315-6100,

fax: (43) 3315-6121.

E-mail: lucianamaia@utfpr.edu.br

Resumo

Um total de 130 enterococos provenientes de amostras clínicas (n=30) e de alimentos (n=100) foi analisado empregando a metodologia de PCR (reação em cadeia da polimerase) quanto à presença de genes relativos a cinco fatores de virulência (substância de agregação, *asa1*; gelatinase, *gelE*; adesina, *ace*; feromônio sexual, *cpd*; e citolisina, *cylA*) e um gene que confere resistência ao antibiótico vancomicina (*vanA*). A susceptibilidade a vancomicina também foi avaliada. Dos isolados analisados, *E. faecium* foi detectada em 61,0% das amostras de alimentos e 76,7% das amostras clínicas. Observou-se a presença de determinantes de virulência em isolados de ambas as amostras, sendo maior para os isolados provenientes de alimento. Em contrapartida, isolados de *E. faecium* provenientes de amostras clínicas apresentaram maior frequência de presença do gene *vanA* e resistência à vancomicina. Os resultados deste estudo mostram que os alimentos desempenham papel importante na disseminação de enterococos, como reservatório de genes de virulência e resistência, através da cadeia alimentar para os seres humanos.

Palavras-chave: enterococos, gelatinase, vancomicina.

Abstract

A total of 130 enterococci from clinical specimens (n=30) and food (n=100) were analyzed by PCR (polymerase chain reaction) for the presence of genes related to five virulence factors (aggregation substance, *asa1*; gelatinase, *gelE*; adhesin, *ace*, sexual pheromone, *cpd*, and cytolysin, *cylA*) and a gene which confers resistance to the antibiotic vancomycin (*vanA*). The susceptibility to vancomycin was also evaluated. Among the analyzed isolates, *E. faecium* was present in 61.0% in food samples and 76.7% in clinical samples. It was observed the presence of virulence determinants in isolates from both samples, being higher for isolates from food. On the other hand, *E. faecium* obtained from clinical source showed higher frequency of the *vanA*

gene and resistance to vancomycin in relation to those from food. The results of this study show that food samples play an important role in the spread of enterococci, as a reservoir of virulence genes and resistance, through the food chain to humans.

Keys words: enterococci, gelatinase, vancomycin.

INTRODUÇÃO

Enterococcus sp. são cocos Gram-positivos, comensais do trato gastrointestinal de humanos e animais. Atualmente há 54 espécies e 2 subespécies de enterococos^(1,2) descritas. Esses microrganismos são capazes de se desenvolver em condições extremas, possibilitando colonização em vários ambientes^(1,3).

A presença desta bactéria em alimentos é contraditória, pois podem contribuir para o desenvolvimento das características organolépticas do produto⁽³⁾ e apresentar potencial ação na biopreservação contra diversos patógenos alimentares⁽⁴⁾. Porém, sua presença também pode revelar condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, sendo motivo de preocupação para os órgãos de saúde pública⁽⁵⁾. Além disso, sua maior relevância clínica está relacionada ao fato de serem considerados patógenos oportunistas, provocando diversas doenças em humanos.

A espécie de enterococos que tem ganhado destaque é *E. faecium*, sendo relacionada a um aumento de doenças nosocomiais devido à presença de elementos genéticos móveis, resultando no desenvolvimento de uma subpopulação geneticamente distinta, com aptidão de virulência aumentada⁽⁶⁾.

Este fato está intimamente relacionado à presença de diversos genes codificadores de fatores de virulência^(7,8), resistência intrínseca a diversos antimicrobianos incluindo penicilinas, cefalosporinas, aminoglicosídeos e clindamicina^(1,9) e resistência adquirida aos antibióticos cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina, fluorquinolonas e vancomicina^(10,11,12,13).

A resistência de enterococos à vancomicina é uma característica clinicamente relevante, sendo este um dos antibióticos de escolha para o tratamento deste microrganismo⁽¹⁴⁾. Os principais determinantes genéticos de resistência à vancomicina são os genes *vanA* e *vanB*, localizados em transposons e transferíveis horizontalmente, conferindo elevados níveis de resistência⁽¹⁵⁾.

Enterococos resistentes a diversos antimicrobianos já foram isolados de amostras clínicas, alimentos, águas e solo^(14,16,17). Nosso grupo já descreveu a presença de enterococos resistentes a antimicrobianos em alimentos cárneos⁽¹⁸⁾, vegetais⁽¹⁹⁾, e produtos lácteos⁽²⁰⁾, mostrando que os alimentos servem de reservatório para a disseminação desta bactéria.

