

# Determinantes de virulência em *Enterococcus* endógenos de queijo artesanal<sup>1</sup>

Determinants of virulence in *Enterococcus* endogenous to artisanal cheese

Bruna Castro Porto<sup>2</sup>, Graciela Fujimoto<sup>3</sup>, Maria de Fatima Borges<sup>2\*</sup>, Laura Maria Bruno<sup>2</sup> e Juliane Döering Gasparin Carvalho<sup>4</sup>

**RESUMO** - A presença de *Enterococcus* spp. em alimentos representa um perigo para a saúde pública, devido a sua frequente associação a várias infecções clínicas. A patogenicidade de *Enterococcus* é multifatorial, complexa e ocorre a partir de uma sequência de fatores de virulência. O objetivo do estudo foi avaliar a presença de determinantes fenotípicos e genotípicos de virulência em *Enterococcus* spp. isolados de queijo de Coalho. Um total de 53 cepas de *Enterococcus* spp. foram analisadas quanto à susceptibilidade a antimicrobianos, produção de hemolisinas, DNase, termonuclease, gelatinase e o perfil de genes codificadores de virulência. Observou-se que 75,5% das cepas foram resistentes a pelo menos um dos nove antibióticos testados, 26,42% foram resistentes a dois e 3,77% a três antibióticos. A presença de fenótipos de resistência à vancomicina foi constatada em 11,33% das cepas. A atividade hemolítica foi observada em 100% das cepas, a produção de DNase, em apenas 3,8%, e não houve produção de termonuclease e gelatinase. As cepas resistentes à vancomicina e teicoplanina foram identificadas como *E. faecium* e *Enterococcus* spp. O perfil de determinantes genéticos de virulência foi bastante variável e 90% das cepas abrigavam pelo menos um dos nove genes pesquisados. O gene *efaA* apresentou maior prevalência (70%), seguido do gene *ace* (50%), gene *esp* e gene *gelE* (40%).

**Palavras-chaves:** Produtos lácteos. Bactérias ácido láticas. Patogenicidade. Susceptibilidade a antibióticos.

**ABSTRACT** - The presence of *Enterococcus* spp. in food poses a danger to public health due to its frequent association with various clinical infections. Pathogenicity in *Enterococcus* is multifactorial and complex, and stems from a sequence of virulence factors. The aim of this study was to evaluate the presence of phenotypic and genotypic determinants of virulence in *Enterococcus* spp. isolated from curd cheese. A total of 53 strains of *Enterococcus* spp. were analysed as to their susceptibility to antimicrobial agents, production of hemolysins, DNase, thermonuclease, and gelatinase, and the profile of virulence-encoding genes. It was found that 75.5% of the strains were resistant to at least one of the nine antibiotics tested, 26.42% were resistant to two, and 3.77% to three antibiotics. The presence of vancomycin-resistance phenotypes was seen in 11.33% of the strains. Haemolytic activity was observed in 100% of strains and DNase production in only 3.8%. There was no production of thermonuclease or gelatinase. Strains resistant to vancomycin and teicoplanin were identified as *E. faecium* and *Enterococcus* spp. The profile of the genetic determinants of virulence was highly variable, and 90% of the strains harboured at least one of the nine genes being studied. The *efaA* gene showed the highest prevalence (70%), followed by the *ace* gene (50%), the *esp* gene and *gelE* gene (40%).

**Key words:** Dairy products. Lactic acid bacteria. Pathogenicity. Susceptibility to antibiotics.

DOI: 10.5935/1806-6690.20160008

\* Autor para correspondência

<sup>1</sup>Recebido para publicação em 18/03/2015; aprovado em 08/09/2015

Pesquisa financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

<sup>2</sup>Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza-CE, Brasil, portocbruna@gmail.com, maria.fatima@embrapa.br, laura.bruno@embrapa.br

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, Brasil, graciela.fujimoto@gmail.com

<sup>4</sup>Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, Brasil, juliane.gasparin@ufc.br

## INTRODUÇÃO

As bactérias ácido lácticas estão amplamente distribuídas na natureza e predominam na microbiota de alimentos ricos em carboidratos, proteínas e vitaminas. Os gêneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus* são comumente encontrados em queijos, principalmente artesanais (DOLCI *et al.*, 2008). No Brasil, os queijos são os produtos que mais apresentam *Enterococcus* spp. quando comparados a leites, produtos cárneos e vegetais (GOMES *et al.*, 2008).

