



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

KÁTIA REAL ROCHA

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

KÁTIA REAL ROCHA

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

Trabalho de dissertação apresentado ao
Programa de Pós-graduação em Microbiologia
da Universidade Estadual de Londrina.

Orientador: Profa. Dra. Márcia Cristina
Furlaneto

Co-orientador: Profa. Dra. Luciana Furlaneto-
Maia

Londrina
2012

KÁTIA REAL ROCHA

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

Trabalho de dissertação apresentado ao
Programa de Pós-graduação em Microbiologia
da Universidade Estadual de Londrina.

Orientador: Profa. Dra. Márcia Cristina
Furlaneto

Co-orientador: Profa. Dra. Luciana Furlaneto-
Maia

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Márcia Cristina Furlaneto
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. Gerson Nakazato
UEL – Londrina - PR

Profa. Dra. Jane Martha Graton Mikcha
UEM – Londrina - PR

Londrina, 29 de fevereiro de 2013.

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

R672a Rocha, Kátia Real.

Análise genotípica e fenotípica de *Enterococcus* spp. provenientes de amostras clínicas e de alimento / Kátia Real Rocha. – Londrina, 2012. 70 f. : il.

Orientador: Márcia Cristina Furlaneto.

Coorientador: Luciana Furlaneto-Maia.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2012.

Inclui bibliografia.

1. Enterococcus – Teses. 2. Bactérias gram-positivas – Teses. 3. Infecções enterocócicas – Teses. 4. Virulência (Microbiologia) – Teses. 5. Genética microbiana – Teses. I. Furlaneto, Márcia Cristina. II. Furlaneto-Maia, Luciana. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IV. Título.

CDU 579.86

*Dedico este trabalho a meus pais
minha irmã por toda força, segurança e
confiança depositada mim.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por ter me iluminado e guiado meus caminhos para chegar até aqui;

Agradeço as minhas orientadoras Márcia Cristina Furlaneto e Luciana Furlaneto-Maia não só pela constante orientação neste trabalho, mas sobretudo, por terem aberto as portas para mim, por todo o incentivo, por terem acreditado e confiado em mim, pela paciência em transmitirem seus conhecimentos, por todas as sugestões que me fizeram crescer como profissional;

À professora Vera Lúcia Dias Siqueira por fornecer material e ajuda para o desenvolvimento deste trabalho;

À professora Eliana Carolina Vespero por fornecer material biológico para o desenvolvimento deste trabalho;

Aos professores André Luiz Martinez de Oliveira e Maria Helena P. Fungaro pela disponibilização de equipamentos de seus laboratórios e suas alunas Emilyn, Lara e Daniele pelo auxílio prestado;

Aos professores e funcionários da Universidade Estadual de Londrina, em especial à professora Luzia Paccola-Meirelles que contribuiu muito para a minha iniciação na vida acadêmica;

Aos amigos de laboratório pela disposição em ajudar, pelos risos, pelas forças e conquistas vividas nestes dois anos de convivência. Declaro à vocês Alane, Daiane, Daniel, Helena, Luis, Osvaldo, Viviane os meus mais sinceros agradecimentos. Em especial a Marcinha por toda a amizade, dedicação e ajuda para comigo, ao Marcelo por todo ensinamento, paciência e disposição prestados e finalmente para a Manu por toda força, carinho, crítica, ajuda, paciência, amizade e modelo de dedicação.

À CAPES pelo apoio financeiro;

Gostaria de agradecer também aos meus amigos que me fizeram sentir como membro integrante de suas famílias, Carla, Carolzinha, Isabel, Keli, Luciana, Lya e Paula, em especial a memória de Carminha por todo o amor e abrigo

“É do buscar e não do achar que
nasce o que eu não conhecia”

Clarice Lispector

ROCHA, Kátia Real. **Análise genotípica e fenotípica de *Enterococcus* spp. provenientes de amostras clínicas e de alimento.** 70f. 2012. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

RESUMO

Enterococcus spp. são cocos Gram-positivos, freqüentemente encontrados na microbiota do trato gastrointestinal de humanos e outros animais. São considerados oportunistas e têm um papel importante nas infecções nosocomiais, abrigando fatores de virulência, resistência a vários antimicrobianos, comumente utilizados em tratamento para Gram-positivos, além de serem capazes de adquirir genes de resistência, o que torna cada vez mais difícil o tratamento destas infecções. Desta forma, técnicas de identificação que possibilitem resultados confiáveis e rápidos são importantes para a caracterização de enterococos, possibilitando um diagnóstico correto em hospitais. Em contrapartida, os enterococos podem ser encontrados em alimentos, como queijos, provavelmente devido à contaminação fecal durante o processamento ou manuseio do mesmo. Os objetivos deste trabalho foram comparar o perfil molecular e fenotípico de fatores de virulência e resistência aos antimicrobianos de isolados provenientes de amostras de queijos e de hospital; correlacionar os dados de identificação e resistência obtidos pelo sistema automatizado MicroScan® com a técnica molecular e o método de disco difusão, respectivamente, nos isolados clínicos; e por fim correlacionar a presença de genes de resistência com dados de antibiograma. No presente estudo foram avaliados 133 isolados provenientes de amostras de queijo fresco (103) e clínicos (30). Nas amostras de alimento foram identificados *E. faecalis* (36,9%); *E. faecium* (59,2%) e *Enterococcus* spp. (3,9%). Estas mesmas espécies foram encontradas nos isolados clínicos, nas proporções 23,3% e 76,7% para *E. faecalis* e *E. faecium* respectivamente. Para estes isolados, a identificação molecular (PCR) teve uma concordância de 90,0% com o método automatizado. Pela análise genotípica (RAPD) os isolados clínicos e de alimento apresentaram-se com uma alta diversidade genética. Os isolados de *E. faecalis* abrigaram, em frequência de isolados, maior quantidade de genes de virulência enquanto os de *E. faecium* apresentaram maiores freqüências de resistência. As concordâncias entre a presença de genes de resistência e sua expressão variaram dependendo do antimicrobiano testado. Tanto os isolados de alimento quanto clínicos apresentaram gene e expressão de resistência para vancomicina, com maior freqüência para os isolados clínicos. Todos os enterococos foram submetidos ao teste de gelatinase no qual as amostras clínicas apresentaram maior atividade desta enzima. Apenas um isolado clínico apresentou-se fortemente formador de biofilme, os demais isolados clínicos e de alimento apresentaram-se como fracamente formadores de biofilme. Os resultados do presente estudo sugerem que o método automatizado necessita de melhoramento quanto a acurácia de identificação de espécies menos isoladas. A presença de genes de virulência e de resistência em isolados de alimentos implica num fator de risco à saúde, uma vez que estes podem transferi-los para enterococos encontrados no trato gastrointestinal de humanos.

Palavra-chave: Enterococos. Fatores de virulência. Resistência a antimicrobianos. Isolados clínicos. Queijos.

ROCHA, Kátia Real. **Genotypic and phenotypic analysis of *Enterococcus* spp. from food and clinical samples.** 2012. 70f. Dissertation (MSc in Microbiology) - State University of Londrina, Londrina, 2012.

ABSTRACT

Enterococcus spp. are Gram-positive cocci, often found in the microbiota of humans and animals gastrointestinal tracts. Are considered opportunistic and have an important role in nosocomial infections, harboring virulence factors, resistance to multiple antimicrobials commonly used in treatment for Gram-positive, in addition to being able to acquire resistance genes, makes it increasingly difficult to treat these infections. Thus, techniques of identification that allow rapid and reliable results are important for the characterization of enterococci allowing a correct diagnosis in hospitals. However, enterococci can be found in traditional cheese, probably due to faecal contamination during processing or handling. The aims of this study were to compare the molecular and phenotypic profile of virulence factors and antimicrobial resistance of isolates obtained from cheese samples and hospital; correlate data identification and resistance obtained by the MicroScan® automated system with molecular techniques and disk diffusion method, respectively, for the clinical enterococci, and finally to correlate the presence of resistance genes with antibiogram data. In the present study we analyzed 133 isolates from cheese samples (103) and the clinical (30). In food samples were identified *E. faecalis* (36.9%); *E. faecium* (59.2%) and *Enterococcus* spp. (3.9%). These same species have been found in clinical isolates in the proportions of 23,3% and 76,7% for *E. faecalis* and *E. faecium*, respectively. For these isolates the molecular identification (PCR) had a concordance of 90.0% with the automated method. By genotypic analysis (RAPD) clinical isolates and cheese had a high genetic diversity. The *E. faecalis* isolates harbored greater amount of virulence genes while *E. faecium* showed greater frequency of resistance. The concordance between the presence of resistance genes and their expression varied depending on the antimicrobial tested. Both food and clinical isolates showed gene and expression of resistance to vancomycin, with higher frequency for the latter. All enterococci were tested for gelatinase in which the clinical samples showed higher activity of this enzyme. Only one clinical isolate was strongly biofilm-forming, the others clinical and cheese isolated showed up as poor biofilm formers. The results of this study suggest that the automated method needs to be improved for the identification accuracy enterococci less frequently isolated. The presence of virulence genes and resistance in food isolates implies a risk factor to health, since they can transfer them to enterococci found in the gastrointestinal tract of humans.

Keywords: Enterococci. Virulence factors. Antibiotic resistance. Clinical isolates. Cheese.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão de Literatura

- Figura 1** –Modelo da expressão da citolisina em *E.faecalis* 18
- Figura 2** –Esquema mostrando os genes relacionados com a expressão da gelatinase22

Parte 1

- Figura 1** –Dendrograma de similaridade genética, com base no índice de Jaccard, dos enterococos provenientes de amostras clínicas utilizando os oligonucleotídeos P4 e OPA17.....49
- Figura 2** –Dendrograma de similaridade genética, com base no índice de Jaccard, de enterococos provenientes amostras de alimento utilizando os oligonucleotídeos P4 e OPA17.....50
- Figura 3** –Distribuição dos fatores de virulência entre amostras de enterococos provenientes de alimento e clínicas.....51
- Figura 4** –Distribuição de genes de resistência e sua expressão em enterococos de alimento e clínicos.....51
- Figura 5** –Distribuição da frequência em porcentagens de expressão da gelatinase entre os enterococos de alimento e clínicos.52
- Figura 6** –Formação de biofilme por isolados de enterococos provenientes de amostras clínicas e alimento52

Parte 2

- Figura 1** –Agarose gel electrophoresis of polymerase chain reaction (PCR) amplification of *Enterococcus* sp. gene67

LISTA DE TABELAS

Parte 1

- Tabela 1** – Oligonucleotídeos utilizados para identificação de *Enterococcus* spp., detecção de diferentes genes de virulência e resistência por PCR.....47
- Tabela 2** – Identificação pela PCR dos isolados de enterococos provenientes de queijo48

Parte 2

- Tabela 1** – Primers used in this study for identification of *Enterococcus* spp.s and detection of different resistance genes by PCR64
- Tabela 2** – Identification of clinical strain for automated systems and molecular method.....65
- Tabela 3** – Antibiotic resistant phenotypes of *Enterococcus* species isolated and resistant genes detected.66

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	12
3	REVISÃO DE LITERATURA	13
3.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DO <i>Enterococcus spp.</i>	13
3.2	IDENTIFICAÇÃO DE <i>Enterococcus spp.</i>	14
3.3	PATOGENICIDADE EM <i>Enterococcus spp.</i>	15
3.3.1	Resistência a Antimicrobianos.....	16
3.3.2	Fatores de Virulência em <i>Enterococcus spp.</i>	17
3.3.2.1	Fermônio e superóxido extracelular.....	17
3.3.2.2	Citolisina	19
3.3.2.3	Substância de agregação	19
3.3.2.4	Adesinas	20
3.3.2.5	Proteína de superfície- ESP.	20
3.3.2.6	Biofilme	21
3.3.2.7	Gelatinase	22
3.3.2.8	Hialuronidade	23
3.3.2.9	Cápsula	23
3.3.2.10	Pili.....	23
3.4	<i>Enterococcus spp</i> EM ALIMENTOS	23
	REFERÊNCIAS	26
PARTE 1	Ocorrência de fatores de virulência e resistência de <i>Enterococcus spp</i> isolados de amostras clínicas e de alimento	30
PARTE 2	Comparison between automated system and molecular analysis for Identification and susceptibility testing of <i>Enterococcus spp</i>	53
	CONCLUSÕES	68

1 INTRODUÇÃO

Enterococcus spp. são cocos Gram-positivos de cadeias curtas, conhecidos como bactérias ácido lácticas, e que são encontrados no trato gastrointestinal de humanos e vários outros animais. Este gênero apresenta cerca de 40 espécies, conseguindo sobreviver em condições extremas, podendo ser encontrados também em água, solo, vegetais dentre outros. Estas características, aliada a produção de bacteriocinas, fazem destes um alvo importante na indústria de alimentos, seja na produção de alimentos fermentados ou uso como probióticos. Podem também ser encontrado em alimentos, como resultado da contaminação fecal ou através do processamento e/ou transporte.

Em contrapartida, os enterococos são considerados oportunistas e têm um papel importante nas infecções nosocomiais, pelo fato de poderem adquirir resistências aos antimicrobianos comumente utilizados no tratamento de cocos Gram-positivos, o que está relacionado diretamente com sua facilidade de adquirir genes de resistência mediado por elementos genéticos móveis. Na prática clínica, as espécies deste gênero mais comumente encontradas são *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*. Algumas cepas de *E. faecalis*, e muitas de *E. faecium* são resistentes a múltiplos antimicrobianos. Aliados a isso, os enterococos são conhecidos também por abrigar vários fatores de virulência em seu genoma em especial para as cepas de *E. faecalis*. Por terem adquirido resistência a altos níveis de aminoglicosídeos e a glicopeptídeos, como a vancomicina, os enterococos devem ser identificados e caracterizados rapidamente em pacientes hospitalizados.

A identificação e caracterização de resistência de enterococos nos hospitais são realizadas muitas vezes por métodos automatizados, sendo estes nem sempre fidedignos. Outra possibilidade na identificação e marcadores de resistência é a utilização de técnicas moleculares, como a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), muito utilizada em laboratórios de pesquisa para identificação de diversos micro-organismos. Esta permite amplificação de genes com utilização de oligonucleotídeos específicos para a identificação de gênero, espécie, fatores de virulência e resistência dentre outros. Esta técnica proporciona resultados mais confiáveis na identificação de espécies e marcadores que conferem potencial risco, em relação aos métodos automatizados.

2 OBJETIVOS

Determinar e comparar características genóticas e fenotípicas de fatores de virulência e resistência a antimicrobianos de *Enterococcus* spp. provenientes de alimento e de amostras clínicas. Além de verificar a similaridade genética dos entre estes isolados;

Comparar a identificação e o teste de susceptibilidade obtido pelo sistema automatizado com o método molecular e de disco-difusão, respectivamente.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO *Enterococcus* spp.

Primariamente classificados como estreptococos do grupo D, eles diferem da maioria dos estreptococos em vários testes *in vitro*. *Enterococcus* foram distinguidos como gênero em 1984, com base em estudos de homologia de DNA e em evidências filogenéticas, e reforçado pelo seqüenciamento de DNA da região 16S rRNA e/ou estudos de hibridização DNA-DNA (revisado por FOULQUIÉ MORENO et al., 2006). Tem sido proposto até o momento cerca de 40 espécies para o gênero (EUZÉBIER, 2011).

O gênero *Enterococcus* consiste de cocos Gram-positivos que podem surgir isolados ou em cadeias, também conhecidos como bactérias ácido lácticas (BAL), por conter em seu genoma um baixo teor de G+C de 50 mol % (revisado por FISHER; PHILIPS, 2009) e são homofermentativos, sendo capazes de fermentar uma variedade de carboidratos incluindo a sacarose, L-arabinose, sorbose, dentre outros (FRANZ et al., 2003). São bactérias anaeróbias facultativas, catalase negativas, oxidase negativas, hidrolisam a esculina na presença de 40% de sais biliares. A temperatura ótima de crescimento situa-se entre 35 °C a 37 °C, no entanto podem crescer a temperaturas de 5 °C e 50 °C. São capazes de sobreviver a várias condições ambientais adversas, tais como, elevadas concentrações salinas, como 6,5% de cloreto de sódio; valores extremos de pH (4 a 9,9) e elevadas temperaturas, sendo capazes de sobreviver a 60 °C durante 30 minutos (revisado por FOUQUIÉ-MORENO et al., 2006; revisado por FISHER; PHILIPS, 2009; HOLT et al., 1994).