Dentre os determinantes de virulência associados à patogenicidade de enterococos destacam-se diversas proteínas extracelulares, tais como: substância de agregação, ativador de citolisina, gelatinase, proteína de adesão ao colágeno, além de feromônio sexual e formação de biofilme^(3,21,22,23,24,25).

Frente a este contexto, o objetivo deste trabalho foi comparar a incidência de fatores de virulência e resistência aos antimicrobianos em isolados de *E. faecium* provenientes de amostras clínicas e alimentos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material Biológico

Neste estudo, foram analisadas 130 isolados de *Enterococcus* sp., sendo 100 provenientes de alimento e 30 de amostras clínicas. Os isolados pertencem à bacterioteca da profa Dra Luciana Furlaneto-Maia e encontram-se armazenados em freezer -20°C, no laboratório de Microbiologia Básica e Aplicada da UTFPR-campus Londrina.

Identificação genotípica e determinação da presença dos genes de virulência e resistência

O DNA total foi obtido pela técnica da fervura, segundo protocolo descrito por Marques e Suzart⁽²⁶⁾. A confirmação da espécie *E. faecium*, identificação de marcadores de virulência (citolisina, substância de agregação, adesina ao colágeno, gelatinase e feromônio sexual) e gene de resistência à vancomicina foram realizadas pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os oligonucleotídeos específicos (Tabela 1). O controle se deu pela massa molecular esperada para a espécie. A reação de PCR procedeu em termociclador Techne-Tc3000, em um 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 Life Technologies, EUA), Tampão da Taq 10X, 2,5 mM de MgCl₂. O programa do termociclador seguiu como o descrito por Dutka-Malen et al.⁽²⁷⁾, sendo que a temperatura de hibridação com o oligonucleotídeo correspondente encontra-se na tabela 1. Os produtos resultantes da amplificação foram obtidos em gel de agarose a 1,2%, corados com brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta e fotografados com sistema de fotodocumentação computadorizado L-PIX ST (LOCCUS). O tamanho do produto amplificado foi comparado com o marcador de massa molecular de 1kb (Amersham Pharmacia Biotech).

Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos pelo método de disco difusão em ágar

Todos os isolados confirmados para a espécie *E. faecium* foram submetidos ao teste de suscetibilidade pelo método de Kirby e Bauer para o antimicrobiano vancomicina (30 µg), seguindo as recomendações do Clinical and Laboratory Standard Institute⁽³²⁾ (CLSI, 2011). A cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para identificação da espécie *Enterococcus faecium* e detecção de genes de virulência e resistência.

Gene	Sequência nucleotídica (5'-3') ^a	Ta (°C)	Produto (bp)	Referências
<i>ddl</i> _{E.faecium}	TAGAGACATTGAATATGCC TCGAATGTGCTACAATC	56	550	27
<i>cylA</i>	ACTCGGGGATTGATAGGC GCTGCTAAAGCTGCGCTT	54	688	28
<i>asa1</i>	GCACGCTATTACGAACATATGA TAAGAAAGAACATCACACGA	56	375	29
<i>gelE</i>	AGTTCATGTCTATTTTCTTAC CTTCATTATTACACGTTTG	56	402	30
<i>ace</i>	AAAGTAGAATTAGATCCACAC TCTATCACATTCGGTTGCG	56	320	
<i>cpd</i>	TGGTGGGTTATTTTCAATTC TACGGCTCTGGCTTACTA	50	782	21
<i>vanA</i>	GTAGGCTGCGATATTCAAAGC CGATTCAATTGCGTAGTCCAA	56	231 <i>E.faecium</i> 330 <i>E.faecalis</i>	31

Genes= *ddl*_{E.faecium}: *E.faecium*; *asa1*: substância de agregação; *gelE*: gelatinase; *ace*= adesina; *cpd*: feromônio sexual; *cylA*: citolisina; *vanA*: vancomicina. Ta(°C), temperatura de pareamento. ^(a) M= A ou C; R= A ou G; W = A ou T

RESULTADOS

Do total de isolados analisados, *E. faecium* foi confirmado em 76,7% e 61,0% das amostras clínicas e alimentos, respectivamente. Em relação à presença de fatores de virulência, 60,9% dos isolados totais apresentaram pelo menos um gene de virulência (Tabela 2), com exceção do gene *cylA*, que não foi detectado em nenhum dos isolados analisados.