O gênero *Enterococcus* pertence à família *Enterococcaceae* e inclui 52 espécies e duas subespécies (LPSN, 1998), sendo *E. faecium* e *E. faecalis* as espécies de maior ocorrência na microbiota natural de vários tipos de queijos (EATON; GASSON, 2001). Seu principal reservatório é o trato gastrointestinal do homem e dos animais, mas também é encontrado no solo e na água. A bactéria chega ao leite e seus derivados a partir de contaminação por material fecal, pele dos animais, água poluída, equipamentos de ordenha e tanques de recepção do leite.

A presença de *Enterococcus* em alimentos tem sido motivo de preocupação para os órgãos de saúde pública pela sua característica ambígua (MORAES *et al.*, 2012). Apesar de contribuir para o desenvolvimento das características sensoriais (FOULQUIÉ-MORENO *et al.*, 2006) e apresentar potencial para a biopreservação em queijos, por produzir bacteriocinas ativas contra patógenos (SANTOS *et al.*, 2014), podem abrigar vários genes codificadores de fatores de virulência (MORAES *et al.*, 2012).

Dentre os determinantes de virulência associados à patogenicidade destacam-se a resistência a antibióticos, como vancomicina (genes *vanA*, *vanB*, *vanC*) e a produção de proteínas extracelulares como: hemolisina (genes *cylA*, *cylB*, *cylM*, *cylL*), gelatinase (gene *gelE*), proteínas de superfície (gene *esp*), adesinas de parede celular (gene *efa*), adesinas de colágeno (gene *ace*), substância de agregação (gene *as*), DNase e termonuclease (EATON; GASSON, 2001; FOULQUIÉ-MORENO *et al.*, 2006; JOHANSSON; RASMUSSEN, 2013; MANNU *et al.*, 2003; YOGURTCU; TUNCER, 2013).

Na região Nordeste do Brasil, o queijo de Coalho é mais do que um produto típico, devido a sua relevância econômica e social. É produzido artesanalmente, baseado em técnicas que são transmitidas de geração a geração, envolvendo desde cedo as pessoas na atividade e tornando-as peças fundamentais na renda familiar (MOURA, 2012).

O queijo de Coalho apresenta uma microbiota natural diversificada, com predominância de *Enterococcus*

(SANTOS *et al.*, 2014). No entanto, há poucos dados sobre a sua patogenicidade. Tendo em vista o exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a presença de determinantes fenotípicos e genotípicos de virulência em *Enterococcus* spp. isolados de queijo de Coalho.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Microrganismos

O estudo foi realizado com 53 cepas de *Enterococcus* spp., selecionadas aleatoriamente, da Coleção de Microrganismos de Interesse para a Agroindústria Tropical da Embrapa Agroindústria Tropical. As cepas da coleção foram isoladas a partir de oito marcas de queijo de Coalho artesanal, comercializadas em Fortaleza, provenientes do Vale do Jaguaribe (Jaguaribe, Limoeiro do Norte e Morada Nova) e Sertões Cearenses (Quixadá e Tauá), estado do Ceará. As culturas foram previamente identificadas como *Enterococcus* spp. pelo sistema de identificação presuntivo API50CHL e API20Strep (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) (SANTOS *et al.*, 2014).

### Ativação das culturas

As cepas de *Enterococcus* spp. armazenadas a -80 °C foram descongeladas e ativadas em caldo Man, Rogosa e Sharpe - MRS (Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA). Após incubação a 35 °C/24h a cultura foi inoculada em meio Skim Milk (Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA) e mantida sob refrigeração (6-8 °C). Para a realização dos testes, as cepas foram repicadas em caldo MRS e estriadas em ágar MRS (35 °C/24-48 h) para obtenção de colônias isoladas, as quais foram selecionadas aleatoriamente para a realização dos testes de suscetibilidade a antibióticos e testes bioquímicos. Todos os ensaios foram realizados em três repetições.

### Avaliação da sensibilidade *in vitro* a antibióticos

A sensibilidade das cepas de *Enterococcus* foi determinada de acordo com a norma de Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão, recomendada pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2003). Foram avaliados nove antibióticos comerciais (Oxoid Limited, Basingstoke, Datford and Perth, UK): ampicilina (10 µg), cloranfenicol (30 µg), eritromicina (15 µg), estreptomina (300 µg), gentamicina (120 µg), norfloxacin (10 µg), teicoplanina (30 µg), tetraciclina (30 µg) e vancomicina (30 µg).