Os enterococos constituem a microbiota do trato gastrointestinal de humanos e outros animais, podendo também colonizar a cavidade oral, o sistema genito-urinário e a pele (SOOD et al., 2008). Podem também ser encontrados colonizando outros nichos como solo, água, plantas e alimento (EATON; GASSON, 2001; revisado por GIRAFA, 2002). Alguns são quase exclusivamente de origem agrícola ou veterinária (LEVISON; MALLELA, 2000).

Dentre as espécies de enterococos se destacam: *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. hirae*, *E. mundtii*, *E. avium* e *E. raffinosus*, sendo estas últimas raramente encontradas em amostras clínicas

(LEVISON; MALLELA, 2000). Para a diferenciação entre as espécies são necessários testes fenotípicos selecionados, como por exemplo: produção de ácido sulfídrico, pigmentação, hidrólise da arginina e hidrólise do hipurato entre outros (HOLT et al., 1994).

Devido a sua alta tolerância ao calor e sobrevivência em condições ambientais extremas, as bactérias do gênero *Enterococcus*, podem colonizar diversos nichos, revisado por Giraffa, (2002), sendo capazes de causar doenças em humanos por diversas rotas de contaminação cruzada, como fontes hospitalares, ambientais e alimentos.

3.2 IDENTIFICAÇÃO DE *Enterococcus Spp.*

Enterococcus spp. são rotinamente identificados através de testes convencionais baseados em características bioquímicas ou mesmo por sistemas automatizados. Os sistemas automatizados mais utilizados são o Vitek®, o Microscan® e o Pasco®, entretanto, em várias situações, seu uso leva à obtenção de identificações errôneas que necessitam ser esclarecidas por métodos alternativos (D'AZEVEDO et al., 2004) ou até mesmo pela técnica de PCR.

Métodos de identificação convencionais, são baseados em crescimento em meio de cultura e necessitam de 2 a 3 dias para fornecer resultados. PCR é um técnica que permite a identificação independente da cultura de enterococos em uma variedade de amostras clínicas e é capaz de produzir resultados em apenas algumas horas. A PCR é capaz de detectar todos os enterococos clinicamente importantes e tem potencial para uso em laboratórios de microbiologia clínica (KE et al., 1999).

3.3 PATOGENICIDADE EM *Enterococcus spp.*

No final dos anos 70, antes da identificação de cepas resistentes a múltiplos antibióticos, os enterococos eram considerados bactérias inofensivas, com exceção de enterococos que causam endocardite (KAYSER, 2003). Porém atualmente o gênero *Enterococcus* se destacou como um potencial agente patogênico nosocomial, devido à sua crescente participação nas infecções hospitalares, principalmente por apresentarem resistência intrínseca aos principais

grupos de antimicrobianos e mecanismos de resistência adquirida (MAIETTI et al., 2007). Os altos níveis de resistência a antibióticos suportam e reforçam o papel dos enterococos como oportunistas efetivos em infecções nosocomiais.

De todas as espécies que se conhece de enterococos as duas mais importantes e freqüentes em humanos são *E. faecalis* e *E. faecium*, causadoras de várias infecções humanas, incluindo endocardite, bacteremia, septicemia, infecção no trato urinário, infecção de ferida, sepse neonatal e meningite. A espécie *E. faecalis* é mais comumente associada com infecção clínica enquanto *E. faecium* está relacionada com a maioria das outras infecções enterocócica por possuir elevada resistência a antibióticos (revisado por GIRAFFA, 2002; FISHER; PHILIPS, 2009). Há outras espécies de enterococos encontradas em infecções clínicas, porém em menores proporções, são elas: *E. durans*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. raffinosus* e *E. hirae* (revisado por KAYSER, 2003).

3.3.1 Resistência a Antimicrobianos

Enterococos tornaram-se importantes patógenos nosocomiais, tendo em vista que podem causar infecções em pacientes comprometidos e contêm resistência intrínseca à diversos antimicrobianos utilizados habitualmente no tratamento das infecções causadas por bactérias Gram-positivas, sendo naturalmente resistentes à cefalosporinas (LEVISON; MALLELA, 2000). A resistência pode ocorrer por mutação de gene cromossomal ou pela transferência de determinantes de resistência. Exemplos de resistência adquirida ou por mutação são: a resistência às tetraciclina, macrolídeos, cloranfenicol, glicopeptídeos e altas concentrações de aminoglicosídeos; e aminopenicilina através de alterações na proteína de ligação a penicilina, fluoroquinolonas e rifampicina. Tem se ainda em especial a resistência a alto nível para os aminoglicosídeos, e a resistência à vancomicina e teicoplanina, uma vez que estes agentes são os antimicrobianos de escolha no tratamento de infecções graves por enterococos (revisado por KAYSER, 2003).

A produção de β -lactamase em enterococos também é observada. Resistência à penicilina/ampicilina é atribuída a mutações no gene que codifica a proteína PBP-5, diminuindo assim a afinidade das penicilinas a esta proteína. A aquisição de altos níveis para o aminoglicosídeo estreptomicina é mediada

ribossomalmente ou por inativação da estreptomicina pela enzima adenilato-transferase. Altos níveis de gentamicina são predominantemente resultado da inativação bifuncional da enzima 2'-fosfotransferase/6'-acetiltransferase que confere resistência a gentamicina, mas também a outros tipos de antibióticos com por exemplo a kanamicina. Assim sendo o sinergismo entre estas duas classes de antimicrobianos, no tratamento de infecções, só funciona se o enterococo não for resistente a penicilina e/ou não resistente a altos níveis de aminoglicosídeos (revisado por KAYSER, 2003).

Ambas as espécies de *E. faecalis* e *E. faecium* podem apresentar resistência a vancomicina. Em 1996 foi encontrado o primeiro enterococo resistente a vancomicina (ERV) no Brasil identificado como *E. faecium* (DALLA COSTA et al., 1998). Há seis fenótipos de resistência aos glicopeptídeos conhecidos em enterococos: VanA, B, C, D, E e G que são expressos pela transcrição dos *operons van* localizados tanto em plasmídeos como no cromossomo bacteriano. Destes, Van A e Van B são clinicamente importantes em *E. faecalis* e *E. faecium* sendo que VanA é o tipo mais encontrado. A resistência a VanA se dá pela aquisição do transposon Tn1546 que compreende um operon com 7 genes (*vanH*, *vanA*, *vanX*, *vanR*, *vanS*, *vanY* e *vanZ*). Enquanto a resistência de VanB está relacionada com a mudança do transposon Tn1547 e/ou Tn5382. VanA resulta em resistência a vancomicina e teicoplanina enquanto VanB resulta na resistência apenas a vancomicina (revisado por KAYSER, 2003, revisado por FISHER; PHILIPS et al., 2009). Enterococos resistentes a vancomicina (ERV) freqüentemente expressam resistência adicional a múltiplos antibióticos, incluindo ampicilina, aminoglicosídeos, gentamicina e estreptomicina (SCHOUTEN et al., 2000).

Resistência a antibiótico em enterococos pode ser transferida por feromônios mediados por plasmídios-conjugativos ou transposons. A resistência pode ser passada não somente para os enterococos suscetíveis, mas também para outros patógenos (revisado por FISHER; PHILIPS et al., 2009).

3.3.2 Fatores de Virulência em *Enterococcus* spp.

Há vários fatores de virulência descritos em enterococos incluindo citolisina, feromônio, gelatinase, protease serina, hialuronidase, substância de agregação, proteína de superfície extracelular, outras adesinas envolvidas na

ligação a célula do hospedeiro, formação de biofilme, superóxido extracelular e feromônio sexual (revisado por van REENEN; DICKS, 2011). Muitos dos fatores de virulência encontram-se em ilha de patogenicidade. Dentre os genes de virulência encontrados neste elemento estão: proteína de superfície de enterococos (ESP), *operon* da citolisina, gene da substância de agregação, gelatinase dentre outros. Todos estes genes contribuem para a agregação bacteriana, sobrevivência em neutrófilos, aderência ao tecido do hospedeiro dentre outros.

3.3.2.1 Feromônio e superóxido extracelular

Feromônios são pequenos peptídeos, cromossomicamente codificados, contendo sete a oito aminoácidos de comprimento, secretado por *E. faecalis* que promovem a transferência conjugativa do plasmídeo entre bactérias (revisado por JETT, 1994). Primeiramente a produção de feromônio foi descrita como um agente de indução a aglomeração. Esta substância foi posteriormente redefinida como feromônio sexual, uma vez que é produzida pelas células receptoras para facilitar a transferência de certos plasmídeos conjugativos por células doadoras em *E. faecalis* (revisado por van REENEN; DICKS, 2011).

Alguns feromônios sexuais podem induzir a produção de superóxidos, o que também induz a secreção de enzimas lisossômicas. Taxas de produção de superóxido produzidos por cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* isoladas a partir de infecções de bacteremia e endocardite sugeriu uma associação entre a produção de superóxido extracelular e a capacidade invasiva do organismo (revisado por van REENEN; DICKS, 2011). Uma vez que o superóxido e outras espécies reativas de oxigênio causam dano na membrana intestinal, o que aumenta a habilidade da bactéria atravessar a barreira epitelial da mucosa intestinal (HUYCKE; GILMORE, 1997).

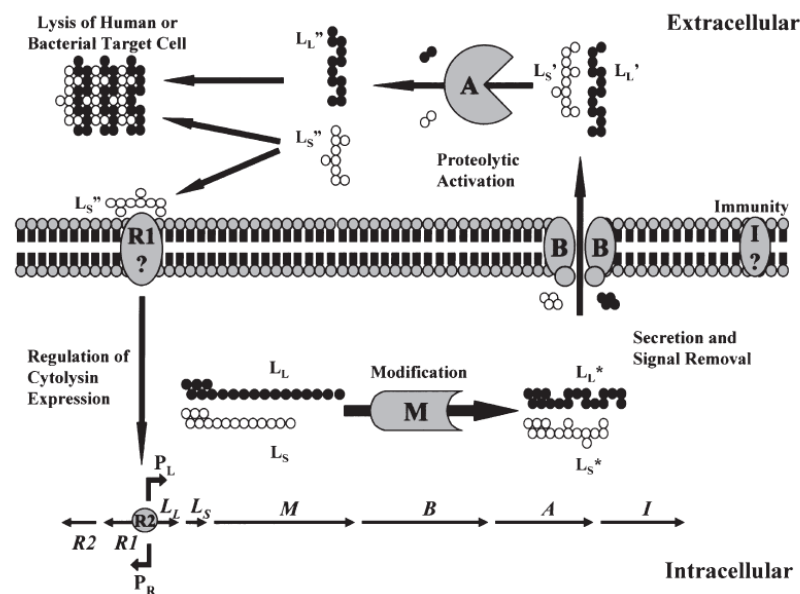
3.3.2.2 Citolisina

É uma toxina hemolítica que têm propriedade β - hemolítica tanto em sangue humano quanto de equino e ação bactericida contra as bactérias Gram-positivas. A citolisina, produzida por *E. faecalis* também lisa células, tanto procarióticas como eucarióticas, apresentando atividade hemolítica contra hemácias

de cavalo, coelho e humano, porém não tem ação em hemácia de carneiro (revisado por COBURN; GILMORE, 2003; DOMIG et al., 2003).

Os genes que codificam a citolisina estão localizados em plasmídeo ou integrados ao cromossomo bacteriano nas ilhas de patogenicidade (revisado por JETT et al., 1994), e quando encontrado em plasmídeos estes são autotransmissíveis e induzíveis por feromônios (SHANKAR et al., 2002; KOCH et al., 2004). Oitos genes estão relacionado à produção da citolisina *cyiL_L*, *cyiL_S*, *cyiM*, *cyiB*, *cyiA* e *cyiI* transcrito em um operon e *cyiR1*, *cyiR2* em um segundo operon. Os produtos codificado por *cyiR1* e *cyiR2* estão envolvidos com a repressão do genes da citolisina (revisado por van REENEN; DICKS, 2011) e são transcritos em direção oposta aos genes já descritos (revisado por COUBURN; GILMORE, 2003) (Figura 1).

Figura 1 - Modelo da expressão da citolisina em *E. faecalis*



Fonte: (COBURN; GILMORE, 2003).

A citolisina é heterodimérica, consistindo de uma subunidade grande (*CyILL*) e outra pequena (*CyILS*) que possuem resíduos de lantionina e são necessárias para atividade hemolítica e de bacteriocina. As subunidades estruturais da citolisina são codificados pelos genes *cyiL_L* e *cyiL_S*. Os produtos desses dois genes são sintetizados e depois modificados pós-transducionalmente pelo produto do terceiro gene do operon, *cyiM*. Após a modificação, ambas as unidades interagem com o produto de *cyiB*. Uma vez que essas subunidades estejam

externalizadas, ocorre a remoção de uma seqüência de seis aminoácidos da região N-terminal de cada um delas pelo produto do gene *cylA* (revisado por van REENEN; DICKS, 2011). A função de *cylI* está relacionada à auto-proteção do micro-organismo contra a ação da sua própria citolisina (revisado por COBURN; GILMORE et al., 2003).

3.3.2.3 Substância de agregação

É uma glicoproteína de superfície induzida por ferômonio que medeia a formação de agregados durante a conjugação, auxiliando assim a transferência de plasmídeos, bem como a adesão a um conjunto de superfícies eucarióticas (revisado por KAYSER et al., 2003; FISHER, PHILIPS et al., 2009). A produção de substância de agregação em células doadoras facilita o contato com células receptoras resultando na conjugação e que resulta na passagem de determinantes de resistência nas células receptoras (revisado por FISHER; PHILIPS et al., 2009).

Esta adesina também promove a sobrevivência intracelular de *E. faecalis* em neutrófilos, impedindo ou retardando a formação do fagolisossomo (revisado por KAYSER, 2003; revisado por FISHER; PHILIPS et al., 2009;). Já se sabe que a substância de agregação também confere adesão às células do tubo renal e aumenta a internalização de enterococos em células intestinais humanas (revisado por KAYSER et al., 2003).

3.3.2.4 Adesinas

As adesinas EFaA e ACE (adesinas) estão envolvidas na patogênese por infecção *E. faecalis*. EFaA apresenta homologia com outras proteínas de superfície presentes no gênero *Streptococcus* e a ACE, proteína de ligação ao colágeno, apresenta semelhança com outras proteínas de superfície de bactérias Gram-negativas (KOCH et al., 2004). Um gene homólogo a *ace*, designado *acm*, contribui para a patogenicidade em *E. faecium* (NALLAPAREDDY et al., 2008) e a proteína codificada por ambos os genes compartilham algumas semelhanças em suas seqüências (revisado por van REENEN; DICKS, 2011). O gene *ace* têm sido determinado expressando durante infecções humanas, enquanto

acm está amplamente difundido em *E. faecium*, embora seja expresso somente em isolados clínicos, sugerindo uma ligação com a virulência (revisado por van REENEN; DICKS, 2011).

Estas adesinas fazem parte da subfamília de adesinas de superfície bacteriana denominada *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules* (MSCRAMMs), a qual se liga especificamente a proteínas da camada da matriz extracelular do hospedeiro (KOCH et al., 2004, revisado por FISHER, PHILIPS et al. 2009).

3.3.2.5 Proteína de superfície- ESP

A proteína de superfície (ESP) é codificada pelo gene cromossomal *esp* que apresenta 5622 pares de bases e está associada à superfície de enterococos (SHANKAR et al., 1999, revisado por FISHER, PHILPIS et al., 2009), apresentando características bioquímicas e funcionais similares à de outras adesinas bacterianas (KOCH et al., 2004). ESP é encontrada em alta frequência em isolados provenientes de infecções (revisado por FISHER, PHILPIS et al., 2009). Acredita-se estar relacionada em promover adesão, colonização e evasão do sistema imune, além de desempenhar algum papel na resistência a antibióticos (revisado por FOULQUIE MORENO et al., 2006).

Alguns estudos indicam sua ação na colonização e persistência no trato urinário e formação de biofilme. Estudos têm demonstrado que a interrupção do gene *esp* prejudica a capacidade *E. faecalis* para formar biofilmes (revisado por FISHER, PHILPIS et al., 2009). Uma variante deste gene também foi detectada em *E. faecium* de isolados clínicos (WILLEMS et al., 2001), mostrando uma alta taxa de conjugação para estas cepas em relação as que não apresentam o gene, além de aumentar a resistência a ampicilina, ciprofloxacina e imipenem (revisado por FISHER; PHILIPS et al., 2009).

