

V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA 05 a 07 de agosto de 2015, Londrina – PR

***Enterococcus* spp. Isolados de Alimentos Vegetais: Análise da Resistência a Antimicrobianos**

**Raísa Moreira Dardaques Mucinhato¹, Sílvia Helena Tormen¹, Márcia Regina Terra¹,
Márcia Cristina Furlaneto², e Luciana Furlaneto-Maia¹**

¹Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR – CÂMPUS LONDRINA

² Universidade Estadual de Londrina (UEL) – Paraná, Brasil

Avenida dos Pioneiros, 3131 CEP 86036-370 - Londrina - PR – Brasil – Telefone Geral +55 (43) 3315-6100

E-mail: (raisadardaques@gmail.com)

RESUMO

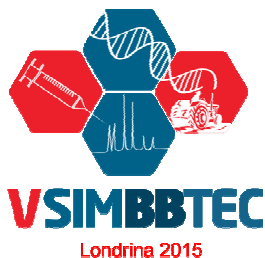
Enterococcus spp. podem ser encontrados em alimentos como contaminantes, causando intoxicação por meio da cadeia alimentar e tem emergido como uma das bactérias Gram-positivas de maior prevalência em infecções nosocomiais principalmente devido a multiresistência a antimicrobianos. O presente estudo teve como objetivo analisar a incidência de resistência a antimicrobianos entre isolados de *Enterococcus* spp. isolados de vegetais. Para tanto, foi realizado o perfil fenotípico por meio das técnicas de coloração de Gram, teste de catalase e suscetibilidade a antimicrobianos e perfil genotípico por meio da técnica de PCR com a identificação dos isolados a nível de gênero e espécie e detecção de genes de resistência a antimicrobianos e de virulência. Como resultados obtivemos que todos os 39 isolados analisados pertenciam ao gênero *Enterococcus*. O maior número de isolados resistentes foi observado frente a teicoplanina e vancomicina e o maior nível de sensibilidade frente a norfloxacina. Conclui-se que em amostras de alimentos vegetais tem-se o isolamento de *Enterococcus* spp. em uma variedade de vegetais e que estes isolados apresentam um índice de resistência.

Palavras-chave: *Enterococcus*, resistência, antimicrobianos, vegetais e alimentos.

INTRODUÇÃO

O gênero *Enterococcus* é descrito como um grupo ubíquo que pode viver como comensal do trato gastrointestinal de mamíferos, sendo os cocos Gram-positivos mais abundantes em humanos (TANNOCK and COOK, 2002). Também podem ser isolados em alimentos de origem animal, vegetais e plantas devido a sua capacidade de sobreviver em condições adversas (GIARD et al., 2001; GIRAFFA, 2002, revisado por FOULQUIÉ MORENO et al., 2006).

Enterococcus têm importante implicação na indústria de alimentos podendo ser utilizado como probiótico ou cultura iniciadora (revisado por GELSOMINO et al., 2001). No entanto, apesar dos benefícios trazidos pelo seu esta bactéria pode ser encontrado como um contaminante, sendo considerado um indicador de condições sanitárias insuficientes (GIRAFFA, 2002) estando envolvido na deterioração de alimentos (FRANZ et al., 2001), em intoxicação alimentar



V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA 05 a 07 de agosto de 2015, Londrina – PR

(GARDINI et al., 2001) e dissipação de genes de resistência a antimicrobianos por meio da cadeia alimentar (MURRAY, 1990; GIRAFFA, 2002).

Nas últimas décadas *Enterococcus* spp. tem emergido como patógeno de infecções nosocomiais (KAYSER, 2003), estando envolvido em infecções urinárias, bem como em endocardite e infecções hematôgenas sendo a 8ª causa deste tipo de infecção no Brasil (MARRA et al., 2011). *Enterococcus faecalis* é a espécie mais frequentemente isolada (80-90%) seguido de *E. faecium* (10%). Em vista da problemática exposta o presente estudo teve como objetivo isolar *Enterococcus* spp. de alimentos vegetais, obter a frequência das espécies de *Enterococcus* spp., avaliar o perfil fenotípico e genotípico dos isolados frente a antimicrobianos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram adquiridos vegetais de mercados e feiras livre do município de Londrina, Paraná. Os vegetais foram estocados em suas embalagens originais sob refrigeração antes das análises.