Uma colônia de cada cepa foi inoculada em caldo MRS e incubada a 35 °C/18-24 h. A suspensão

de células foi ajustada para  $10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$  e semeada em ágar Mueller-Hinton (Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA). Após secagem, os discos de antibióticos foram colocados sobre a superfície do ágar e as placas foram incubadas a  $35\text{ }^\circ\text{C}/16\text{-}18\text{ h}$ , exceto a da vancomicina ( $35\text{ }^\circ\text{C}/24\text{ h}$ ). A sensibilidade das cepas foi determinada pela medida do diâmetro dos halos de inibição em torno dos discos e classificada como sensível, intermediária e resistente com base nos halos de referência para cada antibiótico testado, estabelecidos na Norma de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana: 15<sup>o</sup> Suplemento Informativo, Normas Interpretativas do Teste de CIM ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) para *Enterococcus* spp., conforme recomendado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2005).

#### Atividade hemolítica

A produção de hemolisina foi avaliada em ágar infusão de cérebro e coração (Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA) suplementado com 5% de dois tipos de sangue. As cepas foram estriadas em placas de ágar sangue de carneiro e placas de ágar sangue de cavalo, e incubadas a  $35\text{ }^\circ\text{C}/48\text{ h}$  (EATON; GASSON, 2001). A atividade hemolítica foi observada pela formação de halos de  $\alpha$ -hemólise (zonas esverdeadas) e  $\beta$ -hemólise (zonas claras) ao redor das estrias/colônias. A ausência de atividade hemolítica foi classificada como  $\gamma$ -hemólise.

#### Produção de DNase

Colônias isoladas de cada cepa foram inoculadas em ágar DNase (Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA) e incubadas a  $35\text{ }^\circ\text{C}/48\text{ h}$ . Após o crescimento foi adicionado 1 mL de HCl 1N sobre as placas e observado o aparecimento de zonas claras ao redor das colônias evidenciando reação positiva (SÁNCHEZ-PORRO *et al.*, 2003).

#### Produção de termonuclease

A produção de termonuclease foi avaliada de acordo com Hasan *et al.* (2014) com algumas modificações. Alíquotas (100  $\mu\text{L}$ ) de cada cepa foram inoculadas em caldo BHI, incubadas a  $35\text{ }^\circ\text{C}/24\text{ h}$  e, após o crescimento, submetidas a tratamento térmico ( $100\text{ }^\circ\text{C}/20\text{ min}$ ). Em seguida, volumes de 50  $\mu\text{L}$  foram transferidos para cinco poços em ágar DNase (1 placa para cada cepa), suplementado com 0,83% de azul de toluidina a 1% e incubadas a  $35\text{ }^\circ\text{C}/24\text{ h}$ . A produção de termonuclease foi constatada pela formação de zonas de coloração rósea ao redor dos poços.

#### Produção de gelatinase

Colônias isoladas de cada cepa foram inoculadas em tubos com ágar gelatina nutriente (Becton, Dickinson

and Company, Sparks, USA), incubadas a  $35\text{ }^\circ\text{C}/14\text{ dias}$  e refrigeradas a  $4\text{ }^\circ\text{C}/1\text{ h}$ . A persistência da presença de meio líquido após o período de refrigeração indicou a produção de gelatinase (hidrólise da gelatina) pelas cepas (CRUZ; TORRES, 2014).

#### Identificação dos isolados

Com base na característica de resistência aos antibióticos vancomicina e teicoplanina foram selecionados 10 isolados de *Enterococcus* para identificação. O DNA foi extraído conforme descrito por Dogan *et al.* (2005) e mantido a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  até o uso. A identificação das espécies *E. faecium* e *E. faecalis* foi realizada pela amplificação com os primers Fk1, Fk2, Fae1 e Fae2 (Tabela 1).

As reações de PCR foram realizadas com 1  $\mu\text{L}$  de DNA molde; 0,2  $\mu\text{M}$  de cada primer; tampão PCR 1X; 2,0 mM de  $\text{MgCl}_2$ ; 0,2 mM de cada dNTP; e 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, EUA) em um volume final de 25  $\mu\text{L}$ . As amplificações foram conduzidas em termociclador (Eppendorf 5345) sob as seguintes condições: 1 min a  $94\text{ }^\circ\text{C}$ , 30 ciclos de  $94\text{ }^\circ\text{C}/1\text{ min}$ ,  $54\text{ }^\circ\text{C}/1\text{ min}$  e  $72\text{ }^\circ\text{C}/1\text{ min}$ , e uma etapa final a  $72\text{ }^\circ\text{C}/10\text{ min}$  (DUTKA-MALEN; EVERS; COURVALIN, 1995). Os produtos da PCR foram separados em gel de agarose 1,5%, corados com SYBR® Safe (Invitrogen Life Technologies, EUA) por 15 a 20 min e visualizados em transiluminador UV (Kodak D320). As cepas *E. faecalis* ATCC 7080 e *E. faecium* ATCC 6569 foram utilizadas como controles positivos.