3.3.2.6 Biofilme

Ambas espécies *E. faecalis* e *E. faecium* são capazes de produzir biofilmes, que consistem em uma população de células aderidas de forma irreversível em várias superfícies bióticas e abióticas, envoltas em uma matriz

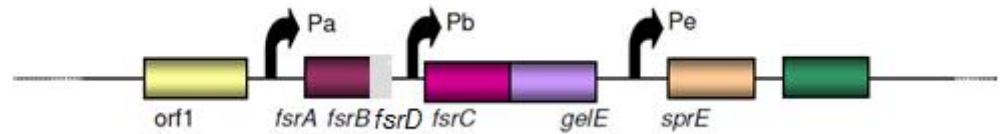
hidratada das substâncias exopolimérica (revisado por MOHAMED; HUANG, 2007). O processo de formação de biofilme é muitas vezes caracterizado como processo temporalmente através de uma série de etapas definidas, incluindo fixação inicial da bactéria ao substrato, formação de micro-colônia, maturação resultando numa estrutura complexa tridimensional, que normalmente contém espaços vazios descritos como canais de água (STOODLEY et al., 2002). A formação de biofilme pelas bactérias é um mecanismo de defesa além de facilitar os processos fisiológicos, protegendo as bactérias de mudanças no pH e agentes antimicrobianos (PAZ, 2007). Em *E. faecalis* o biofilme é um importante fator de virulência, e está intimamente relacionado à proteína ESP (TOLEDO-ARANA, 2001; BORGMANN et al., 2004), já descrita anteriormente.

3.3.2.7 Gelatinase

É uma metalopeptidase hidrofóbica extracelular codificada pelo gene *gelE*, (KOCH et al., 2004), o qual é regulado pela densidade celular. Funcionalmente hidrolisa insulina, fibrinogênio, colágeno, elastina, gelatina, caseína, hemoglobina, glucagon, neurotensinas e outros peptídeos bioativos fornecendo nutrientes para a bactéria (revisado por FISHER; PHILIPS et al., 2009; WATERS et al. 2003), além de apresentar algum papel na formação do biofilme (revisado por FISHER; PHILIPS, 2009).

Após o gene cromossomal *gelE* há o gene *sprE* que codifica uma protease serina também importante na patogenicidade de enterococos. Ambos os genes são regulados positivamente pelo bloco gênico *fsr* (*faecalis streptococci regulator*), no qual sua transcrição está relacionada com o sistema de *quorum-sensing*. O *loci* é composto por quatro genes. Dicionário – Ver dicionário detalhado *fsrA*, *fsrB*, *fsrD* e *fsrC* (Figura 2) (revisado por FISHER; PHILIPS, 2009). A ausência destes genes ou a presença de uma mutação em um ou mais do *loci fsr*, pode comprometer a expressão da gelatinase (QIN et al., 2000; ROBERTS et al. 2004).

Figura 2 - Esquema mostrando os genes relacionados com a expressão da gelatinase.



Open reading frame 1 (orf1), promotores (Pa, Pb e Pe) indicando as direções da transcrição
Fonte: (CAMARGO, 2005).

O feromônio denominado GBAP (*gelatinase biosynthesis activating pheromone*), importante para a expressão da gelatinase em *E. faecalis*, é um peptídeo cíclico possuindo um anel de lactona. O gene *fsrc*, presente no locus *fsrc*, codifica o peptídeo, este por sua vez é transportado para o espaço extracelular pelo produto do gene *fsrc*. O produto do gene *fsrc* provavelmente percebe o acúmulo do peptídeo ativando assim a resposta regulatória e a transcrição de *Fsrc*. Esta por sua vez ativa a expressão da gelatinase e protease serina (NAKAYAMA, et al. 2001; NAKAYAMA, et al., 2006).

Porém, o papel da gelatinase na patogênese parece ser controverso, uma vez que porcentuais elevados de amostras isoladas de quadros infecciosos, bem como aquelas obtidas de colonização em indivíduos saudáveis, comumente expressam esta enzima.

3.3.2.8 Hialuronidase

É uma enzima codificada pelo gene *hyl* que degrada e age sobre o ácido hialurônico e está associada ao dano tecidual, despolimerizando o tecido conjuntivo, facilitando assim a disseminação de enterococos pelo tecido do hospedeiro (revisado por FISHER; PHILIPS et al., 2009).

Seu papel para enterococos ainda permanece incerto (revisado por FISHER; PHILIPS et al., 2009). Esta enzima apresenta homologia com hialuronidase previamente descritas em *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* (HYNES; WALTON, 2000). Estudos realizados em outros micro-organismos, no entanto, fornecem uma base indireta para a especulação de como essa enzima pode contribuir para a virulência de enterococos (revisado por KAYSER, 2003).

3.3.2.9 Cápsula

As cápsulas bacterianas são um importante determinante de virulência, contribuindo para evasão do sistema imune do hospedeiro. Estudos de sorotipagem em *E. faecalis* demonstraram que as cepas do sorotipo C e D mascararam o ácido teicóico impedindo a opsonização pelo anticorpo anti-ácido teicóico, sugerindo a presença de uma cápsula (HUFNAGEL et al., 2004), sendo este codificado por nove genes (*cpsc - cpsK*) (THURLOW, 2009). Sava et al., (2010) comentam que falta informação sobre este polissacarídeo capsular em *E. faecium*.

3.3.2.10 Pili

O pili ou fímbrias na superfície bacteriana são estruturas bem conhecidas em bactérias Gram-negativas. Porém recentemente têm sido observadas estas estruturas em Gram-positivas (TON-THAT et al., 2004; LAUER et al., 2005). Handley; Jacob (1981) analisaram, por microscopia eletrônica, estruturas semelhantes às fímbrias na superfície de *E. faecalis*.

O pili de bactérias Gram-positivas parece estar envolvido na adesão a vários tipos de células humanas, endocardite e na formação de biofilme (ABBOT et al., 2007; NALLAPAREDDY et al., 2006). Até recentemente não havia sido documentado nada a respeito de pili em *E. faecium* porém em estudo feito por Hendrickx et al. (2008) foi visto que esta espécie pode expressar dois tipos diferentes de pili na superfície de uma única célula, dependendo do meio de cultivo e da fase de crescimento.

Dicionário - Ver dicionário detalhado

3.4 *Enterococcus* spp. EM ALIMENTOS

Enterococcus spp. permanece sendo o mais controverso grupo de bactérias ácido láctico (BAL), por estar em alimentos fermentados e terem emergido como patógenos nosocomiais (MAIETTI et al., 2007; revisado por GIRAFFA, 2002; revisado por FOUQUIÉR-MORENO et al., 2006). Os enterococos sendo do grupo BAL, são conhecidos por produzirem bacteriocinas, o que faz deles alvos da

indústria de alimentos, isto é, são ideais para uso como probióticos em alimentos, amadurecimento e desenvolvimento do aroma de certos queijos e embutidos tradicionais, especialmente aqueles produzidos na região do Mediterrâneo (revisado por GIRAFFA, 2002; FRANZ et al., 2003; revisado por FOUQUIÉR-MORENO et al. 2006). As bacteriocinas possuem atividades contra Gram-positivas relativamente próximas. Há algumas bacteriocinas que também apresentam atividade contra algumas bactérias Gram-negativas. A maioria delas tem como alvo principal a membrana citoplasmática. Além disso, os enterococos parecem desempenhar um papel importante na melhoria do desenvolvimento de sabor e qualidade, não só de queijo, mas também de outros alimentos fermentados tradicionais, como legumes e embutidos (revisado por FOULQUIÉ MORENO et al., 2006).

Regulamentos na Europa estipulam que a segurança das cepas probióticas é de responsabilidade do produtor. Por isso, é sugerido que quando se considera uma cepa de enterococos para uso como probiótico, tem que ser cuidadosamente avaliada para a presença de todos os fatores de virulência conhecidos e devem ser sensíveis a antibióticos clinicamente relevantes (FRANZ et al. 2003; revisado por GIRAFFA 2002).

Por outro lado a sua habilidade de sobreviver em condições extremas explica sua capacidade de disseminarem na cadeia alimentar através de animais e alimentos contaminados, como carnes, queijos, salsichas dentre outros produtos que passaram por salga e defumação (revisado por GIRAFFA, 2002). A prevalência de enterococos no leite e queijo há muito tem sido considerada um resultado de condições de higiene inadequadas durante a produção e processamento do leite, como a contaminação direta por fezes de animais e humanas. Sua presença tem sido indiretamente relacionada com fontes de água contaminadas, equipamento de ordenha e tanques de armazenamentos (revisado por FOULQUIÉ MORENO et al., 2006).

Podem causar intoxicação alimentar através da produção de amins biogênicas e podem ser um reservatório para infecções oportunistas (revisado por GIRAFFA, 2002). Aliado a isso tem se que os enterococos resistentes a antimicrobianos não são exclusivamente de cepas clínicas, mas também podem ser encontrado nas indústrias de alimentos. A presença de enterococos resistente à vancomicina (ERV) em indivíduo que não foi anteriormente hospitalizado ou tomado

antibiótico sugere que o ERV foi adquirido através de alimento (revisado por FISHER; PHILIPS, 2009).

REFERÊNCIAS

- ABBOT, E.L. et al. Pili mediate specific adhesion of *Streptococcus pyogenes* to human tonsil and skin. **Cellular Microbiology**, v.9 p.1822–1833, 2007.
- BORGMANN, S. et al. Two episodes of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* outbreaks caused by two genetically different clones in a newborn intensive care unit. **International Journal of Hygiene Environmental Health**, v.207, p.386–389, 2004.
- CAMARGO, I.L.B. Estudo dos fatores de virulência em *Enterococcus* sp. isolados no Brasil. Tese de obtenção de doutorado- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP. Ribeirão Preto, 2005. 106p.
- COBURN, P.S.; GIMORE, M.S. The *Enterococcus faecalis* cytolysin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. **Cellular Microbiology**, v.5, n.10, p.661-669, 2003.
- D'AZEVEDO, P.A. et al. Avaliação de um sistema automatizado na identificação de espécies de *Enterococcus* evaluation of an automated system for the identification of enterococci. **Jornal Brasileiro de Patologia Medica Laboratorial**, v. 40, p. 237-9, 2004.
- DALLA COSTA, L.M. et al.. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: first case in Brazil. **Brazil Journal Infectious Disease**, v.2, p.160-163, 1998.
- DOMIG, K.J.; MAYER, H.K.; KNEIFEL, W. Methods used for the isolation, enumeration, characterization and identification of *Enterococcus* spp.: 2. Pheno-and genotypic criteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.88,p. 165-188, 2003
- EATON, T.J; GASSON, M.J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. **Applied Environmental Microbiology**, v.67, p.1628-1635, 2001.
- EUZÉBIER, J.P. **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature- Genus *Enterococcus*** Disponível em < <http://www.bacterio.cict.fr/e/enterococcus.html> > Acesso em : 30 nov 2011.
- FISHER, K. PHILIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, v.155. p.1749-1757, 2009.
- FOUQUIÉR-MORENO, M.R. et al. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, p. 1-24, 2006.
- FRANZ, C.M.A.P. et al. Enterococci in foods – a conundrum for food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v.88, p.105-122, 2003.
- GIRAFFA, G. Enterococci from foods. **FEMS Microbiology Review**, v.26, p. 163-171, 2002.

HANDLEY, P.S.; JACOB, A.E. Some structural and physiological properties of fimbriae of *Streptococcus faecalis*. **Journal of General Microbiology**, v.127, p. 289–293, 1981.

HENDRICKX, A.P. et al. Expression of two distinct types of pili by a hospital-acquired *Enterococcus faecium* isolate. **Microbiology**, v.154, p. 3212–3223, 2008.

HOLT, J.G. et al. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology-9**. Williams & Wilkins, 1994.

HUFNAGEL, M. et al. Serological and genetic diversity of capsular polysaccharides in *Enterococcus faecalis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.2548–2557, 2004.

HUYCKE, M.M.; GILMORE, M.S. In vivo survival of *Enterococcus faecalis* is enhanced by extracellular superoxide production. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.418, p.781–784, 1997.

HYNES, W.L.; WALTON, S.L. Hyaluronisases of Gram-positive bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v.183, p.201-207, 2000.

JETT, B.D.; HUYCKE, M.M.; GILMORE, M.S. Virulence of enterococci. **Clinical Microbiology Review**, v.7, p. 462-478, 1994.

KAYSER, F.H. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. **International Journal of Food Microbiology** v.88, p.255-262, 2003.

KE, D. et al. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.3497-3503, 1999.

KOCH, S. et al. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. **Vaccine**, v.22, p.822–830, 2004.

LAUER, P. et al. Genome analysis reveals pili in Group B *Streptococcus*. **Science**, v.09, p.105, 2005.

LEVISON, M.E.; MALLELA, S. Increasing Antimicrobial Resistance: Therapeutic Implications for Enterococcal Infections. **Current Infectious Disease Reports**, v.2, p.417-423, 2000.

MAIETTI, L. et al. Incidence of antibiotic resistance and virulence determinants among *Enterococcus italicus* isolates from dairy products. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 30, p. 509-517, 2007.

MOHAMED, J. A.; HUANG, D.B. Biofilm formation by enterococci. **Journal of Medical Microbiology**, v.56, p.1581-1588, 2007.

NALLAPAREDDY, S.R. et al. Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*. **Journal of Clinical Investigation**, v.116, p.2799– 2807, 2006.

NALLAPAREDDY, S. R.; SINGH, K. V.; MURRAY, B. E. Contribution of the collagen adhesion, Acm, to pathogenesis of *Enterococcus faecium* in experimental endocarditis. **Infection and Immunity**. v.76, p.4120–4128, 2008.

NAKAYAMA, J. et al. Gelatinase biosynthesis-activating pheromone: a peptide lactone that mediates a quorum sensing in *Enterococcus faecalis*. **Molecular Microbiology**, v.41, p.145–154, 2001.

NAKAYAMA, J. et al. Revised model for *Enterococcus faecalis* *fsr* quorum-sensing system: the small open reading frame *fsrD* encodes the gelatinase biosynthesis-activating pheromone propeptide corresponding to staphylococcal AgrD. **Journal of Bacteriology**, v. 188, p.8321– 8326, 2006.

PAZ, C. de. Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. **Journal of Endodontic**. v.33, p.652– 662, 2007.

QIN, X. et al. Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. **Infection and Immunity**. v. 68, p. 2579-2586, 2000.

ROBERTS, J.C. et al. Molecular epidemiology of the *fsr* locus and of gelatinase production among different subsets of *Enterococcus faecalis* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, p. 2317-2320, 2004.

SAVA, I.G.; HEIKENS, E.; HUEBNER, J.I. Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v.16, p-533-540, 2010.

SCHOUTEN, M.A. et al. VRE Study Group. Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Europe. **European Journal Clinical of Microbiology and Infectious Disease**, v.19, p. 816-822, 2000.

SHANKAR, V. et al. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. **Infectioun and Immunity**. v.67, p.193-200, 1999.

SHANKAR, V.; BAGHDAYAN, A. S.; GILMORE, M. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. **Nature**. v. 417, p.746-750, 2002.

STOODLEY, P. et al. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review of Microbiology**. v.56, p.187–209, 2002.

SOOD, S.; MALTHOTRA, M.; DAS, B.K.; KAPIL, A. Enterococcal infections & antimicrobial resistance. **Indian Journal of Medical Research**, v. 128, p.111-121, 2008.

THURLOW, L.R. et al. *Enterococcus faecalis* capsular polysaccharide serotypes C and D and their contributions to host innate immune evasion. **Infection and Immunity**. v.77, p.5551–5557, 2009.

- TOLEDO-ARANA, A. et al. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.4538-4545, 2001.
- TON-THAT, H.; MARRAFFINI, L.A.; SCHNEEWIND, O. Sortases and pilin elements involved in pilus assembly of *Corynebacterium diphtheriae*. **Molecular Microbiology**, v.53, p. 251–261, 2004.
- VAN REENEN, C.A.; DICKS, L.M. Horizontal gene transfer amongst probiotic lactic acid bacteria and other intestinal microbiota: what are the possibilities? **Archives of Microbiology**, v. 193, p. 157-168, 2011.
- WATERS, C.M. et al. Role of the *Enterococcus faecalis* GelE protease in determination of cellular chain length, supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins. **Journal of Bacteriology**, v.185, p. 3613-3623, 2003.
- WILLEMS, R.J.L. et al. Variant *esp* gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. **Lancet**, v. 357, p.853– 855, 2001.