Os isolados provenientes de amostras de alimentos apresentaram porcentual maior da presença de fatores de virulência quando comparados com os isolados clínicos. Embora tenham apresentado o gene *vanA* em mais de 50% dos isolados, foram pouco resistentes a este antimicrobiano no teste de disco difusão (Figura 1). Já os isolados clínicos apresentaram maior prevalência na presença do gene *vanA*, bem como 78,3% dos isolados foram resistentes à vancomicina.

Tabela 2. Distribuição de fatores de virulência entre *E. faecium* de alimento e clínicos.

Isolados	Presença de genes de virulência (%)				
	<i>asaI</i>	<i>gelE</i>	<i>ace</i>	<i>cpd</i>	<i>cylA</i>
Alimentos (61)	39 (63.9)	15 (24.6)	19 (31,1)	5 (8.2)	0 (0.0)
Clínicos (23)	4 (17.4)	13 (56.5)	3 (13.0)	1 (4.3)	0 (0.0)

Genes= *asaI*: substância de agregação; *gelE*: gelatinase; *ace*= adesina; *cpd*: feromônio sexual; *cylA*: citolisina.

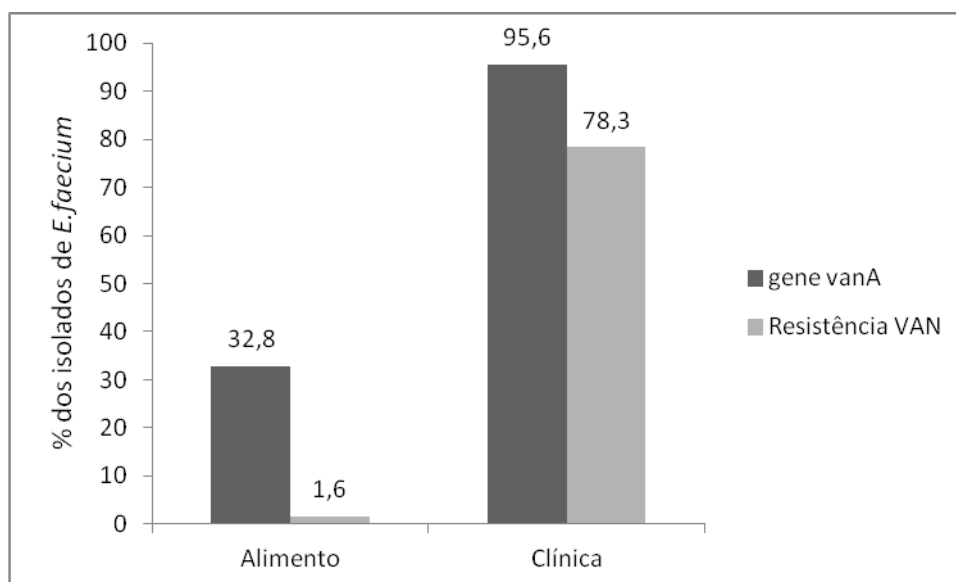


Figura 1. Porcentagem de isolados de *E. faecium* provenientes de amostras de alimento e clínica quanto à presença do gene *vanA* e resistência a vancomicina.

DISCUSSÃO

Neste estudo detectamos que *E. faecium* esteve presente em um percentual considerável de amostras clínicas e de alimentos, albergando diversos genes de virulência bem como resistência à vancomicina.

Diversos autores também relataram a presença de *E. faecium* em amostras de alimentos^(3,23,18,19). A elevada prevalência de enterococos em alimentos prontos para o consumo pode ser atribuído pela sua capacidade de sobrevivência a altas temperaturas e salinidade extrema, além de indicar condições higiênico-sanitárias deficientes no preparo desses alimentos^(33,34).

Ainda não está bem elucidado qual o papel dos enterococos em alimentos, porém é de importância crucial avaliar a presença deste microrganismo em alimentos, bem como seus fatores de virulência e resistência, uma vez que estes podem estar relacionados à epidemiologia deste gênero^(21,35,36). Esta afirmativa corrobora com nossos resultados, uma vez que verificamos que os isolados provenientes de alimentos apresentaram maior prevalência de genes de virulência quando comparados com os isolados clínicos; ainda, metades desses isolados apresentaram gene de resistência à vancomicina.

Ainda, embora muitos fatores de virulência sejam considerados característicos da espécie *E. faecalis*, encontramos a presença destes genes em isolados de *E. faecium*, tanto de origem clínica quanto de alimento, corroborando com os resultados relatados por outros autores^(13,37).

O gene *cylA*, responsável pela citolisina, não foi observada nos isolados analisados neste estudo; porém, alguns autores encontraram este gene em enterococos provenientes de alimentos^(24,25).