#### Pesquisa de genes codificadores de virulência

A presença de genes de virulência (*ace*, *as*, *cyIM*, *cyIB*, *cylA*, *efaA*, *esp*, *gelE* e *vanA*) foi pesquisada pela amplificação com primers específicos, conforme descrito na Tabela 1. Os seguintes microrganismos de referência foram utilizados como controle positivo: *E. faecalis* ATCC 29212 para os genes *gelE*, *cylA*, *cyIB*, *cyIM*; *E. faecium* 329/99 (coleção do Laboratório de Higiene - FEA/Unicamp) para o gene *vanA*; *E. faecalis* 594 para o gene *esp* (MARQUES; SUZART, 2004); *E. faecalis* 341 para os genes *ace* e *efaA* (GOMES *et al.*, 2008) e *E. faecalis* 574 para o gene *as* (GOMES *et al.*, 2008).

Para amplificação dos genes *ace*, *as*, *esp*, *efaA* e *vanA*, as reações de PCR foram realizadas com 1  $\mu\text{L}$  de DNA molde; 0,2  $\mu\text{M}$  de cada primer; tampão PCR 1X; 2,0 mM de  $\text{MgCl}_2$ ; 0,2 mM de cada dNTP e 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, EUA) em um volume total de 25  $\mu\text{L}$ . O programa de PCR utilizado consistiu das seguintes etapas: etapa inicial de  $94\text{ }^\circ\text{C}/1\text{ min}$ ; 30 ciclos de 1 min a  $94\text{ }^\circ\text{C}$ , 1 min à temperatura de anelamento específica para cada par de primer (Tabela 1), 1 min a  $72\text{ }^\circ\text{C}$ ; e uma etapa final a  $72\text{ }^\circ\text{C}$  por 10 min (EATON; GASSON, 2001).

**Tabela 1** - Sequências dos *primers* e tamanho dos fragmentos dos genes avaliados por PCR

Gene	Marcador	Primers	Sequência (5' – 3')	Tamanho produto (pb)	Temp. de anelamento (°C)	Referência
<i>ddlE.faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	Fk1	ATCAAGTAC AGTTAGTCTT	941	54	Dutka-Malen, Evers e Courvalin (1995)
		Fk2	ACGATTCAAAGCTAACTG			
<i>ddlE.faecium</i>	<i>E. faecium</i>	Fae1	GCAAGG CTTCTTAGAGA	550	54	Dutka-Malen; Evers; Courvalin (1995)
		Fae2	CATCGTGTA AGCTAACTTC			
<i>Ace</i>	Adesinas de colágeno	ACE1	AAAGTAGAATTA GATCCACAC	320	50	Mannu <i>et al.</i> (2003)
		ACE2	TCTATCACATTTCGGTTGCG			
<i>As</i>	Substâncias de agregação	AS1	CCAGTAATCAGTCCAGAAACAACC	406	58	Mannu <i>et al.</i> (2003)
		AS2	TAGCTTTTTTCATTCTTGTTGTT			
<i>cylM</i>	Citolisinas	TE13	CTGATGGAAAGAAGATAGTAT	742	56	Eaton e Gasson (2001)
		TE14	TGAGTTGGTCTGATTACATTT			
<i>cylB</i>	Citolisinas	TE15	ATTCCTACCTATGTTCTGTTA	843	54	Eaton e Gasson (2001)
		TE16	AATAAACTCTTCTTTCCAAC			
<i>cylA</i>	Citolisinas	TE17	TGGATGATAGTGATAGGAAGT	517	56	Eaton e Gasson (2001)
		TE18	TCTACAGTAAATCTTTCGTCA			
<i>efaA</i>	Adesinas de parede celular	efaA1	CGTGAGAAAGAAATGGAGGA	499	60	Mannu <i>et al.</i> (2003)
		efaA2	CTACTAACACGTCACGAATG			
<i>Esp</i>	Proteínas de superfície	TE34	TTGCTAATGCTAGTCCACGACC	933	65	Eaton e Gasson (2001)
		TE36	GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA			
<i>gelE</i>	Gelatinase	TE9	ACCCCGTATCATTGGTTT	419	54	Eaton e Gasson (2001)
		TE10	ACGCATTGCTTTCCATC			
<i>vanA</i>	Resistência a vancomicina	VA1	CCCCTTTAACGCTAATACGATCAA	1030	52	Mannu <i>et al.</i> (2003)
		VA2	CATGAATAGAATAAAAGTTGCAAT			

Reações de multiplex PCR foram empregadas para amplificação dos pares de genes *gelE/cylB* e *cylA/cylM*. Cada reação foi realizada com 1 µL de DNA molde; 0,2 µM de cada primer; tampão PCR 1X; 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de cada dNTP e 1U de Taq DNA polimerase Platinum (Invitrogen Life Technologies, EUA). As condições da PCR foram constituídas das seguintes etapas: etapa inicial a 94 °C/3 min; 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min à temperatura de anelamento específica para cada par de primer (Tabela 1), 1 min a 72 °C; e uma etapa final a 72 °C por 10 minutos (GOMES *et al.*, 2008).