PARTE 1

Ocorrência de fatores de virulência e resistência de *Enterococcus spp.* isolados de amostras clínicas e de alimento

RESUMO: O objetivo deste estudo foi identificar as espécies de enterococos provenientes de amostras clínicas e de alimento, analisar a presença de marcadores de virulência e de resistência; avaliação fenotípica de gelatinase, biofilme; e resistência a antimicrobianos. A coleção de 30 amostras de enterococos clínicos, isolados de materiais biológicos e 103 isolados de amostras de queijo provenientes da região de Londrina foi identificada ao nível de espécie e gênero com oligonucleotídeos específicos; investigados quanto a marcadores de virulência para gelatinase, adesina, ferômonio sexual, e de resistência para eritromicina, tetraciclina, gentamicina e vancomicina; expressão fenotípica de gelatinase e biofilme em superfície abiótica; teste de susceptibilidade com três antibióticos (eritromicina, tetraciclina e vancomicina). A identificação por PCR com oligonucleotídeos espécie-específica dos isolados de alimento identificou isolados pertencentes às espécies *E. faecalis*, *E. faecium* e *Enterococcus spp.* nas proporções de 36,9%, 59,2 % e 3,9% respectivamente. Os genes de virulência *gelE*, *ace*, *asa1*, *cylA* e *cpd* foram encontrados em 45,6%, 58,2%, 76,7%, 0% e 23,3% para os isolados de queijo, enquanto 60%, 34,4%, 26,7%, 33,3%, 3,3% e 26,7% para os isolados clínicos, respectivamente. Os isolados de *E. faecalis* foi o que mais abrigou marcadores de virulência em frequência de isolados. Já para os genes de resistência *tet(L)*, *erm(B)*, *aac(6'')-Ie-aph(2')-Ia* e *vanA* tem-se 28,1%, 1,9%, 2,9% e 52,4% para os de alimentos e 23,3%, 86,7%, 66,7% e 80% para os clínicos, respectivamente. Todos os isolados foram submetidos à expressão da gelatinase no qual 21,3% e 23,3% dos enterococos de alimento e clínicos, respectivamente, apresentaram ação desta enzima. Um total de 29 isolados de alimentos e clínicos positivos para gelatinase foram avaliados quanto à formação de biofilme. E apenas um isolado clínico foi fortemente formador de biofilme, os demais isolados de ambas as amostras foram fracamente formadores de biofilmes. Em relação ao fenótipo de resistência aos antimicrobianos têm-se que a foi maior nos isolados de amostras clínicas, com frequência maior para *E. faecium*. A concordância da presença de genes de resistência com os dados obtidos pelo antibiograma variou dependendo do antimicrobiano, porém foram sempre maiores para os isolados clínicos. Este estudo mostrou que tanto os isolados de alimento quanto os clínicos apresentam marcadores de virulência e resistência; atividade de gelatinase e fenótipo de resistência aos antimicrobianos. Assim sendo os isolados de alimentos podem ter um papel importante na disseminação de enterococos com potenciais de virulência e resistência através da cadeia alimentar humana.

Palavras-chave: Enterococos. Fatores de virulência. Gelatinase. Biofilme. Identificação.

1 INTRODUÇÃO

Enterococcus spp. são cocos Gram-positivos, comensais do trato gastrointestinal de humanos e animais. Esses micro-organismos são conhecidos por

crescer e sobreviver em condições extremas, o que os capacita a habitar em vários ambientes (revisado por FISHER; PHILLIPS, 2009).

Sua maior importância está relacionada ao fato deles serem considerados patógenos oportunistas, provocando uma infinidade de doenças. Isto está intimamente relacionado aos seus fatores de virulência e resistência intrínseca a diversos antimicrobianos comumente utilizados no tratamento de cocos Gram-positivos, além de adquirir facilmente marcadores genéticos pela conjugação. Dentre as espécies de enterococos, as mais comuns isoladas de hospitais são *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*. A primeira espécie é conhecida por abrigar uma quantidade maior de fatores de virulência, enquanto que a segunda apresenta uma maior resistência a antimicrobianos (revisado por FISHER; PHILLIPS, 2009).

Em contrapartida, os enterococos parecem desempenhar 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 bacteriocinas (revisado por FOULQUIÉ MORENO et al., 2006). Porém os enterococos podem ser encontrados em alimentos por decorrência de contaminação seja fecal, água, solo dentre outros (revisado GIRAFFA et al., 2002; FOULQUIÉ MORENO et al., 2006, revisado por FISHER; PHILLIPS, 2009), sendo as espécies *E. faecium* e *E. faecalis* as mais predominantes em diversos queijos da Europa (revisado por GIRAFFA, 2002; revisado por FOUQUIÉ-MORENO et al., 2006). Gomes et al., (2008) mostraram que no Brasil a prevalência de enterococos em queijo foi demonstrada como sendo de 83,3% com predominância de *E. faecium*.

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 probiótico (revisado por FOULQUIÉ MORENO et al., 2006). 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 MATERIAS E MÉTODOS

2.1 Material Biológico

Neste estudo, foram analisadas 133 isolados de *Enterococcus* spp. de dois ambientes diferentes, sendo 103 provenientes de alimento e 30 de amostras clínicas. Os isolados de alimento foram doados pela prof.(a) Dr(a)Luciana Furlaneto-Maia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPr). Os isolados de alimento foram provenientes de 15 amostras de queijos artesanal de diferentes regiões da cidade de Londrina-PR e identificadas pelo Laboratório de Microbiologia da UTFPr, através de provas bioquímicas convencionais tais como a coloração de Gram, ausência da produção de catalase, crescimento de 10 à 40°C, crescimento em 6,5% de NaCl e hidrólise da esculina. Já os isolados clínicos foram doados pela prof.(a) Ms Vera Lúcia Dias Siqueira da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Estes isolados foram identificados e pertencem a bacterioteca clínica do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas – LEPAC/ UEM. Os isolados clínicos foram obtidos de diferentes fontes (swab retal (17), urina (11), Secreção orotraqueal (1) e sangue (1)) estudados por Rocha et al., (2012).

Todos os isolados foram estocados em meio ágar Luria-Bertani (LB) acrescido de 20% de glicerol, mantidos sob -20°C, na bacterioteca do Laboratório de Biologia Molecula de Genética de Fungos da Universidade Estadual de Londrina.

2.2 Extração de DNA

O DNA foi isolado pelo método descrito por Marques; Suzart (2004) com modificações. Para tanto, as bactérias foram cultivadas em meio LB, incubadas a 37°C sob agitação constante (180 rpm) por 18 horas. Após este período, as bactérias foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm, no qual o sedimento foi ressuscendido em 300 µL água ultrapura esterilizada. A suspensão de células foi submetida ao aquecimento a 100°C por 30 minutos. Em seguida foram novamente

centrifugadas, nas mesmas condições descritas acima, e por fim 150 µL do sobrenadante contendo DNA foi retirado e armazenado em freezer a -20°C.

2.3 Análise de RAPD das amostras de *Enterococcus* spp.

Os isolados bacterianos foram analisados genotipicamente utilizando a técnica de *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD). Foram testados seis oligonucleotídeos (P7, OPA9, P4, AP4, OPM2 e OPA17), dos quais foram selecionados P4 (5'-TCACCGTGC-3') e OPA17 (5'-GACCGCTTGT-3') para análise do perfil genético dos enterococos. As reações foram realizadas em termociclador Techne-Tc3000, em um volume final de 25 µL, contendo 1 µL DNA, 1,0U Taq DNA polimerase (Invitrogen), Tampão da Taq, 3mM MgCl₂, 0,25mM dNTPs e 2,48 pmol do oligonucleotídeo iniciador. As condições cíclicas utilizadas foram baseadas em Rosseti; Giraffa (2005) sendo 2 minutos para a desnaturação inicial a 94° C, 30 ciclos de 94 °C à 1 minuto, pareamento a 42 °C por 20 segundos, 72 °C por 2 minutos, e extensão final de 72 °C por 10 minutos. O controle negativo conteve todos os reagentes, exceto o DNA. O produto do RAPD foi analisado em gel de agarose 1,5% revelados através de brometo de etídio (0.5 g.ml⁻¹) e analisados pelo aparelho de fotodocumentação L-PIX ST (LOCCUS).

Os perfis de RAPD obtidos pelo uso dos dois oligonucleotídeos foram combinados em uma matriz e comparados usando o coeficiente de Jaccard, no qual valores > 92% de similaridade foram considerados como espécies relacionadas (MARTÍN et al., 2009). A correlação do coeficiente foi calculada pelo *unweighted pair-group method with arithmetical averages* (UPGMA) através do programa *Numerical taxonomy system of multivariate programs* (NTSYS).

2.4 Identificação genotípica das espécies

Todos os isolados de enterococos foram identificados para espécies *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* e *E. flavescens* pela reação de PCR, com os oligonucleotídeos iniciadores (Tabela 1). Os oligonucleotídeos iniciadores que amplificam os genes *ddl_{E.faecalis}* e *ddl_{E.faecium}*, permitem a identificação de *E. faecalis* e *E. faecium* respectivamente. Enquanto os oligonucleotídeos para os genes *vanC-1*, *vanC-2* e *vanC-3* são específicos para *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*

e *E. flavescens*, respectivamente (DUTKA-MALEN et al., 1995). Para aqueles que não amplificaram para os genes acima, foi identificado quanto à presença do gene (*tuf*) para gênero *Enterococcus*.

Na identificação de marcadores de virulência foi feito o uso dos oligonucleotídeos iniciadores *cylA*, para a citolisina; *asa1* para substância de agregação, *ace* para adesina ao colágeno, *gelE* para gelatinase e *cpd*, para feromônio sexual (Tabela 1), tendo como controle a cepa ATCC *E.faecalis* 29212. Para a detecção dos genes de resistência vancomicina A, gentamicina, tetraciclina e eritromicina, utilizou-se os seguintes oligonucleotídeos iniciadores *vanA*, *aac(6')-Ie aph(2'')-Ia*, *tet(L)* e *erm(B)*, respectivamente (Tabela 1).

Todas as reações foram realizadas em termociclador Techne-Tc3000, em um volume final de 20 µL, contendo 10 µL de DNA (preparado como descrito acima), 0,17mM de cada dNTP, 1 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (Forward e Reverse), 1,0U Taq DNA polimerase (Invitrogen), Tampão da Taq 10X, 2,5mM de MgCl₂. O programa do termociclador teve uma desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos, seguido por 30 ciclos de 94°C à 1 minuto, pareamento correspondente ao oligonucleotídeo (Tabela 1) por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, e extensão final a 72°C por 10 minutos. O controle negativo conteve todos os reagentes, exceto o DNA. Os produtos resultantes da amplificação 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 produto amplificado foi comparado com o marcador de peso molecular de 1kb (Amersham Pharmacia Biotech).

2.5 Detecção dos fatores de virulência

2.5.1 Produção de Gelatinase

Todos os isolados foram cultivados a 37 °C por 18 horas em meio Ágar Nutriente (AN). Para a produção de gelatinase, a bactéria foi semeada em forma de “traço” na superfície do meio AN suplementado com 3% de gelatina. A produção de gelatinase foi determinada pela presença de zonas claras em volta do cultivo em “traço”, após serem incubadas a 28 °C por 24 horas. Um isolado clínico

de *Serratia marcescens* foi utilizado como controle positivo para a produção de gelatinase. O experimento foi conduzido em duplicata.

2.5.2 Formação de biofilme

A formação do biofilme em superfície de poliestireno seguiu de acordo com os critérios propostos por Marques, (2004) com modificações. As amostras de enterococos que expressaram a gelatinase foram cultivadas a 37 °C por 24 horas em meio ágar BHI (Brain Heart Infusion). Após este período as colônias foram suspensas em tubos com solução de NaCl (0,85%) até atingirem a turbidez da escala 0,5 de McFarland e em seguida, 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, sendo o meio BHI sem a presença de enterococos utilizados como controle negativo. 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 min 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 min. A formação de biofilme foi determinada pela leitura da densidade óptica foi medida a 540nm usando um leitor de microplaca (ELx808™ Absorbance Microplate Reader-BioTek). As amostras foram classificadas de acordo com o *cut-off* (DO_C) que foi definido em função da média de dois experimentos considerados como controle negativo. Os experimentos foram realizados em triplicatas em 2 ocasiões diferentes.

Os critérios utilizados para classificar as amostras de enterococos quanto à capacidade e a intensidade de formarem biofilme em superfície de poliestireno foram descritos por Stepanovic et al. (2000) como segue:

$DO_A \leq DO_C$ - Considerada não formadora de biofilme (NF)

$DO_C < DO_A \leq 2 DO_C$ - Fracamente formadora de biofilme (FRF)

$2DO_C < DO_A < 4DO_C$ - Moderadamente formadora de biofilme (MF)

$DO_A \geq 4DO_C$ - Fortemente formadora de biofilme (FF)

DO_C =densidade óptica do controle.

DO_A = densidade óptica da amostra.

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

Os isolados foram testados quanto à susceptibilidade para três antimicrobianos (eritromicina-15µg, tetraciclina-30 µg e vancomicina-30 µg) pelo método Kirby-Bauer (disco difusão em ágar). Colônias de cada isolado foram cultivadas em meio Mueller Hinton Agar (MHA) a 37 °C por 18-24 horas. Após este período as colônias foram suspensas em tubos com solução de NaCl (0,85%) até atingirem a turbidez da escala 0,5 de McFarland e em seguida, foram semeados em diversas direções na superfície do MHA. Discos impregnados com antibiótico (Laborclin) foram depositados sobre o meio inoculado. As placas foram incubadas a 37 °C por 18 e 24 horas e observados o halo de inibição. Os diâmetros dos halos de inibição foram interpretados de acordo com os critérios de interpretação preconizados pelo Clinical Laboratory Standard (CLSI, 2011). A cepa controle foi a ATCC *Staphylococcus aureus* 25923.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Identificação genotípica das amostras de alimentos

Dos 103 isolados de enterococos de amostras de queijo, contidas na bacterioteca da UTFPR-Londrina, todos foram identificados como sendo enterococos (Tabela 2). Neste grupo de alimentos foram identificadas por PCR com oligonucleotídeos específico *E.faecalis* (38), *E. faecium* (61) e *Enterococcus spp* (4) nas proporções de 36,9%, 59,2% e 3,9% respectivamente. Pelos dados expostos tem se que houve um predomínio de *E. faecium*, situação encontrada por Gomes et al., 2008 analisando enterococos provenientes de queijo. No presente estudo não houve exemplar para *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* e *E. flavencens*. As espécies de enterococos mais prevalentes em queijos são *E. faecalis* e *E. faecium* (revisado por GIRAFFA, 2002; revisado por FOULQUIÉ MORENO et al., 2006).

As amostras de queijo foram do tipo fresco, ou seja, não há a necessidade de acrescentar enterococos no seu processo de produção. Portanto, a presença destes neste produto possivelmente deu pela contaminação ambiental ou intestinal (gado leiteiro). A presença de enterococos em produtos lácteos tem sido

considerada um indicador de condições sanitárias inadequadas durante a produção e processamento do leite (revisado por GIRAFFA, 2002).

3.2 Análise de RAPD das amostras de *Enterococcus* spp.

A análise de RAPD foi feita para os isolados provenientes de amostras clínicas (ROCHA et al., 2012) e de alimentos, com a finalidade de averiguar se havia algum isolado clonal.

Dos seis oligonucleotídeos testados optou-se por dois deles, sendo o P4 e OPA17, pois estes geraram perfis com menor número de bandas, porém apresentando um bom poder discriminativo. As análises dos perfis eletroforéticos obtidos com estes oligonucleotídeo permitiram a identificação de 83 e 54 locos para as amostras de alimento e clínicas, respectivamente.

A análise de RAPD mostrou que os isolados clínicos estão agrupados em torno de 22% de similaridade genética (Figura 1), sendo que nenhum isolado foi agrupado com similaridade genética superior a 92%. Já o perfil genético das amostras de *Enterococcus* spp. de alimento agrupou os isolados em intervalo de no mínimo 6% de similaridade genética sendo o máximo obtido em 6 isolados que apresentaram 100% similaridade genética (11A e 13A; 25A e 27A; 13 e 15) (Figura 2). Vale ressaltar que muitos isolados de alimentos mostraram um coeficiente de similaridade genética maior que 92%, mostrando que estes isolados apresentam-se muito próximo geneticamente. Mas contudo todos os isolados foram utilizados na análise genotípica e fenotípica.

De uma forma geral tem-se que ambos os isolados clínicos e de alimento apresentaram uma alta diversidade genética, uma vez que o coeficiente de similaridade para estes foram baixos.