Para o isolamento 25 gramas do vegetal foi adicionado em 225 mL de salina estéril e homogeneizado por 15 minutos a 120 rpm seguido de sedimentação por 5 minutos. Posteriormente, 100 µL da mistura foi semeada pela técnica de *spread plate* em placas contendo Kanamycin esculin azide ágar (KEA) e M17. Após 24 horas de incubação a 37°C, 3 colônias características de cada placa foram isoladas e cultivadas em meio Brain Heart Infusion caldo (BHI caldo). Os isolados foram estocados em BHI caldo acrescido de 20% de glicerol e armazenadas em freezer a -80°C.

A identificação fenotípica dos isolados foi realizada empregando-se os seguintes testes: coloração de Gram, observação da morfologia e arranjo celular e o teste de catalase. Para a identificação genotípica os isolados tiveram seu DNA total extraído conforme descrito por Marques e Suzart (2004). O produto da extração foi submetido à técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para serem identificados a nível de gênero utilizando o oligonucleotídeo TUF e para as espécies *E. faecalis* e *E. faecium*, empregando como os oligonucleotídeos iniciadores $ddl_{E.faecalis}$ e $ddl_{E.faecium}$, respectivamente (FURLANETO-MAIA et al., 2011).

A análise da suscetibilidade dos isolados foi realizado frente a: ciprofloxacina 5µg (CIP), teicoplanina 30µg (TEC), tetraciclina 30µg (TET), ampicilina 10µg (AMP), vancomicina 30µg (VAN), gentamicina 10µg (GEN), eritromicina 15µg (ERI) e norfloxacina 10 µg (NOR); a técnica aplicada foi de disco-difusão em ágar (CLSI, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 20 vegetais testados foram obtidos 120 isolados, desses 39 foram identificados como pertencentes ao gênero *Enterococcus* no teste fenotípico. Os isolados Gram-positivos, em forma de cocos observados isoladamente, aos pares ou em curtas cadeias e catalase negativo foram identificados como pertencentes ao gênero *Enterococcus*.

Todos os isolados foram confirmados como pertencentes ao gênero *Enterococcus* quando submetidos a PCR, onde as espécies mais frequentemente isoladas foram: *E. faecalis* seguido de *E. faecium*.

A Figura 1 apresenta percentual de resistência dos isolados de *Enterococcus* sp frente aos antimicrobianos de uso clínico. Observou-se elevado número de isolados resistentes aos

antimicrobianos TEC e VAN, onde ambos apresentaram o valor 48,31% de resistência, demonstrando multirresistência.

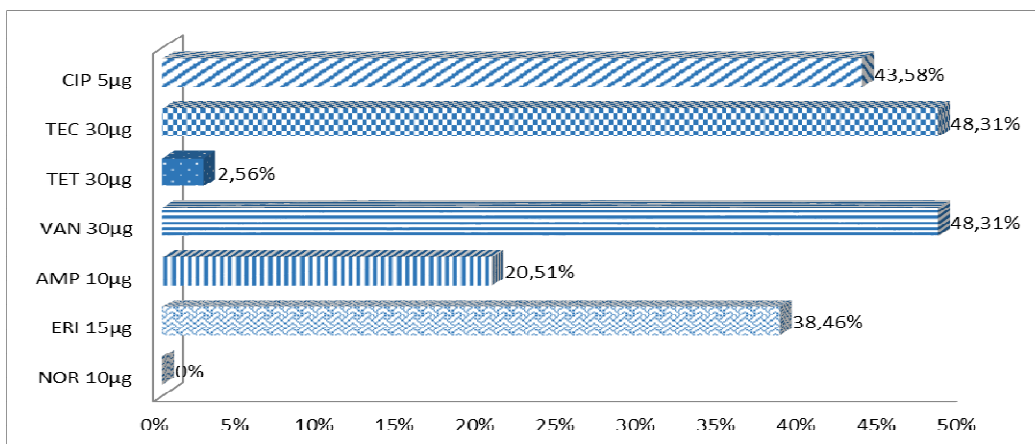


Figura 1 - Porcentagem de *Enterococcus spp.* resistente a antimicrobianos.

Considerando os *Enterococcus* bactérias presentes naturalmente no trato gastrointestinal dos seres humanos, estas, entretanto, são denominadas como patógenas oportunistas, dado seu fator de virulência, capaz de causar infecções (Murray, 1990). No final da década de 1980, esse micro-organismo passou a expressar resistência quanto à vancomicina e teicoplanina, devido a isso, pode ser intitulado como ERVs, enterococos resistentes à vancomicina (Rice et al, 2003).