Os produtos da PCR foram separados em gel de agarose a 1,5%, corados com SYBR® Safe (Invitrogen Life Technologies, EUA) por 15 a 20 min e visualizados através de transiluminador UV (Kodak D320). As cepas que apresentaram os genes codificadores de virulência acima mencionados foram contabilizadas e os resultados expressos em termos percentuais considerando o total das 10 cepas selecionadas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Susceptibilidade a antibióticos

As cepas apresentaram ampla variação quanto à susceptibilidade aos antibióticos, sendo algumas resistentes a eritromicina, norfloxacina, vancomicina, teicoplanina e tetraciclina (Tabela 2). É preocupante a elevada resistência a eritromicina (60,38%) e norfloxacina (16,98%) (Tabela 3), uma vez que esses antibióticos são largamente utilizados no tratamento de infecções bacterianas. É importante ressaltar que entre as 53 cepas avaliadas, 40 apresentaram resistência a pelo menos um dos antibióticos testados, 14 (cepas 1; 7; 11; 13; 16; 17; 21; 28; 39; 41; 44; 45; 46 e 50) foram resistentes a dois e 2 (cepas 7 e 11) resistentes a três antibióticos (Tabela 3).

A resistência de *Enterococcus* à antibióticos de uso clínico tem sido relatada em cepas isoladas de diferentes tipos de queijos (AHMADOVA *et al.*, 2013;

**Tabela 2** - Susceptibilidade antimicrobiana (%) de 53 cepas de *Enterococcus* isoladas de queijos de Coalho artesanais

Antibiótico	Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Grau de sensibilidade*		
		Sensível (%)	Intermediária (%)	Resistente (%)
Ampicilina	10	100,0	0,0	0,0
Cloranfenicol	30	86,79	13,21	0,0
Eritromicina	15	11,32	28,30	60,38
Estreptomicina	300	100,0	0,0	0,0
Gentamicina	120	100,0	0,0	0,0
Norfloxacin	10	35,85	47,17	16,98
Teicoplanina	30	86,79	3,77	9,44
Tetraciclina	30	92,46	0,0	7,54
Vancomicina	30	84,90	3,77	11,33

\* O grau de sensibilidade das cepas foi determinado com base nas Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana: 15° Suplemento Informativo, Normas Interpretativas do Teste de CIM ( $\mu\text{g/mL}^{-1}$ ) para *Enterococcus* spp. (CLSI, 2005)

**Tabela 3** - Resistência antimicrobiana de 40 cepas de *Enterococcus* isoladas de queijos de Coalho artesanais

Antibióticos	Código das cepas	Nº de cepas resistentes
Eritromicina	1; 3; 4; 5; 7; 8; 9; 11; 13; 15; 16; 17; 21; 22; 23; 24; 25; 27; 28; 29; 30; 32; 33; 34; 35; 36; 37; 38; 47; 50; 51 e 52	32
Norfloxacin	1; 7; 11; 13; 14; 19; 21; 28 e 50	9
Teicoplanina	39; 41; 44; 45 e 46	5
Tetraciclina	7; 11; 16 e 17	4
Vancomicina	10; 39; 41; 44; 45 e 46	6

JAMET *et al.*, 2012; MALEK *et al.*, 2012; MORANDI; SILVETTI; BRASCA, 2013; YOGURTCU; TUNCER, 2013). Yogurtcu e Tuncer (2013) avaliaram 47 cepas de *Enterococcus* isoladas de queijo Turkish Tulum quanto à sensibilidade a antibióticos e observaram que todas as cepas apresentaram sensibilidade a ampicilina, cloranfenicol, penicilina, vancomicina e gentamicina, 8,5% delas foram resistentes a estreptomicina. No Brasil, Riboldi *et al.* (2009) avaliaram o perfil de resistência antimicrobiana de *E. faecalis*, *E. faecium* e *Enterococcus* spp. isolados de vários alimentos, incluindo queijos, e observaram fenótipos de resistência a tetraciclina, eritromicina, gentamicina, estreptomicina, ampicilina, cloranfenicol e vancomicina.