3.3 Distribuição dos fatores de virulência nos isolados de alimento e clínicos.

Tantos os isolados de alimento como os clínicos foram caracterizados quanto à presença dos genes de virulência; para substância de agregação (*asa1*), gelatinase (*gelE*), adesina (*ace*), citolisina (*cytA*) e feromônio sexual (*cpd*). A amplificação dos produtos de PCRs com oligonucleotídeos

específicos revelou distintas porcentagens em relação aos fatores de virulências entre as espécies analisadas (Figura 3).

No presente estudo tem-se que em isolados de *E. faecalis*, os genes *ace* e *asa1* foram identificados em maior frequência para os isolados de alimento, sendo que o gene *ace* obteve 100% de presença, este dado também foi observado por Gomes et al., (2008). Martín-Platero et al., (2009) também encontraram uma alta incidência do gene *asa1* em isolados de *E. faecalis* provenientes de queijo. O gene *cylA* não foi encontrado em isolados de alimento, o mesmo aconteceu no trabalho de Martín-Platero et al., (2009), somente um isolado clínico de sangue (840) apresentou este gene. Para os isolados clínicos tem-se que o gene *gelE* esteve presente em 100% dos isolados, o que corrobora com Zoletti et al., (2010), sendo que para os fatores de virulência adesina e feromônio sexual, estes autores encontram 90% e 95%, respectivamente.

Dentre as espécies de *E. faecium* os genes que obtiveram maiores frequências foram *asa1* nos isolados de alimento, 66,7% e *gelE* nos clínicos 60,9%. Em relação aos marcadores de virulência, o gene *cpd* foi detectado em menor incidência tanto para os isolados clínicos 4,3% quanto para os de alimento 8,2%. Eaton; Gasson, (2001) encontraram o feromônio sexual (*cpd*) 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. Apesar do fator de virulência *ace* ser considerado uma característica de *E. faecalis*, encontramos a presença deste gene em isolados de *E. faecium*, tanto de origem clínica quanto de alimento. O mesmo foi visto em trabalhos de Billstrom et al., (2008) que encontram isolados de *E. faecium* contendo gene *ace* em isolados provenientes de amostras clínicas.

Os isolados provenientes de alimentos identificados apenas como *Enterococcus* spp. apresentaram os seguintes genes de virulência na ordem decrescente: *asa1*, 75% e *ace* com 50%.

Foi encontrada uma frequência maior de isolados de *E. faecalis* com múltiplos fatores de virulência (*asa1/gelE/ ace/cpd*) em relação aos isolados de *E. faecium*, para ambas as amostras. A espécie de *E. faecalis* abrigou mais fatores de virulência quando comparada a *E. faecium* e *Enterococcus* spp. Este dado corrobora com Eaton; Gasson, (2001); Gomes et al.,(2008); Cariolato et al.,(2008). 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.

De forma geral, os isolados de alimento tiveram maior frequência de genes de virulência *asa1* (76,7%) e *ace*, (58,2%), enquanto que nos clínicos observou-se maior frequência dos genes *gelE* (60,0%), *ace* (26,7%), *cpd* (26,7%) e *cylA* (3,3%). A ocorrência de marcadores de virulência em isolados clínicos fortalece o conceito de que genes de virulência reforcem a infecção, facilitando o acesso e alojamento dos enterococos nos sítios afetados.

Apesar dos fatores de virulência estarem mais comumente relacionado aos isolados clínicos, este estudo assim como o de Cariolato et al., (2008) 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 via conjugação para os enterococos do trato gastrointestinal.

3.4 Detecção dos genes de resistência e expressão fenotípica

A distribuição dos genes de resistência *tet(L)*, *erm(B)*, *aac(6')-le-aph(2'')-la* 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)*. Em relação aos genes de resistência analisados houve predomínio nos isolados clínicos para o gene *erm(B)*, 86,7%; *vanA*, 80,0%; *aac(6')-le-aph(2'')-la*, 66,7%. No entanto para os enterococos de alimento houve um predomínio para *tet(L)*, 28,1% em relação aos clínicos com 23,3% (Figura 4A). No estudo de Vignaroli et al., (2011) no qual foram avaliados 11 genes de resistência em isolados de enterococos provenientes de carnes de animais e fezes observaram que os genes *erm(B)*, *vanA* e *aac(6')-le-aph(2'')-la* estiveram entre os mais frequentemente detectados.

Os isolados de alimento e clínicos foram submetidos ao método de disco difusão para verificação da resistência aos antimicrobianos tetraciclina-30µg, eritromicina-15µg e vancomicina-30µg. Dados de expressão de resistência mostraram que os isolados de *E. faecalis*, do grupo de alimento, tiveram uma maior frequência de resistência para tetraciclina, 37,8%. Já nas amostras clínicas houve

maior frequência resistência para eritromicina, 57,1%. Para *E. faecium* pode-se observar uma maior frequência de resistência para todos os antimicrobianos analisados nos isolados provenientes de hospital, sendo a eritromicina com 86,9% seguido por vancomicina, 78,3%, os de maior resistência por esta espécie.

De maneira geral, tem-se que os isolados clínicos apresentaram maior frequência de resistência aos antimicrobianos avaliados, em relação aos isolados de queijo (Figura 4B). Nieto-Arribas et al., (2011), analisando a susceptibilidade de enterococos isolados de queijos, encontraram uma frequência de resistência para tetraciclina, eritromicina e vancomicina de aproximadamente, 20%, 20%, e 6%, respectivamente. Estes dados foram similares ao encontrados no presente estudo. Em contrapartida Triveldi, et al., (2011) não encontraram resistência à vancomicina e eritromicina em enterococos de produtos lácteos.

A incidência do gene *tet(L)* foi maior nos isolados de alimento, porém a frequência de resistência da tetraciclina foi maior nos clínicos. Provavelmente, estes dados sugerem que outros determinantes de resistência para tetraciclina estejam envolvidos, tendo em vista que em *Enterococcus* spp., a resistência à tetraciclina é conferida por um ou mais genes *tet* (CHOPRA; ROBERTS, 2001). Quando comparado a presença do gene e sua expressão em isolados clínicos e de alimento, foi verificada uma correlação positiva para a tetraciclina de 16,7% e 4,9%, respectivamente.

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 76,7% apresentaram gene para *erm(B)* e resistência para a mesma. 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. Portanto foi verificada uma maior correlação para a presença de *vanA* e sua expressão em isolados clínicos, 63,3%, quando comparada com os isolados de alimento com 2,9%. O antimicrobiano gentamicina não foi avaliado.

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) onde enterococos resistentes a eritromicina não possuíam nenhum dos quatro genes relacionados com a eritromicina (*erm(A)*, *erm(B)* e *erm(C)*).

A concordância entre a presença ou ausência dos genes *tet(L)*, *erm(B)* e *vanA*, comparado aos dados obtidos pelo método de disco difusão, foi de 68,6% e 60,0%; 8,8% e 83,3% e 48,0% e 76,7%, para os isolados de alimento e clínicos, respectivamente.

3.6 Análise fenotípica da produção de gelatinase

A atividade de gelatinase foi analisada em todos os isolados, independente da presença do gene *gelE* no genoma. A espécie que mais apresentou atividade de gelatinase foi *E. faecalis*, sendo 47,4% 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 (Figura 5).

Elsner et al., (2000) observaram que 55% dos *E. faecalis* provenientes da área clínica foram produtores de gelatinase, mas esta expressão não foi encontrada em *E. faecium*. Já estudos realizados por Gomes et al., (2008) mostraram que a incidência da gelatinase de enterococos provenientes de alimentos foi de 60% em *E. faecalis* enquanto que para *E. faecium* não houve a atividade da expressão desta enzima.

Fazendo uma correlação entre todos os isolados clínicos e de alimento, para a atividade de gelatinase nas condições utilizadas, obtivemos uma frequência em porcentagem de expressão fenotípica de 23,3% e 21,3%, respectivamente, mostrando que os isolados clínicos tiveram maior frequência de isolados produzindo esta enzima.

No entanto alguns isolados apresentaram o gene *gelE*, porém não expressaram gelatinase nas condições testadas. Dos isolados *E. faecalis* que apresentaram o gene *gelE* tem se para os isolados de alimento e clínicos que 62,1% e 71,4%, respectivamente foram produtores da gelatinase. Nos isolados de *E. faecium* observou que 82,3% e 85,7% dos isolados de alimento e clínicos, respectivamente, continham o gene *gelE*, porém não foram produtores da enzima. Biavasco et al., (2007) observaram que dos 10 isolados de *E. faecium* (sete de origem humana e três de alimento) apresentaram o gene *gelE* porém não produziram gelatinase, enquanto 100% dos *E. faecalis* produtores desta enzima continham o gene *gelE*. Estudos realizados por Roberts et al. (2004) mostraram que a deleção em uma porção do locus da região *fsr* pode explicar o fato de alguns

isolados de enterococos apresentem o gene *gelE* porém não expressarem a atividade enzimática. Contudo, um isolado de *E. faecium* (71), proveniente de queijo, não amplificou o gene *gelE*, porém foi positivo para a expressão da gelatinase.

3.7 Formação de biofilme

Os 29 isolados, sendo 7 clínicos e 22 de alimentos, que apresentaram atividade de gelatinase, foram submetidos ao teste de formação de biofilme em superfície abiótica (Figura 6). Todos os isolados apresentaram a formação de biofilme.

Somente um isolado clínico *E. faecalis* apresentou-se como fortemente formador de biofilme, sendo os restantes fracamente formadores de biofilme. Todos os 22 isolados de *E. faecalis* e *E. faecium* provenientes de alimento apresentaram-se como fracamente formadores de biofilme. O presente estudo corrobora com o descrito por Gomes et al., (2008), que analisaram *E. faecalis* e *E. faecium* provenientes de alimentos, como não formadores ou fracamente formador de biofilme.

Muitos autores indicam que a proteína Esp está intimamente relacionada com a formação de biofilme (TOLEDO-ARANA et al., 2001; BORGMANN et al., 2004) porém outros autores como Carniol; Gilmore, (2004); Kristich et al., (2004) e Zoletti et al., (2011) mostraram que a formação de biofilme por enterococos ocorreu mesmo na ausência do gene que codifica a proteína ESP, porém com atividade para gelatinase. Em estudo realizado por Fisher; Philips (2009), mostrou que a mutação no locus *fsr*, que codifica a enzima gelatinase, reduziu a formação de biofilme em *E. faecalis*.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que os isolados de *Enterococcus* de alimento, bem como os de amostras clínicas apresentaram genes de virulência e resistência assim como resistência a antimicrobianos, expressão fenotípica de gelatinase e capacidade de formação de biofilme. 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 encontrados na microbiota humana.

REFERÊNCIAS

BELL, I.M.; PATON, J.C.; TURNIDGE, J. Emergence of vancomycin-resistant enterococci in Australia: phenotypic and genotypic characteristics of isolates, **Journal of Clinical Microbiology**, v.36,p.2187–2190, 1998.

BIAVASCO, F.; FOGLIA, G.; PAOLETTI, C.; ZANDRI, G.; MAGI, G.; GUAGLIANONE, E.; SUNDSFJORD, A.; PRUZZO, C.; DONELLU, G.; FACINELLI, B. VanA-type enterococci from humans, animals, and food: species distribution, population structure, Tn 1546 typing and location, and virulence determinants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p.3307–3319, 2007.

BILLSTROM, H.; LUND, B.; SULLIVAN, A.; NORD, C.E. Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.32, p. 374-377, 2008.

BORGMANN, S.; NIKLAS, D. M.; KLARE, I.; ZABEL, L. T.; BUCHENAU, P.; AUTENRIETH, I. B.; HEEG, P. Two episodes of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* outbreaks caused by two genetically different clones in a newborn intensive care unit. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v.207, p.386–389, 2004.

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**, v.19, p. 886-892, 2008.

CARNIOL, K.; GILMORE, M.S. Signal transduction, quorum-sensing, and extracellular protease activity in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v.186, p.8161-8163, 2004.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v.65, p. 232-260, 2001.

CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing**; Twenty-First Informational Supplement Approved standard M100-S21, v. 31, 2011.

MARTÍN-PLATERO, A.M.; VALDIVIA, E.; MAQUEDA, M.; MARTÍNEZ-BUENO, M. Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, v.132, p. 24-32, 2009.

DUKTA-MALEN, S.; EVERS, S.; COURVALIN, P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p.24–27, 1995.

EATON, T.J.; GASSON, M.J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic Exchange between food and medical isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, vol.67, p.1628-1635, 2001.

ELSNER, H.A.; SOBOTTKA, I.; MACK, D.; CLAUSSEN M.; LAUFS, R.; WIRTH, R. Virulence Factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Blood Culture Isolates. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.19, p.39–42, 2000.

FISHER, K.; PHILIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, v.155, p.1749-1757, 2009.

FOUQUIÉR-MORENO, M.R.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E.; DE VUYST, L. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, p.1-24, 2006.

GEVERS, D.; DANIELSEN, M.; HUYS G.; SWINGS, J. Molecular characterization of *tet(M)* genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry sausage, **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.1270–1275, 2003.

GIRAFFA, G. Enterococci from foods. **FEMS Microbiology Reviews**, v.26, p. 163-171, 2002.

ROSSETTI, L.; GIRAFFA, G. Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. **Journal of Microbiological Methods**, v. 63, p.135-144, 2005.

GOMES, B.C.; ESTEVES, C.T.; PALAZZO, I.C.V.; DARINI, A.L.C.; FELIS, G.E.; SECHI, L.A.; FRANCO, B.D.G.M.; MARTINIS, E.C.P. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. **Food Microbiology**, v.25, p.668-675, 2008.

JENSEN, L.B.; JENSEN, P.; AHRENS, L.; DONS, R.N.; JONES, A. Hammerum and F.M. Aarestrup, Molecular analysis of the Tn 1546 in *Enterococcus faecium* isolated from animals and humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 437–442, 1998.

KE, D. PICARD, F.J.; MARTINEAU, F.; MÉNARD, P.H.R.; OUELLETTE, M.; BERGERON, M.G. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. **Journal of Clinical Microbiology**.v.37, p.3497-3503, 1999.

KRISTICH, C.J.; LI, Y.H.; CVITKOVITCH, D.G.; DUNNY, G.M. Esp- Independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. **Journal of Bacteriology**, v. 186, p. 154-163, 2004.

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. **International Journal of Food Microbiology**, v.88, p. 291– 304, 2003.

MARQUES, E.B. **Estudo da formação de biofilme em superfícies abiótica: Influência de cátions divalentes e a ocorrência de determinantes de virulência em amostras clínicas de *Enterococcus faecalis***. 2004. 167f .Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Pós-graduação em Microbiologia, UEL, Londrina.

MARQUES, E.B.; SUZART, S. Occurrence of virulence-associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina. **Journal of Medical Microbiology**, v.53, p.1069-1073, 2004.

MARTÍN, B.; COROMINAS, L.; GARRIGA, M.; AYMERICH, T. Identification and tracing of *Enterococcus* spp. by RAPD-PCR in traditional fermented sausages and meat environment. **Journal of Applied Microbiology**, v.106, p.66–77, 2009.

NIETO-ARRIBAS,P.; SESEÑA, S.; POVEDA, J.M.; CHÍCON,R.; CABEZAS, L. PALOP, L. *Enterococcus* populations in artisanal Manchego cheese: Biodiversity, technological and safety aspects. **Food Microbiology**, v. 28, p.1-9, 2011.

PERRETTEN, V.; VORLET-FAWER, L.; SLICKERS, P.; EHRICHT, R.; KUHNERT, P.; FREY,J. Microarray based detection of 90 antibiotic resistance genes of Gram positive bacteria, **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p. 2291–2302, 2005.

ROBERTS, J. C.; SINGH, K. V.; OKHUSEN, P. C. AND MURRAY, B. E. Molecular epidemiology of the *fsr* locus and of gelatinase production among different subsets of *Enterococcus faecalis* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 2317-2320, 2004.

ROCHA, K.; SIQUEIRA, V.L.D.; FURLANETO, M.; FURLANETO-MAIA, L.M. **Comparison between automated system and molecular analysis for Identification and susceptibility testing of *Enterococcus* sp.** (dados não publicado- parte 2 da dissertação) 2012.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v.40, p. 175-179, 2000.

TOLEDO-ARANA, A.; VALLE, J.; SOLANO, C.; ARRIZYBIETA, M.J.; CUCARELLA, C.; LAMATA, M.; AMORENA, B.; LEIVA, J.; PENADÉS, J.R.; LASA, I. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.4538-4545, 2001.