Os enterococos resistentes à vancomicina (VRE) em ambiente hospitalar são de suma importância, uma vez que limitam a terapia no tratamento de infecções. Caiaffa Filho et al⁽³⁸⁾ relataram a presença do gene *vanA* em todos os isolados clínicos de *E. faecium* do hospital das Clínicas de São Paulo.

É sabido que enterococos de alimento também apresentam resistência a antimicrobianos. Gomes et al⁽²³⁾ observaram que apenas 2% dos *E. faecium* de alimentos foram resistentes à vancomicina, corroborando com nossos resultados.

A ocorrência de marcadores de virulência em enterococos provenientes de alimentos pode ser importante na sobrevivência do mesmo, uma vez que estes fatores auxiliam na competição com outras bactérias contidas no meio. Enquanto para os isolados clínicos a presença de fatores de virulência fortalece o conceito de que estes genes reforcem a evolução da doença, facilitando o acesso e alojamento dos enterococos nas infecções. A presença e a expressão de determinantes relacionados à vancomicina nos isolados de alimento evidenciam aspectos prejudiciais, embora uma pequena parcela tenha apresentado resistência a este antimicrobiano.

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que os alimentos podem ter um papel importante na disseminação de enterococos com potencial virulento por meio da cadeia alimentar de humanos.

AGRADECIMENTOS

Fundação Araucária e CNPq, pelo apoio financeiro; ao Programa de Pós em Microbiologia/Uel pelo apoio no desenvolvimento do trabalho; ao programa de Pós graduação em Tecnologia de Alimentos da UTFPR campus MD/CM.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fisher K, Philips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiol*, 155: 1749-1757, 2009.
2. Euzéby, JP. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *Inter J System Bacteriol*, 47: 590-592, 1997. (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Disponível em <<http://www.bacterio.net>>, acesso em 22.mar. 2016
3. Fouquiér-Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L. The role and application of enterococci in food and health. *Int J Food Microbiol*, 106: 1-24, 2006.
4. Ogaki MB, Furlaneto MC, Furlaneto-Maia L. General aspects of bacteriocins. *Braz J Food Technol*, 18: 267-276, 2015.
5. Moraes PM, Perini LM, Todorov SD, Silva Jr, Franco BD, Nero LA. Bacteriocinogenic and virulence potential of *Enterococcus* isolates obtained from raw milk and cheese. *J Appl Microbiol*, 113: 318-328, 2012.
6. Willems RJL, Hanage WP, Bessen DE, Feil EJ. Population biology of Gram-positive pathogens: high-risk clones for dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*, 35: 872-900, 2011.
7. Kayser FH. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *Int J Food Microbiol*, 88: 255-262, 2003.
8. Vankerhoven V, Autgaerden TV, Vael C, Lammens C, Chapelle S, Rossi R, Jabes D, Goossens H. 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*. *J Clin Microbiol*, 42: 4473-4479, 2004.
9. Martín-Platero AM, Valdivia E, Maqueda M, Martínez-Bueno M. Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses. *International Int. J. Food Microbiol*, 132:24-32, 2009.
10. Nieto-Arribas, P.; Seseña, S.; Poveda, J.M.; Chicon, R.; Cabezas, L. Palop, L. *Enterococcus* populations in artisanal Manchego cheese: Biodiversity, technological and safety aspects. *Food Microbiol*, 28: 1-9, 2011.
11. Triveldi K, Cupakova C, Karpiskova R. Virulence factors and antibiotic resistance in enterococci isolated from food-stuffs. *Vet Med*, 56: 352-357, 2011.
12. Vignaroli C, Zandri G, Aquilanti L, Pasquaroli S, Biavasco F. Multidrug-resistant enterococci in animal meat and faeces and co-transfer of resistance from *na Enterococcus durans* to a human *Enterococcus faecium*. *Curr Microbiol*, 62: 11438-1447, 2011.