De acordo com Foulquié-Moreno *et al.* (2006), os antibióticos mais relevantes no tratamento de infecções causadas por *Enterococcus* resistentes a múltiplos antibióticos são ampicilina, vancomicina e gentamicina. No presente estudo, todas as cepas avaliadas apresentaram sensibilidade a ampicilina e gentamicina, e seis cepas

foram resistentes à vancomicina (Tabela 3). Cepas de *Enterococcus* que abrigam fenótipos de resistência a antibióticos glicopeptídeos como teicoplanina e vancomicina são considerados patógenos emergentes (JOHANSSON; RASMUSSEN, 2013). Esses dados são um alerta para as indústrias de laticínios e as autoridades de saúde pública, uma vez que os antibióticos representam a última opção terapêutica no tratamento de infecções nosocomiais (infecções hospitalares) causadas por *Enterococcus*.

### Produção de hemolisinas

A produção de hemolisinas foi constatada em 100% (53/53) das cepas de *Enterococcus* e o tipo de hemólise formado variou em função da origem do sangue utilizado no preparo do meio de cultura (Tabela 4). Em ágar sangue de carneiro a produção de  $\alpha$ -hemolisina foi constatada em 13 cepas do total de 53 avaliadas (24,53%), enquanto que no ágar sangue de cavalo esse tipo de hemólise foi observado em apenas 5,66% (3/53) das culturas; a  $\beta$ -

**Tabela 4** - Avaliação da atividade de hemolisinas em *Enterococcus* isolados de queijos de Coalho artesanais

Tipos de hemólise	Frequência (%)	
	Sangue de carneiro	Sangue de cavalo
$\alpha$ – hemólise	24,53 (13/53)	5,66 (3/53)
$\beta$ – hemólise	16,98 (9/53)	18,87 (10/53)
$\gamma$ – hemólise	58,49 (31/53)	75,47 (40/53)

hemólise variou de 16,98% (sangue de carneiro) a 18,87% (sangue de cavalo) e a  $\gamma$ -hemólise de 58,49% (sangue de carneiro) a 75,54% (sangue de cavalo) (Tabela 4).

Moraes *et al.* (2012) avaliaram a produção de hemolisinas em ágar sangue de cavalo de 43 isolados de *Enterococcus* provenientes de leite e queijo não pasteurizado, no estado de Minas Gerais, e observaram  $\beta$ -hemólise em 53,5% dos isolados, embora nenhum deles tenha apresentado  $\alpha$ -hemólise. Marguet, Vallejo e Olivera (2008) utilizaram sangue humano para avaliar a produção de hemolisinas de 10 cepas de *Enterococcus* provenientes de queijos produzidos com leite de ovino obtidos de uma queijaria da Patagônia, entretanto, não observaram atividade hemolítica nos isolados estudados.

#### Produção de DNase, termonuclease e gelatinase

Todas as cepas de *Enterococcus* foram submetidas aos testes para avaliação da produção de DNase, termonuclease e gelatinase, mas foi constatada apenas a atividade de DNase em 3,8% (2/53) das cepas, não sendo detectada a presença das demais enzimas. Moraes *et al.* (2012) também avaliaram a produção de gelatinase e DNase em 43 cepas de *Enterococcus* e observaram apenas a produção de gelatinase em 45% delas. Gomes *et al.* (2008) investigaram a produção de gelatinase por *Enterococcus* isolados de leite cru, leite pasteurizado, queijos, produtos cárneos e vegetais produzidos no Brasil e constataram que 18,2% das cepas avaliadas produziram gelatinase. De acordo com Lopes *et al.* (2006), que avaliaram a correlação da produção de gelatinase com a manutenção e conservação de cepas de *Enterococcus* congeladas, o congelamento parece afetar a capacidade de produção de gelatinase por essas cepas, levando a resultados negativos. Apesar de não terem sido observadas as atividades de DNase, termonuclease e gelatinase na maioria das cepas deste estudo, esse resultado não significa que elas não apresentam o gene codificador dessas enzimas, mas que nas condições dos ensaios, elas não foram detectadas, visto que a expressão de genes é influenciada por fatores ambientais.

#### Deteção de genes de virulência

Foram selecionadas 10 cepas resistentes à vancomicina e teicoplanina para identificação das espécies. Apenas três bactérias foram identificadas como *E. faecium* (cepas 12, 40, 41) e as demais não puderam ser identificadas em nível de espécies com os pares de primers empregados, sendo identificadas apenas como *Enterococcus* spp.

Martín, Garriga e Aymerich (2008) compararam três métodos de identificação de espécies de *Enterococcus* e observaram que o DNA de algumas espécies não foi amplificado quando se empregou a técnica de PCR Multiplex com os primers descritos por Dutka-Malen, Evers e Courvalin (1995), impossibilitando a identificação. Mac *et al.* (2003) empregaram a técnica de PCR com primers específicos para identificação de *E. faecium* e encontraram pontos fracos em relação a especificidade e sensibilidade dos primers *ddl*<sub>*E. faecium*</sub>. Os microrganismos não identificados nesse trabalho serão posteriormente identificados com o emprego de outra técnica molecular, como por exemplo, o sequenciamento.