TRIVELDI, K.; CUPAKOVA, C.; KARPISKOVA, R. Virulence factors and antibiotic resistance in enterococci isolated from food-stuffs. **Veterinarni Medicina**, v.56, p. 352-357, 2011.

VAKULENKO, S.B.; DONABEDIAN, S.M.; VORKRESENSKIY, A.M.; ZERVOS, M.J.; LERNER, S.A.; CHOW, J.W. Multiplex PCR for detection of aminoglycoside resistance genes in enterococci. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.47, p. 1423–1426, 2003.

VANKERCHOVEN, V.; AUTGAERDEN, T.V, VAEL, C.; LAMMENS, C.; CHAPELLE, S.; ROSSI, R.; JABES, D. GOOSSENS, H. 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*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 4473-4479, 2004.

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*. **Current Microbiology**, v. 62, p. 11438-1447, 2011.

ZOLETTI, G.O.; PEREIRA, E.M.; SCHUENCK, R.P.; TEIXEIRA, L.M.; SIQUEIRA, J.F.J.; SANTOS, K.R.N. Characterization of virulence factors and clonal diversity of *Enterococcus faecalis* isolates from treated dental root canals. **Research in Microbiology**, v.162, p.151-158, 2011.

Parte 1**Tabela 1** - Oligonucleotídeos utilizados para identificação de *Enterococcus* spp., detecção de diferentes genes de virulência e resistência por PCR.

Gene	Sequência nucleotídica (5' - 3') ^a	Ta (°C)	Tamanho do produto (bp)	Referências
<i>tuf</i>	TACTGACAAACCATTTCATGATG AACTTCGTCACCAACGCGAAC	56	112	KE et al., (1999)
<i>vanc-1</i>	GGTATCAAGGAAACCTC CTTCCGCCATCATAGCT	56	822	
<i>vanc-2, vanc-3</i>	CTCCTACGATTCTCTTG CGAGCAAGACCTTTAAG	56	439	Dukta-Malen et al., (1995)
<i>ddl_{E.faecalis}</i>	ATCAAGTACAGTTAGTCT ACGATTCAAAGCTAACTG	56	941	
<i>ddl_{E.faecium}</i>	TAGAGACATTGAATATGCC TCGAATGTGCTACAATC	56	550	
<i>cylA</i>	ACTCGGGGATTGATAGGC GCTGCTAAAGCTGCGCTT	54	688	Vankerckhoven et al., (2004)
<i>asa1</i>	GCACGCTATTACGAACTATGA TAAGAAAGAACATCACCACGA	56	375	
<i>gelE</i>	AGTTCATGTCTATTTTCTTCAC CTTCATTATTTACACGTTTG	56	402	Mannu et al. (2003)
<i>ace</i>	AAAGTAGAATTAGATCCACAC TCTATCACATTCCGGTTGCG	56	320	
<i>cpd</i>	TGGTGGGTTATTTTTCAATTC TACGGCTCTGGCTTACTA	50	782	Eaton; Gasson, (2001)
<i>vanA</i>	GTAGGCTGCGATATTCAAAGC CGATTCAATTGCGTAGTCCAA	56	231 <i>E.faecium</i> 330 <i>E.faecalis</i>	Bell et al., (1998)
<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>	CAGAGCCTTGGAAGATGAAG CCTCGTGTAATTCATGTTCTGGC	56	348	Vakulenko, et al. (2003)
<i>erm(B)</i>	CATTTAACGACGAAACTGGC GGAACATCTGTGGTATGGCG	56	405	Gevers, et al. (2003)
<i>tet(L)</i>	GTMGTTGCGCGCTATATTCC GTGAAMGRWAGCCACCTAA	56	696	

Ta(°C), temperatura de pareamento/(^a)M= A or C; R= A or G; W = A or T/ gene *tuf*, *Enterococcus*; *vanC-1*, *E. gallinarum*; *vanC-2, vanC-3*, *E. casseliflavus*, *E. flavescens*, *ace*, adesina; *asa1*, substância de agregação; *gelE*, gelatinase; *cylA*, citolisina; *cpd*, feromônio sexual; *tet(L)*, tetraciclina; *erm(B)*, eritromicina; *aac(6')-aph(2'')-Ia*, gentamicina e *vanA*, vancomicina.

Tabela 2 - Identificação pela PCR dos isolados de enterococos provenientes de queijo.

Amostra	Isolado	Espécie	Amostra	Isolado	Espécie	
E6q	01	<i>E.faecalis</i>	E16q	67	<i>E.faecium</i>	
	02	<i>E.faecalis</i>		68	<i>E.faecium</i>	
	03	<i>E.faecalis</i>		69	<i>E.faecium</i>	
	04	<i>E.faecalis</i>		70	<i>E.faecium</i>	
	05	<i>E.faecalis</i>		71	<i>E. faecium</i>	
	06	<i>E.faecalis</i>		72	<i>E.faecium</i>	
	E7q	07	<i>E.faecalis</i>	E12q(a)	1 A	<i>E.faecalis</i>
		08	<i>E.faecalis</i>		3 A	<i>Enterococcus</i> spp.
		09	<i>E.faecalis</i>		5 A	<i>E. faecalis</i>
10		<i>E.faecalis</i>	8 A		<i>E. faecium</i>	
11		<i>E.faecalis</i>	9 A	<i>E. faecium</i>		
13		<i>E.faecalis</i>	10 A	<i>E. faecium</i>		
14		<i>E.faecalis</i>	E14q(a)	11 A	<i>E. faecium</i>	
15		<i>E.faecalis</i>		12 A	<i>E. faecium</i>	
16		<i>E.faecalis</i>		13 A	<i>E. faecium</i>	
17	<i>E.faecalis</i>	14 A		<i>E. faecium</i>		
18	<i>E.faecalis</i>	15 A		<i>E. faecium</i>		
19	<i>E.faecium</i>	16 A		<i>E. faecium</i>		
20	<i>E.faecium</i>	17 A		<i>E. faecium</i>		
22	<i>E.faecium</i>	18 A		<i>E. faecium</i>		
E8q	23	<i>E.faecium</i>	19 A	<i>E. faecium</i>		
	24	<i>E.faecium</i>	20 A	<i>E.faecium</i>		
	25	<i>E.faecium</i>	E17q	21 A	<i>Enterococcus</i> spp.	
	26	<i>E.faecium</i>		22 A	<i>Enterococcus</i> spp.	
	27	<i>E.faecalis</i>		24 A	<i>E. faecalis</i>	
E9q	28	<i>E.faecalis</i>		25 A	<i>E. faecalis</i>	
	29	<i>E.faecalis</i>		26 A	<i>E. faecium</i>	
	30	<i>E.faecalis</i>		27 A	<i>E. faecalis</i>	
	32	<i>E.faecium</i>		29 A	<i>Enterococcus</i> spp.	
E10q	33	<i>E.faecalis</i>		30 A	<i>E. faecium</i>	
	34	<i>E.faecium</i>	31 A	<i>E. faecalis</i>		
	35	<i>E.faecium</i>	32 A	<i>E.faecium</i>		
	36	<i>E.faecalis</i>	E18q	33 A	<i>E. faecium</i>	
	37	<i>E.faecium</i>		34 A	<i>E.faecium</i>	
	38	<i>E.faecium</i>		35 A	<i>E. faecium</i>	
	39	<i>E.faecium</i>		39 A	<i>E. faecium</i>	
	40	<i>E.faecalis</i>		40 A	<i>E. faecium</i>	
41	<i>E.faecium</i>	E19q		41 A	<i>E. faecium</i>	
42	<i>E.faecalis</i>		42 A	<i>E.faecium</i>		
43	<i>E.faecalis</i>		43 A	<i>E. faecium</i>		
44	<i>E.faecium</i>		44 A	<i>E. faecium</i>		
45	<i>E.faecalis</i>		45 A	<i>E. faecium</i>		
E12q	46	<i>E.faecalis</i>	E20q	46 A	<i>E. faecium</i>	
	47	<i>E.faecalis</i>		47 A	<i>E. faecium</i>	
	50	<i>E.faecium</i>		48 A	<i>E. faecium</i>	
	E13q	51		<i>E.faecium</i>	49 A	<i>E. faecium</i>
		52		<i>E.faecium</i>	50 A	<i>E. faecium</i>
54		<i>E.faecium</i>				
55		<i>E.faecium</i>				
E14q	56	<i>E.faecalis</i>				
	57	<i>E. faecalis</i>				
	58	<i>E. faecium</i>				
	61	<i>E. faecalis</i>				
	62	<i>E. faecium</i>				
63	<i>E. faecium</i>					
65	<i>E. faecium</i>					

Figura 1 - Dendrograma de similaridade genética, com base no índice de Jaccard, dos enterococos provenientes de amostras clínicas utilizando os oligonucleotídeos P4 e OPA17

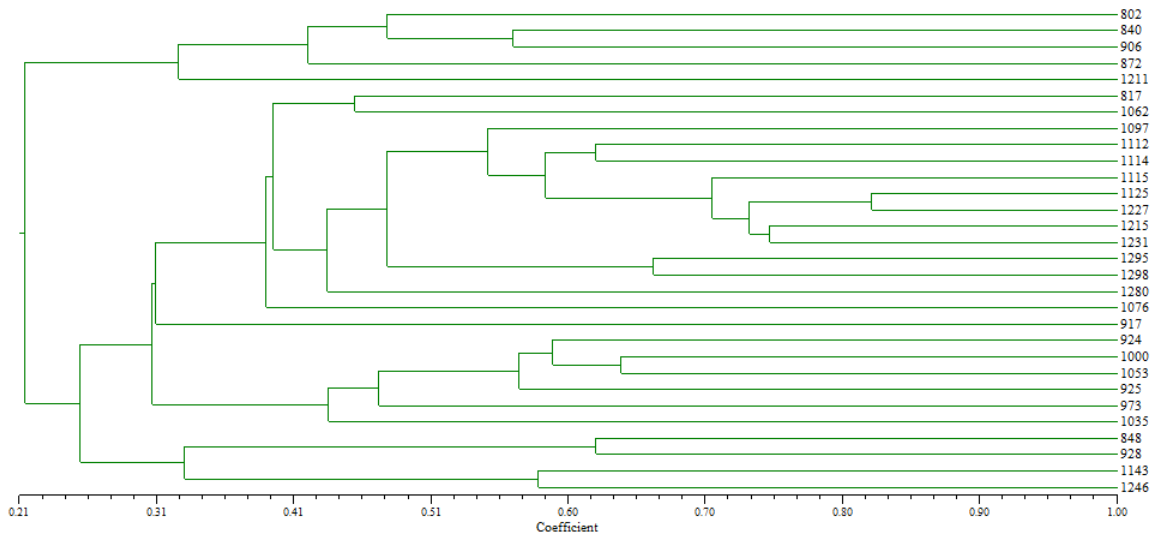


Figura 2 - Dendrograma de similaridade genética, com base no índice de Jaccard, dos enterococos provenientes de amostras de alimento, utilizando os oligonucleotídeo P4 e OPA17.



Figura 3 - Distribuição dos fatores de virulência entre amostras de enterococos provenientes de alimentos e clínicas. Gene *ace*, adesina; *asa1*, substância de agregação; *gelE*, gelatinase; *cylA*, citolisina A; *cpd*, feromônio sexual.

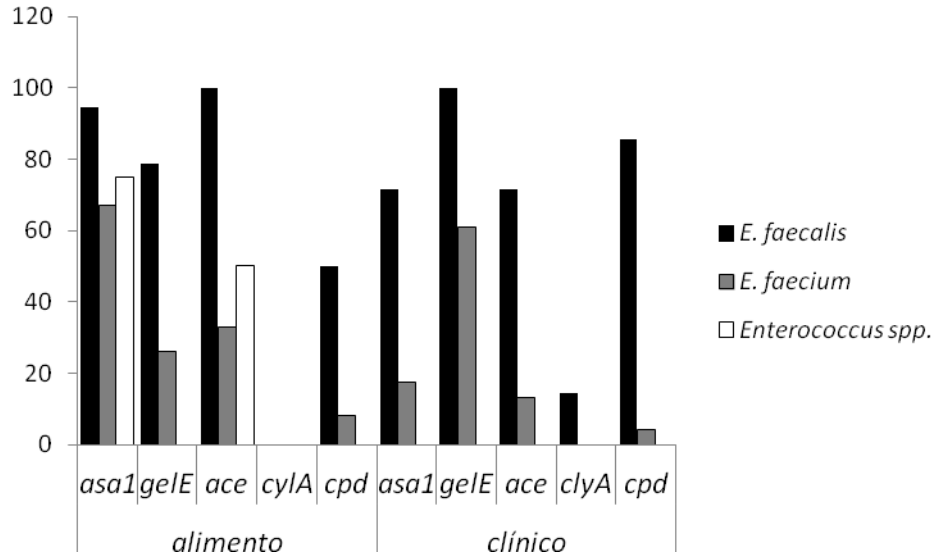


Figura 4 - Distribuição de genes de resistência e sua expressão em enterococos de alimento e clínicos. A- Frequência de genes de resistência. B- Frequência das porcentagens de resistência. TET= tetraciclina, ERY= eritromicina, VAN, vancomicina.

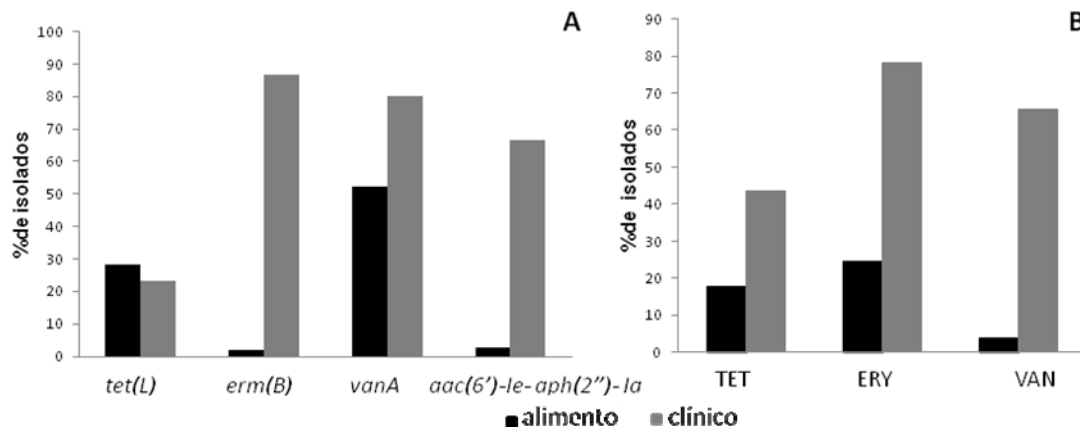


Figura 5 - Distribuição da frequência em porcentagens de expressão da gelatinase entre os enterococos de alimento e clínicos.

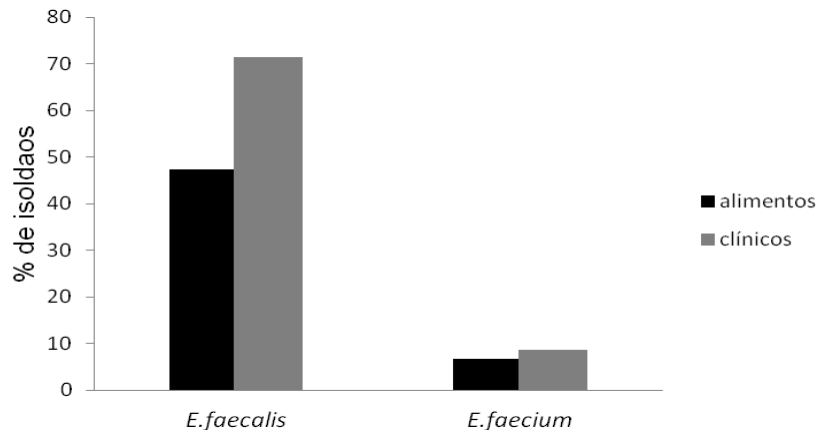
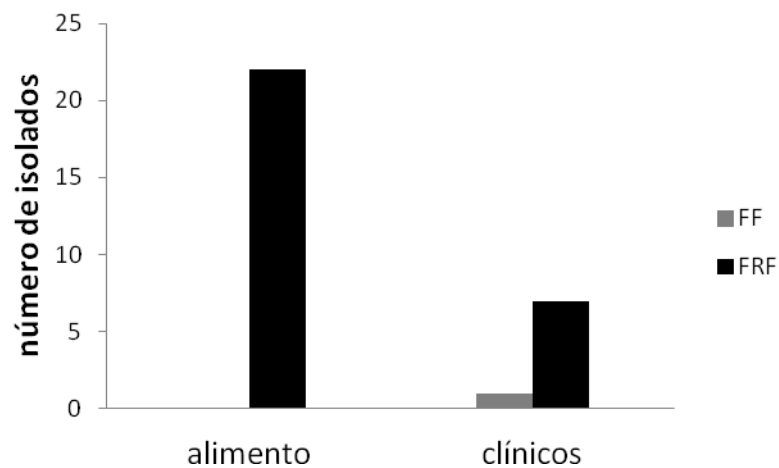


Figura 6 - Formação de biofilme por isolados de enterococos provenientes de amostras clínicas e alimento. FF= fortemente formador de biofilme; FRF= fracamente formador de biofilme.



