

## **Perfil de Resistência e Virulência *Enterococcus* spp Isolado de Rede de Abastecimento de Água de Londrina – PR**

**André de Oliveira Beninca<sup>1</sup>, Kátia Real Rocha<sup>2</sup>, Márcia Regina Terra<sup>1</sup> e Luciana Furlaneto-Maia<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR – CÂMPUS LONDRINA  
Avenida dos Pioneiros, 3131 CEP 86036-370 - Londrina - PR – Brasil – Telefone Geral +55 (43) 3315-6100  
E-mail: (beninca01@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Londrina – UEL  
Rodovia Celso Garcia Cid - Pr 445 Km 380, s/n - Campus Universitário, Londrina – PR, CEP:86057-970

### **RESUMO**

*Na água os Enterococcus spp. podem ser encontrados como contaminantes, principalmente em razão do crescimento populacional em regiões hídricas. O presente estudo teve como objetivo analisar a incidência de fatores de virulência e resistência entre isolados de Enterococcus spp. do Ribeirão Cambé na cidade de Londrina-PR. 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. Todos os 22 isolados obtidos são pertencentes ao gênero Enterococcus, destes 10 foram identificados como pertencentes a espécie E. faecium enquanto que 12 foram identificados como Enterococcus spp. onde o maior número de isolados resistentes foi observado frente a Tetraciclina (TET 30µg) e o maior nível de sensibilidade foram frente a Vancomicina (VAN 30µg).*

**Palavras-chave:** *Enterococcus*, resistência, antimicrobianos, água.

### **INTRODUÇÃO**

A microbacia hidrográfica do ribeirão Cambé localiza-se predominantemente no Município de Londrina, PR, apresenta área de aproximadamente 75 km<sup>2</sup> englobando parte do núcleo urbano londrinense alimentando os lagos Igapó I, II e III. Seus recursos hídricos são utilizados para captação de água para uso doméstico e industrial, irrigação e atividades recreativas da população de baixa renda, além de sediar atividades rurais diversas (ROCHA, 1995).

Sua contaminação advém em grande parte da descarga de resíduos de atividades humanas e naturais sobre a água (MELQUIADES, APPOLONI, 2004). Desta forma é necessário avaliar as condições microbiológicas da água para que esta possa ser utilizada com segurança.

Como importante indicador de qualidade microbiológica da água destaca-se o gênero *Enterococcus* (DUFOUR, 1994). Os *Enterococcus* spp. são cocos Gram-positivos ubíquos podendo ser isolados a partir de fontes ambientais como a água, mas também podem ser indicadores de contaminação fecal (FISHER, PHILLIPS, 2009).

O gênero *Enterococcus* tem emergido como agente etiológico de infecções nosocomiais, tais como infecções do trato urinário e endocardite, o que é relacionado à multirresistência a antimicrobianos (ARIAS et al, 2012). *E. faecalis* é a espécie mais frequentemente isolada (80-

90%) seguido de *E. faecium* (10%) (GIRAFFA, 2002). Em vista da problemática, o estudo teve como objetivo isolar *Enterococcus* spp. da água coletada do Ribeirão Cambé para obter o perfil fenotípico e genotípico destes isolados e avaliar a resistência frente a antimicrobianos.

### **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram realizadas um total de 3 coletas no 2º semestre de 2014, em seis pontos do Ribeirão Cambé no município de Londrina – Paraná, totalizando 18 amostras. Em cada ponto foi coletado 1 litro de água em recipiente estéril e acondicionada em caixa isotérmica onde permaneceram até o momento do experimento.

Para o isolamento de *Enterococcus* spp. 100 mL de água foi filtrada pela técnica de membrana filtrante e transferida para placas contendo Kanamycin esculin azide ágar (KEA). Após 24 horas de incubação a 37°C, três 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 armazenados em freezer a -80°.

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). Já a identificação genotípica se deu pela à técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para serem identificados em 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  $ddl_{E.faecium}$  que são específicos para *E. faecalis* e *E. faecium*, respectivamente (FURLANETO-MAIA et al., 2011).

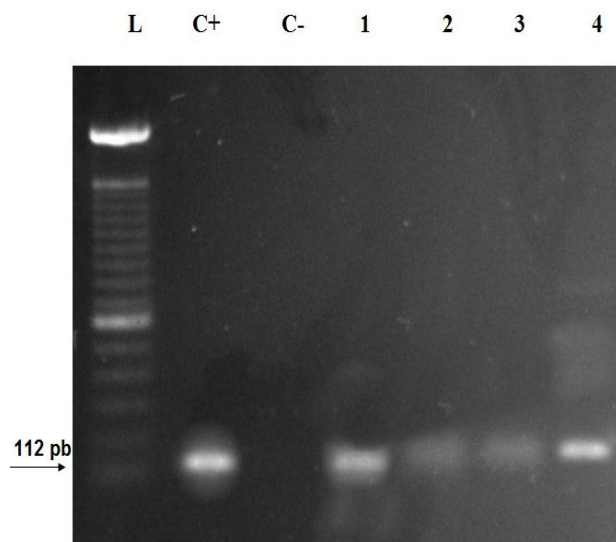
A análise da suscetibilidade dos isolados foram testados frente a 9 antimicrobianos sendo eles: Ampicilina (AMP 10µg), Cloranfenicol (CLO 30µg), Eritomicina (ERI 15µg), Gentamicina (GEN 10µg), Norfloxacin (NOR 10µg), Penicilina (PEN 10µg), Teicoplanina (TEC 30µg), Tetraciclina (TET 30µg) e Vancomicina (VAN 30µg) empregando-se a técnica de disco-difusão em ágar (CLSI, 2011).

### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

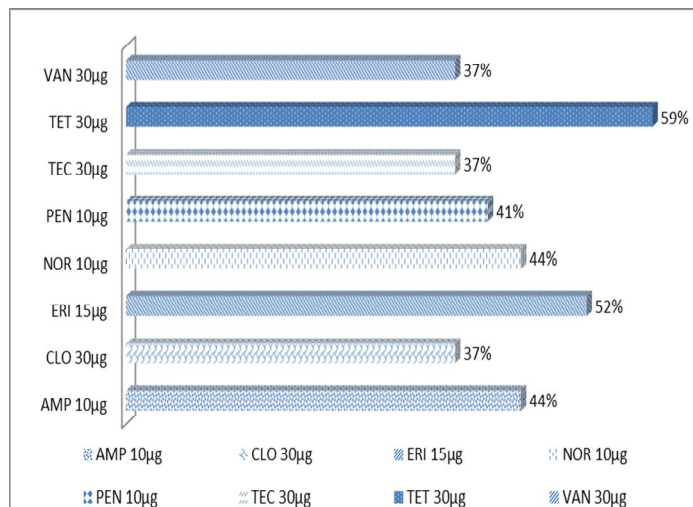
No teste fenotípico 22 isolados foram classificados como pertencente ao gênero *Enterococcus* spp pois apresentaram como característica células em forma de cocos Gram-positivos, dispostos isoladamente ou em curtas cadeias e catalase negativa e segundo Fisher e Phillipis (2009) o gênero *Enterococcus* possui tais características e a presença da bactéria *Enterococcus* no ambiente natural ainda é desconhecido, do ponto de vista influenciado pela ecologia (ABRIOUEL et al, 2008).

Quanto ao teste genotípico, todos os 22 isolados foram identificados pertencentes ao gênero *Enterococcus* (Figura 1); destes, 10 foram identificados como *E. faecium*, 1 *E. faecalis* e 11 como *Enterococcus* spp.

No teste de suscetibilidade a antimicrobianos foi observado um elevado número de isolados resistentes aos antimicrobianos Tetraciclina (TET 30µg) perfazendo 59% dos isolados e Eritomicina (ERI 15µg) perfazendo 52% dos isolados como podemos observar na Figura 2. Já 63% foram sensíveis ao antimicrobiano Vancomicina (VAN 30µg).



**Figura 1-** Gel representativo para confirmação do gênero *Enterococcus* utilizando o oligonucleotídeo TUF (112 pb).



**Figura 2-** Porcentagem de *Enterococcus spp.* isolados do Ribeirão Cambé resistentes aos antimicrobianos de uso clínico.

A tetraciclina é um antimicrobiano de amplo espectro sendo comumente utilizado na clínica médica, no entanto enterococos apresenta resistência a este antimicrobiano (HUYS et al.,2004), assim como a eritromicina (ARIAS et al.,2012). Além disso, a utilização de antimicrobianos de largo espectro contribui para o desenvolvimento de uma pressão seletiva proporcionando o aumento do surgimento de bactérias multirresistentes (RONCONI; MERINO, 2000).

### CONCLUSÕES

O achado de *Enterococcus spp.* pode inferir a contaminação fecal das águas, sendo que a presença deste pode levar a sérios riscos a saúde humana e animal, haja visto que estes isolados apresentam multirresistência a antimicrobianos.

**Agências de Fomento:** CNPq, Fundação Araucária e FUNTEF

### REFERÊNCIAS

- ABRIOUEL, Hikmate et al. **Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples.** International Journal of Food Microbiology, v. 123, p. 38-49, 2008.
- ARIAS CA, CONTRERAS GA, MURRAY BE. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v.10, p.266-278, 2012.
- CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**; Twenty-First Informational Supplement Approved standard M100-S21, v. 31, 2011.
- DUFOUR, A.P. **Bacterial indicators of recreational water quality.** Can. J. Public Health, Ottawa, v. 75, n. 1, p. 49-56, 1994.



## V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

05 a 07 de agosto de 2015, Londrina – PR

- FISHER K, PHILLIPS C. **The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus***. p 1-3, 2009.
- FURLANETO-MAIA L, ROCHA K.R, HENRIQUE F.C, GIAZZI A, FURLANETO M.C. **Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. isolated from soft cheese in southern Brazil**. Adv. Microbiol. n.4, p. 175-181, 2014.
- HUYS, G., D'HAENE, K., COLLARD, J.M *et al.*. **Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from food**. Applied and Environmental Microbiology 70, 555–562, 2004.
- 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.
- MELQUIADES, F. L, APPOLONI, C. R. **Application of XRF and field portable XRF for environmental analysis**. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, Lousanne, v. 262, n. 2, p. 533–541, 2004.
- ROCHA, G.C. **CARTA DE SOLOS DA BACIA DO RIBEIRÃO CAMBÉ NA ÁREA URBANO-RURAL DE LONDRINA, PR**. Carta de solos da bacia do ribeirão Cambé na área urbano-rural de Londrina, PR. Semina: Ci. Exatas/Tecnológicas, v. 16, n. 4, p. 536-549, dez. 1995.
- RONCONI, M.C., MERINO, L.A. **Prevalencia de *Enterococcus faecalis* y *E. faecium* con resistencia de alto nivel a aminoglucósidos en las ciudades de Resistencia y Corrientes, Republic of Argentina**. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 18, 71–73, 2000