Após a identificação das espécies, foi investigada a presença de genes codificadores de virulência nas 10 cepas selecionadas (Tabela 5).

O perfil de determinantes genéticos de virulência das cepas resistentes a antibióticos glicopeptídeos foi variável e a presença de pelo menos um dos genes pesquisados foi detectada em 90% das cepas (Tabela 5). O gene *efaA* codificador de adesinas de parede celular apresentou maior prevalência, sendo detectado em 70% das cepas, seguido do gene *ace* codificador de adesinas de colágeno (50%), gene *esp* codificador de proteínas de superfície (40%) e gene *gelE* codificador de gelatinase (40%). A resistência à vancomicina está relacionada a sete fenótipos de resistência (VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanF, VanG e VanH), todos relacionados a operons localizados em plasmídeos ou no cromossoma. O gene *vanA* avaliado neste estudo está relacionado à resistência dos *Enterococcus* a altas concentrações de teicoplanina ou vancomicina (64 -100 mg L<sup>-1</sup>), ou seja, concentrações

**Tabela 5** - Perfil de genes de virulência em *Enterococcus* resistentes a antibióticos do grupo dos glicopeptídeos

Genes de virulência	Marcador de virulência	---- <i>E. faecium</i> ----			----- <i>Enterococcus</i> spp.-----						Cepas (%)	
		162	190	191	157	160	161	189	194	195		196
<i>ace</i>	Adesinas de colágeno	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	50
<i>as</i>	Substâncias de agregação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>cylA</i>	Citolisinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>cylB</i>	Citolisinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>cylM</i>	Citolisinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
<i>efaA</i>	Adesinas de parede celular	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	70
<i>esp</i>	Proteínas de superfície	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	40
<i>gelE</i>	Gelatinase	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	40
<i>vanA</i>	Resistência à vancomicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
N° de fatores de virulência		2	1	1	1	0	3	4	3	3	2	-

superiores à contida no disco de antibiótico (30 µg/disco). Possivelmente devido a esse fato, não foram detectadas cepas que apresentassem o genótipo de resistência à vancomicina (COURVALIN, 2006).

A investigação da patogenicidade de *Enterococcus* da microbiota natural de queijos, principalmente os artesanais, é de alta relevância para a segurança microbiológica desse alimento e para a saúde pública, visto que as cepas avaliadas apresentaram vários genes codificadores de virulência.

A predominância dos genes *efaA*, *ace* e *esp* codificadores de adesinas de parede celular, adesinas de colágeno e proteínas de superfície em *Enterococcus* spp. tem sido constatada tanto em isolados de alimentos quanto de casos clínicos (FRANZ; HOLZAPFEL, 2006; MANNU *et al.*, 2003). A produção de adesinas e de proteínas de superfície contribui para a capacidade de adesão e formação de biofilmes em superfícies abióticas, o que dificulta a inibição e/ou eliminação de cepas potencialmente virulentas das superfícies.

## CONCLUSÃO

*Enterococcus* isolados da microbiota de queijo de Coalho apresentam determinantes fenotípicos de virulência como atividade hemolítica e resistência a antibióticos de uso clínico como eritromicina, norfloxacin, teicoplanina, tetraciclina e vancomicina. O perfil de determinantes genéticos de virulência foi bastante variável e foi constatado que 90% das cepas investigadas abrigavam pelo menos um dos nove genes pesquisados. O gene *efaA* apresentou maior prevalência, seguido dos genes *ace*, *esp* e *gelE*.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto 476649/2008-0.

## REFERÊNCIAS

- AHMADOVA, A. *et al.* Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. **Food Control**, v. 30, n. 2, p. 631-641, 2013.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Normas de desempenho para testes de sensibilidade antimicrobiana**: 15º suplemento informativo. Pennsylvania, 2005. (Document, M100-S15). Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/clsi/clsi\\_OPASM100S15.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/clsi/clsi_OPASM100S15.pdf)>. Acesso em: 03 jul. 2014.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão**: norma aprovada – oitava edição. Pennsylvania, 2003. (CLSI Document, M2-A8). Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/clsi/clsi\\_OPASM2-A8.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf)>. Acesso em: 19 ago. 2014.
- COURVALIN, P. Vancomycin resistance in Gram-positive cocci. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. 1, p. 25-34, 2006.
- CRUZ, T. E. E.; TORRES, J. M. O. **Gelatin hydrolysis test protocol**. Washington: Microbial Library American Society for Microbiology, 2012. Disponível em: <<http://www.microbelibrary.org/library/laboratory-test/3776-gelatin-hydrolysis-test-protocol>>. Acesso em: 19 ago. 2014.
- DOGAN, B. *et al.* Distribution of serotypes and antimicrobial resistance genes among *Streptococcus agalactiae* isolates