PARTE 2

Comparison between automated system and molecular analysis for identification and susceptibility testing of *Enterococcus* spp.

Kátia Real Rocha; Vera Lúcia Dias Siqueira; Márcia Cristina Furlaneto; Luciana Furlaneto-Maia

Abstract: *Enterococcus* spp. is an important pathogens and accurate determination of genus and resistance is important to ensure appropriate therapy. This study was undertaken to compare the results obtained by automated systems with molecular method. We evaluated 30 isolates belonging to different species of *Enterococcus*. The general agreement between results obtained by the molecular method and by the automatic MicroScan® was 90.0% (27/30). For all isolates of *E. faecium* and *E. faecalis* we observed that the automated system correctly identified 100% of the strains and that the species classified by automation as *E. gallinarum* and *E. durans / hirae* were all identified as *E. faecium* by the PCR. Results point to the need of improvement in the automated systems to identify enterococci less frequently isolated. Having conventional physiological tests as the reference method, the use of an automated system in the identification must be taken regarding less frequently isolated species. All isolates were investigated for gene of resistance vancomycin, gentamicin, tetracycline and eritromycin. The comparison with the resistance genes and the test susceptibilities by automated method showed that 43.3% disagreed, because it does not amplify the gene but there was resistance in MIC. Antimicrobial susceptibilities to vancomycin, 30 µg; ampicillin, 10 µg; tetracycline, 30 µg; erythromycin, 15 µg; ciprofloxacin, 5 µg and norfloxacin 10 µg were also studied by disk diffusion method according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines. Where resistance rates obtained were higher for ciprofloxacin (83,3%) and norfloxacin (80.0%). For correlation with disk diffusion and by automation revealed excellent agreement for majority of the antibiotics with category agreement rates of > 80%. In conclusion, based on the data obtained, MicroScan® system is reliable for identification and testing susceptibilities of *Enterococcus* spp. to these antimicrobials. Since isolation of resistant enterococci has an important impact in terms of hospital infection control, this system should be confirmed with an alternative susceptibility testing for enterococci and identification method for species less frequently isolated.

INTRODUCTION

Enterococci are the third most common pathogen isolated from several infections and a rapid identification and susceptibility testing provide information essential to the effective management of patients with infectious diseases by this genus.

The coexistence of a pathogen population with an ever-increasing resistance to many antibiotics and a patient population characterized by increasingly complex clinical problems has contributed to an increase in nosocomial infections, particularly those caused by antibiotic-resistant Gram-positive bacteria (LINDEN, 1998). Therefore the introduction of automated systems has reduced the time to diagnosis and treatment in infections.

Greater mortality rates, antibiotic resistant *Enterococcus* spp. infections are associated with prolonged hospitalization and increased health-care costs relative to antibiotic-sensitive bacterial infections (ASCAR, 1997; RUBIN, 1999), and an automated system for rapid identification and susceptibility testing of bacteria, leads to a significant reduction of patient morbidity, mortality and cost (BRUINS et al., 2004).

However, the identification and susceptibility testing of microorganisms usually takes 24–48 h after initial growth in a routine laboratory, and susceptibility testing can be performed within one working day. Several studies have compared direct and standard methods for different automated systems, but to our knowledge less study has yet done comparing this with molecular technics for *Enterococcus* sp. (WAITES et al., 1998; HANSEN et al., 2002).

The difficulty in treating enterococci infections, particularly with respect to vancomycin resistant, emphasizes the need for a safe and therapeutic guidance for rapid identification and conduct of infection hospital control.

In view of these data, this study aimed to accuracy of automated system versus molecular technics for identification and susceptibility testing of *Enterococcus* sp. and the clinical risk of an approach using results of direct testing only.

METHODS

Samples

A total of 30 *Enterococcus* spp. isolates was collected during the years of January 2008 to June 2010, from several patients of University Hospital of State University of Maringá (UEM). The origins of the isolates were urine, blood, orotracheal fluid and rectal swab. The MicroScan® was used for monitoring bacterial growth by using the standard growth detection algorithms provided by the system. All

reading and interpretation of panel results was used to identification and sensibility test by Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas/UEM.

Isolation of enterococcal DNA, identification and detection of resistance genes by PCR

Enterococcus spp. genomic DNA was extracted by the boiling method as described by Marques and Suzart (2004). The identification of enterococci was detected by polymerase chain reaction (PCR) using specific primers targeted that amplify genes *ddl_{E.faecalis}* and *ddl_{E.faecium}* corresponds respectively to identify *E. faecalis* and *E. faecium* respectively (Table 1). The primers for the *vanC-1*, *vanC-2* and *vanC-3* genes are specific for *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* and *E. flavescens* respectively (DUTKA-MALEN et al., 1995). Specific primers for *Enterococcus* sp genus members used in this study was the *tuf* genes (KE et al., 1999). The detection of resistance genes were identified by PCR in all isolates of enterococci. The presence of gene *vanA*, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *erm(B)* and *tet(L)*, for vancomycin, gentamicin, eritromicin and tetracycline, respectively (Table 1).

All PCR amplifications were performed in a final volume 20 µl contained 1 pmol of each primer (Forward e Reverse), 0,17 mM dNTPs, 2,5 mM MgCl₂, 1 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen), buffer of Taq, and 10µl template DNA. Initial cycle of denaturation (94°C for 2 min), followed by 30 cycles of denaturation (94°C for 1 min), annealing at an appropriate temperature for 1 min and elongation (72°C for 10 min). A Thermal Cycler (Techne-Tc3000) was used to carry out the PCR reactions. PCR products were analyzed by gel electrophoresis in 1.5% agarose stained with ethidium bromide (0.5 g.ml⁻¹), observed under UV transillumination and photographed by L-PIX ST (LOCCUS).

Antimicrobial susceptibility testing

Susceptibility testing to 6 antimicrobial agents (vancomycin, 30 µg; ampicillin, 10 µg; tetracycline, 30 µg; erythromycin, 15 µg; ciprofloxacin, 5 µg and norfloxacin 10 µg) (Laborclin) was performed by the disk diffusion method. The diameters of inhibition zones were interpreted according to the interpretation criteria recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011. *Staphylococcus aureus* 25923 ATCC were used as control strain.

RESULTS

In the present study, 27 of 30 (90.0%) isolates showed concordant identification with automated systems and molecular method for the species of *Enterococcus* (Table 2). In our study, for the RAPD analysis was not observed isolated with 100% Jaccard's similarity in this study (no showed). Twenty isolates identified by automation as *E. faecium* and 6 isolates of *E. faecalis* were all confirmed by PCR for these species (Figure 1). *E. faecium* (76.7%) was a much higher incidence followed by *E. faecalis* (23.3%). In addition, the species classified by automation as *E. gallinarum* (isolate 817) and *E. durans* / *hirae* (isolate 917 and 1000) were all identified as *E. faecium* by the PCR.

The main origin of these isolates was the rectal swab, with 56.7% of presence. The others were 36.7% for urine and 3.3% for blood and orotracheal fluid.

Resistant genes detected

Antibiotic susceptibility tests and resistance genes detected by PCR of *Enterococcus* spp. isolated are shown in Table 3.

The primers to amplify the genes *erm(B)* and *tet(L)*, used in this study, are specific to species *E. faecium*, with an amplification product of 405 and 696 pb, respectively. Nine *E. faecium* not showed the expected amplification when their DNA was amplified with the primers for the *tet(L)* gene.

All the enterococcal strains were evaluated for the presence of resistance gene determinants. The presence of resistance genes *erm(B)*, *tet(L)*, *vanA* and *aac(6')-Ie-aph(2'')* were 86.7%, 23.3%, 80.0% and 66.7%, respectively. Several isolates showed the resistance gene to more than one antibiotic. Of significance were *tet(L)⁺/erm(B)⁺* to *E. faecalis* (42.8%) e *erm(B)⁺/aac(6')-Ie-aph(2'')*-*Ia⁺/vanA⁺* to *E. faecium* (69.6%).

The result by *vanA* gene was also detected in three strain of *E. faecalis* and twenty-two of *E. faecium* from human origin. Finally, twenty strain showed *van(A)* gene and showed resistance by automation.

Some isolates showed no resistance to the antibiotic, although there was the gene for it. In this case, the gene was not expressing the phenotypic characteristics.

The comparison with the resistance genes and the test susceptibilities by automated method showed that 46.7% (14/30) disagreed, because

it does not amplify the gene but there was resistance in MIC, they are 2 isolated to *erm(B)*, 10 to *tet(L)* and 3 to *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* gene.

Antimicrobial susceptibilities to ampicillin, erythromycin, tetracyclin, vancomycin, ciprofloxacin and norfloxacin were studied by disk diffusion method according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2011) guidelines. Evaluation revealed excellent agreement for all of the antibiotics with category agreement rates > 80% between automatized method and disk diffusion. Major error rates were for erythromycin, norfloxacin, vancomycin and tetracycline with 20.7%, 18.7%, 16.7% and 16.7% respectively. Minor error rates were found as 13.3% for ampicillin and ciprofloxacin.

Resistance rates obtained by disc diffusion were as follows: 83.3% for ciprofloxacin, 80.0% for norfloxacin, 80.0% for eritromicin, 66.7% for vancomycin, 63.3% for ampicillin, and 43,3% for tetracycline. Resistance frequencies were higher in *E.faecium* than *E.faecalis*.

DISCUSSION

Enterococci have been implicated in severe human infections as a consequence of associated determinants of virulence and antimicrobial resistance.

In this study, we describe a comparison between automatic and molecular systems. Results point to the need of improvement in the automated systems to identify enterococci. Special consideration must be taken regarding less frequently isolated species. Several studies showed difference between automatic and classical or molecular bacterial identification systems. Jin et al., (2011) that evaluated a concordance for the clinical isolates of enterococci by MicroScan of 82.4%.

Of the 50 Gram-negative rods studied, only 31 (62%) showed concordant identification between the direct and standard methods, 14 (28%) were reported as not identified organism, and 5 (10%) were misidentified (CUETO, 2004). With Gram positive bacteria, none gram-positive cocci showed concordant identification between the direct and standard methods: 13 isolates were not identified, and 37 were misidentified. Most of the mistaken isolates (17 of 37) (45%) were identified as *Kocuria* spp. or *Micrococcus luteus*. Other discrepancies consisted of misidentification between various species of coagulase-negative staphylococci (CUETO, 2004).

On the other hand, some studies showed the agreement between automatic and classical or molecular bacterial identification systems. D'Azevedo (2004) used the automated system in the identification of 80 isolates belonging to different species of *Enterococcus*. The general agreement between results was 83.7%. Among isolates of *E. faecalis* and *E. faecium* were observed that the automated system correctly identified 35/40 (87.5%) and 12/14 (85.7%) of the strains, respectively.

Robredo et al. (2000) used the API20 STREP to identify enterococci obtained from several origin and compared the results with those obtained using colony hybridization. They did not observe discrepant results for *E. faecalis* but observed that eight isolates identified as *E. durans* and *E. casseliflavus* by the API20 STREP were actually *E. faecium* according to the molecular method.

In our study, both isolate identified as *E. durans/E. hirae* and *E. gallinarum* by automatic were identified by molecular systems as *E. faecium*. This work showed that non typical species of *Enterococcus* spp. creates difficulties for an appropriate identification of this genus and indicates the need of including further tests in the commercially available systems. Moreover, according to Willey et al. (1999), the emergence of antibiotic resistant enterococci demands for more accurate identification of species less commonly associated with clinical infections. Biochemical tests are based on visual interpretation of results and these readings are subjective and more prone to misinterpretation.

Lupetti et al (2010) studied 56 (82%) of the 68 isolates were correctly identified using the direct method. All misidentified isolates belong to the genus *Staphylococcus*: one *S. aureus* was incorrectly identified as *Pediococcus pentosaceus*; three of the six *S. epidermidis* isolates were identified as *S. hominis*, and the other as *S. saprophyticus*, *S. simulans* and *S. caprae*.

Although, in this study, the automatic methods was agreement with molecular tecnics. However, considering the costs and time of analysis, PCR is a cheaper, faster and more specific method to perform identification of enterococci.

We identificated the high incidence of *E. faecium* and several multi resistance strains. Rapid and reliable identification of these antibiotic resistant organisms is crucial for patient management and infection control measures. Enterococci are intrinsically resistant to many antimicrobial agents, and their ability to acquire resistance to other agents such as aminoglycosides, β -lactams and

glycopeptides (vancomycin and teicoplanin) is well known, resulting in invasive human enterococcal infections that are extremely difficult to treat. Almost all *Enterococcus* strains displayed resistance to at least one antibiotic tested. Vancomycin resistance gene was analysed using specific primers for amplification of the *vanA*, but on *Enterococcus* spp. there are *vanB*, *vanC-1*, *vanC-2/3* and *vanD* genes (TORRES et al., 2006).

Vancomycin is an important therapeutic option for treatment of severe enterococcal infections and resistance to this type of antibiotic is worrisome. In addition, the risk of transference of vancomycin resistance from enterococci to other pathogenic bacteria such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is also an issue of concern (COURVALIN, 2006). Different mechanisms of vancomycin resistance have been described, either of acquired type (*vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE*, *vanG* and *vanL*), as well as of intrinsic type (*vanC*, associated with the *E. gallinarum* and *E. casseliflavus/flavescens* species) (GHOLIZADEH and COURVALIN, 2000; WERNER et al., 2008). These mechanisms are commonly associated with specific phenotypes of resistance, being the *vanA* and *vanB* mechanisms (specially the *vanB2* variant) the most frequently detected in human infections. However, the *vanA* and *vanB2* mechanisms are mediated by the *vanA* and *vanB2* cluster of genes.

Identified risk factors for VRE acquisition include prolonged hospital stay, exposure to intensive care units or residence on transplant oncology wards, prior exposure to antibiotics, and proximity to other patients infected or colonized with VRE (USACHEVA et al., 2010). Therefore, rapid detection and isolation of patients carrying VRE are key infection control elements for reducing spread within health care settings (RATANASUWAN et al., 1999).

Some previous studies have reported two main sources of error in both bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing by direct inoculation, being mixed cultures and nonstandardized inoculum size (FONTANALS et al., 2002).

Torres et al. (2006) also reported the presence of genes encoding resistance in *Enterococcus* sp. to erythromycin (*erm(A)*, *erm(B)* and *erm(C)*) and aminoglycosides (*aac(6'')-Ie-aph(2')-Ia*) analysed by PCR using primers.

In enterococci, two major groups of tetracycline resistance genes have been identified. One group that encoding ribosomal protection proteins include *tet(M)*, *tet(O)* and *tet(S)* genes, and the another one that encodes tetracycline efflux

pumps proteins include the *tet(L)* and *tet(K)* genes (HUYS et al. 2004; POETA et al. 2005; KOBASHI et al. 2007). Frazzon et al (2010) detected the *tet(L)* gene in 9% of isolates of *Enterococcus* sp, and Stovcik et al. (2008) observed in *Enterococcus* spp. tetracycline resistance strains, a prevalence 21% *tet(L)* genes, happening lowering frequency. In our study we detect the *tet(L)* gene in 23.3% (7/30) isolated, but four and five these were tetracycline resistance in automated and disk diffusion method, respectively.

Disc diffusion, agar dilution, Etest, and API Enteroc 5 tests were compared in *Enterococcus* strains isolated from various clinical specimens, and the API method was considered unreliable in detecting high level aminoglycoside resistance (SIRIN, ADILOGLU, 2011). However in our study, the automated systems and disk diffusion method were agreed in about 80%. Gülmez and Hasçelik (2011) compared Phoenix system and microdilution method revealed excellent agreement for all of the antibiotics with category agreement rates of > 97%.

In our study, the disc diffusion and automatic method were equally reliable for the detection of all antimicrobials studied and the automatic method is considered easy to perform and inexpensive method.