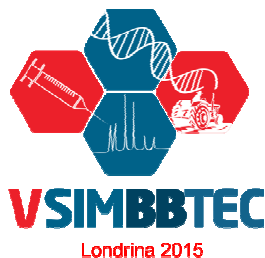
A presença da bactéria *Enterococcus* no ambiente natural ainda é desconhecido, do ponto de vista influenciado pela ecologia. Além disso, o consumo de vegetais crus ou minimamente processados tem sido de grande preocupação, haja vista que nesses produtos, a bactéria tem-se mostrado presente e provavelmente devida a essa ingestão e outros fatores, adquiriu características que o tornam resistentes a antibióticos (Abriouel et al, 2008). Sendo assim, essa resistência é proveniente via cadeia alimentar.

Para o tratamento de infecções causadas pela bactéria enterocócica, os antibióticos mais comumente utilizados são a ampicilina, gentamicina e altos níveis de vancomicina, devido a esse fato, a resistência adquirida apresenta sérios problemas do ponto de vista clínico (Rice et al, 2003). A teicoplanina é um antibiótico o qual apresenta grande resistência quando usados também no tratamento de intoxicações alimentares pela ingestão de alto níveis de *Enterococcus* (revisado por KAYSER, 2003).

CONCLUSÕES

Ao considerar o aumento da preocupação com uma alimentação mais saudável, o consumo de verduras propriamente dito, é uma crescente, entretanto quando a mesma não está em condições microbiológicas adequada, gera uma intoxicação alimentar e o com tratamento contínuo, de forma errônea, a bactéria começa a demonstrar características resistentes.

Dessa forma, os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que a bactéria *Enterococcus spp.* estão presentes em todos os alimentos analisados e apresentaram



V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA 05 a 07 de agosto de 2015, Londrina – PR

características de resistência a antibióticos, podendo acarretar assim em problemas de fatores clínicos.

Agências de Fomento: CNPq, Fundação Araucária e FUNTEF

REFERÊNCIAS

- CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**; Twenty-First Informational Supplement Approved standard M100-S21, v. 31, 2011.
- FOULQUIÉ MORENO MR, 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.
- FRANZ CMAP et al. **Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food**. Applied and Environmental Microbiology, p. 4385–4389, 2001.
- FURLANETO-Maia L, Rocha KR, Henrique FC, Giazzi A, Furlaneto MC. **Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. isolated from soft cheese in southern Brazil**. Adv. Microbiol. n.4, p. 175-181, 2014.
- GARDINI, F. et al. **Effects of pH, temperature and NaCl concentration on growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis***. International Journal of Food Microbiology v.64, p.105–117, 2001.
- GELSOMINO, R., VANCANNEYT, M., CONDON, S et al., 2001. **Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar-type cheesemaking factory**. International Journal of Food Microbiology 71, 177-188.
- GIARD, J.C., LAPLACE, J.M., RINCE, A., PICHEREAU, V., BENACHOUR, A., LEOEUF, C., FLAHAUT, S., AUFRAY, Y., HARTKE, A. **The stress proteome of *Enterococcus faecalis***. Electrophoresis v.22, p. 2947–2954, 2001.
- GIRAFFA G. **Enterococci from foods**. FEMS Microbiology Reviews, v.26, ed.2, p.163-171, 2002.
- KAYSER FH. **Safety aspects of enterococci from the medical point of view**. International Journal of Food Microbiology. n. 88, p. 255– 262, 2003.
- MARRA, A. R. et al. **Nosocomial bloodstream infections in brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study**. Journal of Clinical Microbiology, v.49, n.5, p. 1866-1871, 2011.
- MARQUES EB, 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.
- MURRAY BE. **The life and times of the Enterococcus**. Clinical Microbiology Reviews, v. 3, n. 1, p. 46-65, Jan. 1990
- TANNOCK, G.W., COOK, G., 2002. **Enterococci as members of the intestinal microflora of humans**. In: Gilmore, M.S. (Ed.), The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance. ASM Press, Washington, D.C., p. 101–132.

Universidade Estadual de Londrina - Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445, Km 380 - Campus Universitário
Caixa Postal 10.011 CEP 86057-970 Centro de Ciências Exatas - Departamento de Bioquímica e
Biotecnologia Fone +55 (43) 3371.4270 - biq@uel.br