- from bovine and human hosts. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 12, p. 5899-5906, 2005.
- DOLCI, P. *et al.* Microbiological characterization of artisanal Raschera PDO cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **Food Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 392-399, 2008.
- DUTKA-MALEN, S; EVERS, S; COURVALIN, P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identifications the species level of clinically relevant enterococci by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 24-27, 1995.
- EATON, T. J.; GASSON, M. J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential genetic exchange between food and medical isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 1628-1635, 2001.
- FOULQUIÉ-MORENO, M. R. *et al.* The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, n. 1, p. 1-24, 2006.
- FRANZ, C. M. A. P.; HOLZAPFEL, W. H. Enterococci. In: MOTARJEMI, Y.; ADAMS, M. **Emerging foodborne pathogens**. New York: CRC Press, 2006. cap. 20, p. 557 - 613.
- GOMES, B. C. *et al.* Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. **Food Microbiology**, v. 25, n. 5, p. 668-675, 2008.
- HASAN, A. A. *et al.* Molecular and biochemical identification of coagulase positive *Staphylococcus* species isolated from human and animal sources in Jordan. **International Journal of Medicine and Medical Sciences**, v. 47, n. 1, p. 1491-1507, 2014.
- JAMET, E. *et al.* Prevalence and characterization of antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* in French cheeses. **Food Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 191-198, 2012.
- JOHANSSON, D; RASMUSSEN, M. Virulence factors in isolates of *Enterococcus faecalis* from infective endocarditis and from the normal flora. **Microbial Pathogenesis**, v. 55, p. 28-31, 2013.
- LIST OF PROKARYOTIC NAMES WITH STANDING IN NOMENCLATURE. 1998. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/~allnames.html>>. Acesso em: 20 jan. 2015.
- LOPES, M. F. S. *et al.* Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci. **International Journal of Food Microbiology**, v. 112, n. 3, p. 208-214, 2006.
- MAC, K. *et al.* Species identification and detection of vancomycin resistance genes in enterococci of animal origin by multiplex PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, n. 2-3, p. 305-309, 2003.
- MALEK, R. *et al.* Technological and safety properties display biodiversity among enterococci isolated from two Egyptian cheeses, “Ras” and “Domiat”. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, n. 3, p. 314-322, 2012.
- MANNU, L. *et al.* 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, n. 2-3, p. 291-304, 2003.
- MARGUET, E. R.; VALLEJO, M.; OLIVERA, N. L. Factores de virulencia de cepas de *Enterococcus* aisladas de quesos ovinos. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, v. 42, n.4, p. 543-548, 2008.
- MARQUES; E. B.; SUZART, S. Occurrence of virulence-associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina, Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, n. 11, p. 1069-1073, 2004.
- MARTÍN, B.; GARRIGA, M.; AYMERICH, M. Identification of *Enterococcus* species by melting curve analysis of restriction fragments. **Journal of Microbiological Methods**, v. 75 n. 1, p. 145-147, 2008.
- MORAES, P. M. *et al.* Bacteriocinogenic and virulence potential of *Enterococcus* isolates obtained from raw milk and cheese. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 2, p. 318-328, 2012.
- MORANDI, S.; SILVETTI, T.; BRASCA, M. Biotechnological and safety characterization of *Enterococcus lactis*, a recently described species of dairy origin. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 103, n.1, p. 239-249, 2013.
- MOURA, R. A consolidação do queijo de coalho. **Agroindústria Tropical**, n. 140, p. 5-12, 2012.
- RIBOLDI, G. P. *et al.* Antimicrobial resistance profile of *Enterococcus* spp. isolated from food in southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 125-128, 2009.
- SÁNCHEZ-PORRO, C. *et al.* Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. **Journal Applied Microbiology**, v. 94, n. 2, p. 295-300, 2003.
- SANTOS, K. M. O. *et al.* Brazilian artisanal cheeses as a source of beneficial *Enterococcus faecium* strains: characterization of the bacteriocinogenic potential. **Annals of Microbiology**, v. 64, n. 4, p. 1463-1471, 2014.
- YOGURTCU, N. N.; TUNCER, Y. Antibiotic susceptibility patterns of *Enterococcus* strains isolated from Turkish Tulum cheese. **International Journal of Dairy Technology**, v. 66, n. 2, p. 236-242, 2013.