Antibiotic resistance appears to have contributed to increasing administration of inadequate antimicrobial therapy for infections, particularly enterococci nosocomial acquired infections, which is associated with greater hospital mortality rates (LEIBOVICI et al., 1998; CHOW et al., 1991).

The primary objective of the study was to determine whether molecular identification and direct antimicrobial susceptibility testing would provide results comparable to those obtained from an automated system in routine use. We wanted to assess whether this technique could be used to reduce turn around time and permit the application of appropriate therapy sooner than if it had been determined by the conventional method.

CONCLUSIONS

This study showed that the identification and test susceptibility of *Enterococcus* spp. with automated system showed agreement with molecular and disk diffusion method, respectively. Although the automated system needs improvement for identification of enterococci less frequently isolated. Since, isolation of resistant enterococci has an important impact in terms of hospital infection control;

this system should be confirmed with an alternative susceptibility testing for enterococci and identification method for species less frequently isolated, for conduct of therapy effective.

Acknowledgement

This research was supported by grants from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and Kátia Real Rocha is fellowship holders of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

- ASCAR JF. Consequences of bacterial resistance to antibiotics in medical practice. **Clinical Infectious Disease**, v.24, p.17–18, 1997.
- BELL, I.M.; PATON, J.C.; TURNIDGE, J.; Emergence of vancomycin-resistant enterococci in Australia: phenotypic and genotypic characteristics of isolates, **Journal of Clinical Microbiology**, v.36,p.2187–2190, 1998.
- BRUINS, M.J. et al. Identification and Susceptibility Testing of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* by Direct Inoculation from Positive BACTEC Blood Culture Bottles into Vitek 2. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.7–11, 2004.
- CHOW, J.W. et al. Enterobacter bacteremia: clinical features and emergence of antibiotic resistance during therapy. **Annals of Internal Medicine**, v.115, p.585–590, 1991.
- CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing**; Twenty-First Informational Supplement Approved standard M100-S21, v. 31, 2011.
- COURVALIN, P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. **Clinical Infectious Diseases** , v.42, p.S25–S34, 2006.
- CUETO, M. et al. Use of Positive Blood Cultures for Direct Identification and Susceptibility Testing with the Vitek 2 System. **Journal of clinical microbiology**, v.42, p. 3734–3738, 2004.
- D 'AZEVEDO, P. A. et al. Avaliação de um sistema automatizado na identificação de espécies de *Enterococcus*. **Jornal Brasileiro de Patologia Medicina Laboratorial**, v. 40, p. 237-9, 2004.
- DUKTA-MALEN, S., EVERS, S. AND COURVALIN, P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p.24–27, 1995.

- FONTANALS, D., F. et al. Evaluation of wider systems for direct identification and antimicrobial susceptibility testing of gram-negative bacilli from positive blood culture bottles. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease**, v. 21, p.693–695, 2002.
- FRAZZON, A. P.G. et al. 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. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.26, p.365–370, 2010.
- GEVERS, D. et al. Molecular characterization of *tet(M)* genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry sausage, **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.1270–1275, 2003.
- GHOLIZADEH, Y.; COURVALIN, P., 2000. Acquired and intrinsic glycopeptide resistance in enterococci. **International Journal of Antimicrobial**, v. 16, p. 11–17, 2000.
- GÜLMEZ, D.; HASÇELİK, G. Comparison of microdilution method and Phoenix automated system for testing antimicrobial susceptibilities of *Enterococcus* strains. **Mikrobiyoloji Bulteni**, v.45, p.21-27. 2011.
- HANSEN, D. S. et al. 2002. Direct identification and susceptibility testing of enteric bacilli from positive blood cultures using VITEK (GNI_/GNS-GA). **Clinical Microbiology and Infectious**, v.8, p.38–44, 2002.
- HUYS, G.; D'HAENE, K.; COLLARD, J.C.; SWINGS, J. Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from food. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p.1555–1562, 2004.
- JENSEN, L.B. et al. Molecular analysis of the Tn 1546 in *Enterococcus faecium* isolated from animals and humans. **Journal Clinical Microbiology**, v. 36, p. 437–442, 1998.
- JIN, WY. Evaluation of VITEK 2, MicroScan, and Phoenix for identification of clinical isolates and reference strains. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** v.70, p.442–447, 2011.
- KE, D. et al. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.3497-3503, 1999.
- KOBASHI, Y.; HASEBE, A.; NISHIO, M.; UCHIYAMA, H. Diversity of tetracycline resistance genes in bacterial isolated from various agricultural environmental. **Microbes and Environmental**, v.22, p.44–51, 2007.
- LEIBOVICI L, SHRAGA I, DRUCKER M.; KONIGSBERGER, H.; SAMBA.Z.; PITLIK, S.D. The benefit of appropriate empirical antibiotic treatment in patients with bloodstream infection. **Journal Internal of Medicine**, v.244, p.379–386, 1998.
- LINDEN PK. Clinical implications of nosocomial Gram-positive bacteremia and superimposed antimicrobial resistance. **American Journal of Medicine**, v.104, p.24–33, 1998.

- LUPETTI, S. et al. Rapid identification and antimicrobial susceptibility testing of Gram-positive cocci in blood cultures by direct inoculation into the BD Phoenix system. **Clinical Microbiology Infectious**, v.16, p.986–991, 2010.
- MARQUES, E.B.; SUZART, S. *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina, Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v.53, 1069–1073, 2004.
- POETA, P. et al. Characterization of antibiotic resistance genes and virulence factors in faecal enterococci of wild animals in Portugal. **Journal of Veterinary Medicine**, v.52, p.396–402, 2005.
- PERRETEN, V. et al. Microarray based detection of 90 antibiotic resistance genes of Gram positive bacteria, **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p. 2291–2302, 2005.
- RATANASUWAN W, IWEN PC, HINRICHS SH, et al. Bacteremia due to motile *Enterococcus* species: clinical features and outcomes. **Clinical Infectious Disease**, v.28, p.1175-1177, 1999.
- ROBREDO, B. et al. Vancomycin-resistant enterococci isolated from animals and food. **International Journal Microbiology**, v.54, 197-204, 2000.
- RUBIN, R.J. et al. The economic impact of *Staphylococcus aureus* infection in New York city hospitals. **Emerging Infectious Diseases**, v.5, p.9–17, 1999.
- TORRES, C. et al. Detection of clonally related vanB2- containing *Enterococcus faecium* strains in two Spanish hospitals. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 1237-1243, 2006.
- SIRIN, M.C.; ADILOĞLU, A.K. Comparison of five antimicrobial susceptibility tests in detecting high level aminoglycoside and vancomycin resistances in hospital acquired *Enterococcus* isolates. **Clinical Laboratory**. v.57,p.157-62, 2011.
- STOVCIK,V.; JAVORSKY, P.; PRISTAS, P. Antibiotic resistance patterns and resistance genes in enterococci isolated from sheep gastrointestinal tract in Slovakia. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v.52, p. 53-57, 2008.
- USACHEVA, E. A. et al. Prospective, Multicenter Evaluation of the BD Gene Ohm VanR Assay for Direct, Rapid Detection of Vancomycin- Resistant *Enterococcus* Species in Perianal and Rectal Specimens. **American Journal of Clinical Pathology**, v.134, p.219-226, 2010.
- VAKULENKO, S.B. et al. Multiplex PCR for detection of aminoglycoside resistance genes in enterococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.47, p. 1423–1426, 2003.
- WAITES, K. B. et al. Direct Susceptibility testing with positive BacT/Alert blood cultures by using Micro-Scan overnight and rapid panels. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p.2052–2056, 1998.

WERNER, G.; COQUE, T.M.; HAMMERUM, A.M. et al. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. **Eurosurveillance**, v.13, p.1–11, 2008.

WILLEY, B.M. et al. Practical approach to the identification of clinically relevant *Enterococcus* species. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.34, 165-171, 1999.

Parte 2

Table 1 - Primers used in this study for identification of *Enterococcus* spp. and detection of different resistance genes by PCR.

Gene	Sequência nucleotídica (5'- 3') ^a	Ta (°C)	Tamanho do produto (bp)	Referências
<i>tuf</i>	TACTGACAAACCATTTCATGATG AACTTCGTCACCAACGCGAAC	56	112	KE et al., (1999)
<i>vanC-1</i>	GGTATCAAGGAAACCTC CTTCCGCCATCATAGCT	56	822	
<i>vanC-2, vanC-3</i>	CTCCTACGATTCTCTTG CGAGCAAGACCTTTAAG	56	439	Dukta-Malen et al., (1995)
<i>ddl_{E.faecalis}</i>	ATCAAGTACAGTTAGTCT ACGATTCAAAGCTAACTG	56	941	
<i>ddl_{E.faecium}</i>	TAGAGACATTGAATATGCC TCGAATGTGCTACAATC	56	550	
<i>vanA</i>	GTAGGCTGCGATATTCAAAGC CGATTCAATTGCGTAGTCCAA	56	231 <i>E.faecium</i> 330 <i>E.faecalis</i>	Bell et al., (1998)
<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>	CAGAGCCTTGGGAAGATGAAG CCTCGTGTAATTCATGTTCTGGC	56	348	Vakulenko, et al., (2003)
<i>erm(B)</i>	CATTTAACGACGAAACTGGC GGAACATCTGTGGTATGGCG	56	405	Gevers, et al., (2003)
<i>tet(L)</i>	GTMGTTGCGCGCTATATTCC GTGAAMGRWAGCCACCTAA	56	696	

Ta(°C)= temperature of aneling/ aM= A or C; R= A or G; W = A or T/ gene *tuf*, *Enterococcus*; *vanC-1*, *E. gallinarum*; *vanC-2, vanC-3*, *E. casseliflavus*, *E. flavencens*; *tet(L)*, tetracycline; *erm(B)*, erythromycin; *aac(6')-aph(2')-Ia*, gentamicin and *vanA*, vancomycin.

Table 2 - Identification of clinical strain for automated systems and molecular method.

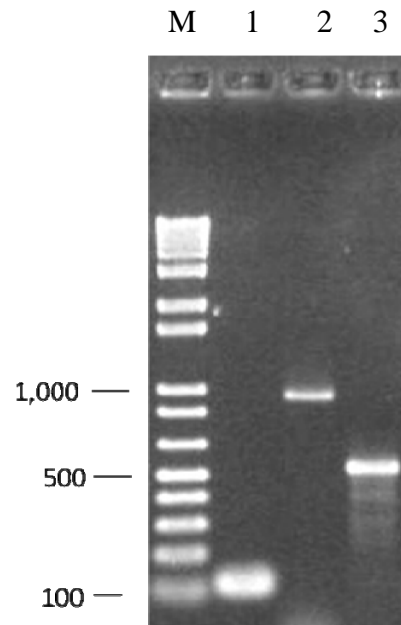
Strain	origin	Identification	
		automated systems	molecular method PCR
802	urine	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
817	rectal swab	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. faecium</i>
840	blood	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
848	urine	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
872	orotracheal fluid	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
906	urine	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
917	urine	<i>E. durans/hirae</i>	<i>E. faecium</i>
924	rectal swab	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
925	rectal swab	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
928	urine	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
973	urine	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
1000	urine	<i>E. durans/hirae</i>	<i>E. faecium</i>
1035	rectal swab	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
1053	rectal swab	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
1062	rectal swab	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
1076	rectal swab	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
1097	rectal swab	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
1112	rectal swab	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
1114	rectal swab	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
1115	rectal swab	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
1125	rectal swab	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
1143	rectal swab	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
1211	urine	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
1215	rectal swab	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
1227	urine	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
1231	urine	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
1246	urine	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
1280	rectal swab	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
1295	rectal swab	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
1298	rectal swab	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>

Table 3 - Antibiotic resistant phenotypes of *Enterococcus* species isolated and resistant genes detected.

Strain	Genes detected by PCR						Antibiotic resistance phenotype (MIC µg/mL)*			
	<i>erm(B)</i>	<i>tet(L)</i>	<i>vanA</i>	<i>aac(6')</i> <i>-Ie-</i>	<i>aph(2')</i> <i>-Ia</i>		ERY	TET	VAN	GEN
802	+	+	+	-	-		> 4 R	> 8 R	≤ 2 S	≤ 500 S
817	-	-	+	+			≤ 0,5 S	> 8 R	8 I	≤ 500 S
840	-	-	+	-			>4 R	≤ 4 S	≤ 2 S	≤ 500 S
848	+	+	-	-			2 S	≤ 4 S	≤ 2 S	≤ 500 S
872	+	+	-	-			> 4 R	> 8 R	≤ 2 S	≤ 500 S
906	+	+	-	-			> 4 R	> 8 R	≤ 2 S	≤ 500 S
917	+	+	-	-			> 4 R	> 8 R	≤ 2 S	≤ 500 S
924	+	-	+	+			> 4 R	≤ 4 S	> 16 R	≤ 500 S
925	+	+	+	+			>4 R	≤ 4 S	> 16 R	≤ 500 S
928	+	-	+	+			--/--	> 8 R	≤ 2 S	--/--
973	+	-	+	+			> 4 R	> 8 R	≤ 2 S	--/--
1000	+	-	+	+			> 4 R	≤ 4 S	> 16 R	> 500 R
1035	+	-	+	+			> 4 R	> 8 R	> 16 R	> 500 R
1053	+	-	+	+			> 4 R	> 8 R	> 16 R	≤ 500 S
1062	+	-	+	+			> 4 R	≤ 4 S	> 16 R	> 500 R
1076	+	-	+	+			> 4 R	> 8 R	> 16 R	≤ 500 S
1097	-	-	+	+			> 4 R	> 8 R	> 16 R	≤ 500 S
1112	+	-	+	-			> 4 R	≤ 4 S	> 16 R	> 500R
1114	+	-	+	+			> 4 R	≤ 4 S	> 16 R	> 500R
1115	+	-	+	-			> 4 R	≤ 4 S	> 16 R	> 500 R
1125	+	+	+	+			> 4	≤ 4 S	> 16 R	> 500 R
1143	+	-	+	-			> 4 R	≤ 4 S	> 16 R	>500 R
1211	-	-	-	-			≤0,5 S	≤ 4 S	≤ 2 S	≤ 500 S
1215	+	-	+	+			> 4 R	> 8 R	> 16 R	≤ 500 S
1227	+	-	+	+			> 4 R	≤ 4 S	> 16 R	>500R
1231	+	-	+	+			> 4 R	> 8 R	> 16 R	≤ 500 S
1246	+	-	+	+			> 4 R	≤ 4 S	> 16 R	> 500 R
1280	+	-	+	+			> 4 R	≤ 4 S	> 16 R	> 500 R
1295	+	-	+	+			> 4 R	≤ 4 S	> 16 R	> 500 R
1298	+	-	+	+			> 4 R	> 8 R	> 16 R	≤ 500 S

MIC: minimal inhibitory concentration; ERY: erythromycin; TET: tetracyclin; VAN: Vancomycin; GEN: Gentamicin (120µg/mL); --/--: data no showed by hospital; S: sensible; R: resistance; I: intermediate resistance. (*) result of the automated method.

Figure 1 - Agarose gel electrophoresis of polymerase chain reaction (PCR) amplification of *Enterococcus* sp gene



Lanes: 1 *Enterococcus* spp. (112 pb); 2, *E.faecalis* (941 pb); 3, *E.faecium* (550 pb); M, Ladder 1kb plus (Invitrogen)

CONCLUSÕES

- As espécies de enterococos identificadas em ambas as amostras foram *E. faecalis*, *E. faecium*, sendo a maior incidência para a espécie *E. faecium*;
- A comparação da identificação de espécie pela técnica de PCR com o método automatizado mostrou uma concordância de 90,0% para os enterococos clínicos;
- A análise de RAPD mostrou que ambos os isolados clínicos e de alimentos apresentaram uma alta diversidade genética;
- A frequência de isolados que abrigaram maior quantidade de fatores de virulência foi maior para *E. faecalis*, enquanto os isolados de *E. faecium* apresentaram maior frequência de expressão fenotípica de resistência em enterococos clínicos e de alimento;
- A expressão da gelatinase foi maior para os isolados clínicos;
- A formação de biofilme foi observada tanto em isolados clínicos quanto de alimento;
- A correlação dos genes de resistências com o método de disco-difusão teve variação dependente do antimicrobiano, no qual foram mais concordantes para os isolados clínicos;
- A frequência de resistência aos antimicrobianos foi maior nos isolados clínicos, para todos os antimicrobianos avaliados, quando comparado com os isolados de alimento;
- A concordância para isolados das amostras clínicas entre o método de disco difusão com os teste de susceptibilidade fornecidos pelo sistema automatizado foram > 80%;