- 13.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*, v.38, p. 62-66, 2014.
- 14.Tripathi A, Shukla SK, Singh A, Prasad KN. Prevalence, outcome and risk factor associated with vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* at a Tertiary Care Hospital in Northern India. *Indian J Med Microbiol*, 36:38-45, 2016.
- 15.Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall G. Vancomycin-Resistant Enterococci *Clin Microb Rev*,13:686-707, 2000.
- 16.Frazzon APG, Gama BA, Hermes V, Bierhals CG, Pereira RI, Guedes AG, D'azevedo PA, Frazzon J. Prevalence of antimicrobial resistance and molecular characterization of tetracycline resistance mediated by *tet(M)* and *tet(L)* genes in *Enterococcus* spp. isolated from food in Southern Brazil. *W J Microbiol Biotechnol*, 26: 365–370, 2010.
- 17.Cassenego APV, Ribeiro A, Frazzon J, Van Der Sand ST, D'Azevedo P, Frazzon APG. Species distribution and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from broilers infected experimentally with *Eimeria* spp. and fed with diets containing different supplements. *Braz J Microbiol*, 42: 480-488, 2011.
- 18.Giraldi, C. *Enterococcus* isolados de alimentos: caracterização molecular e perfil de resistência a antimicrobianos. 2014. 49 fls. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimento)- Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2014.
- 19.Tormen, SH. *Enterococcus* spp. isolado de vegetais: perfil de sensibilidade a antimicrobianos e formação de biofilme. 2016. 73 fls Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimento)- Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2016.
- 20.Furlaneto-Maia L, Rocha KR, Henrique FC, Giazzi A, Furlaneto MC. Antimicrobial resistance in *Enterococcus sp* isolated from soft chesse in Southern Brazil, *Adv Microbiol*, 4: 175-181, 2014.
- 21.Eaton, T.J; Gasson, M.J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic Exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol*, 67:1628-1635, 2001.
- 22.Franz CMAP, Muscholl-Silberhorn AB, Yousif NMK, Vancanneyt M, Swings J, Holzapfel WH. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl Environ Microbiol*, 67: 4385-4389, 2001.
- 23.Gomes BC, Esteves CT, Palazzo ICV, Darini ALC, Felis GE, Sechi LA, Franco BDGM, Martinis ECP. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. *Food Microbiol*, 25: 668-675, 2008.

24. Aslam M, Diarra MS, Checkley S, Bohaychuk V, Masson L. Characterization of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus* spp. isolated from retail meats in Alberta, Canada. *Int J Food Microbiol*, 156: 222–230, 2012.
25. JAHAN M, HOLLEY R. Incidence of virulence factors in enterocci from raw and fermented meat and biofilm forming capacity at 25°C and 37°C. *Int J Food Microbiol*, 170: 65-69, 2014.
26. Marques EB, Suzart S. Occurrence of virulence-associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina. *J Med Microbiol*, 53: 1069-1073, 2004.
27. Dutka-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*, 33: 24–27, 1995.
28. Creti R., Imperim M, Bertuccini L, Fabretti F, Oreficig G, Di Rosa R, Baldassarri L. Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. *J Med Microbiol*, 53: 13-20, 2004.
29. Galli D, Lottspeich F, Wirth R. Sequence analysis of *Enterococcus faecalis* aggregation substance encoded by the sex pheromone plasmid pAD1. *Mol Microbiol*, 4: 895–904, 1990.
30. Mannu, L.; Paba, A.; Daga, E.; Comunian, R.; Zanetti, S.; Dupre, I.; Sechi, L.A. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *Int J Food Microbiol*, 88: 291-304, 2003.
31. Bell IM, Paton JC, Turnidge J. Emergence of vancomycin-resistant enterococci in Australia: phenotypic and genotypic characteristics of isolates, *J Clin Microbiol*, 36: 2187–2190, 1998.
32. CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing; Twenty-First Informational Supplement Approved standard M100-S21, v.31, 2011.
33. GIRAFFA, G. Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews*, 26: 163-171, 2002.
34. Jurkovič D, Križková L, Dušinský R, Belicová A, Sojka M, Krajčovič J, Ebringer L. Identification and characterization of enterococci from bryndza cheese. *Lett Appl Microbiol*, 42: 553–559, 2006.
35. Zanella RC, Valderato F, Lovgren M, Tyrrel GJ, Bokermann S, Almeida S.C, Vieira VS, Brandileone M.C. First confirmed case of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* with vanA phenotype from Brazil: isolation from meningitis case in São Paulo. *Microb Drug Resist*, 5: 159–162, 1999.

36. 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*, 19: 886-892, 2008.
37. Billstrom H, Lund B, Sullivan A, Nord CE. Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*. *Int J Antimicrob Agents*, 32: 374-377, 2008.
38. Caiaffa Filho HH, Almeida GD, Oliveira GA, Sarahyba L, Mamizuka EM, Burattini MN. . Molecular Characterization of *Van* Genes Found in Vancomycin-Resistant *Enterococcus* spp. Isolated from Hospital das Clínicas, FMUSP, São Paulo, Brazil. *Braz J Infect Dis*, 7: 173-174, 2003.