

Isolamento, identificação, perfil de suscetibilidade antimicrobiana e genes envolvidos na resistência de *Enterococcus* spp. obtidos de amostras fecais de lobos-marinhos (*Arctocephalus* spp.) encontrados no litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil

Leonardo Almansa Cardoso¹; Ana Paula Guedes Frazzon²

¹ Estudante do Curso de Medicina Veterinária da UFRGS ; Laboratório de Microbiologia – ICBS/UFRGS, RS

² Professora Associado I do Departamento de Microbiologia – ICBS/UFRGS, RS

Introdução e Objetivo

O gênero *Enterococcus* spp. está presente na microbiota gastrointestinal dos seres humanos e outros animais, apresentando grande capacidade adaptativa aos mais diversos nichos¹. A prevalência de enterococos no ambiente tem sido bastante estudada e documentada, entretanto, a microbiota de animais marinhos não é muito noticiada. Nesse sentido, o estudo teve como objetivo isolar micro-organismos pertencentes ao gênero *Enterococcus* spp., determinar a prevalência das espécies e o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, bem como a presença de genes relacionados à resistência em amostras fecais de lobos-marinhos encontrados no litoral norte do Rio Grande do Sul.

Material e Métodos

A identificação dos *Enterococcus* spp. foi realizada a partir de dez amostras fecais de lobos-marinhos (*Arctocephalus* spp.) .



O DNA total dos isolados foi extraído por método envolvendo lise química e térmica². A confirmação do gênero foi realizada por PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores para o gene *tuf*³. A identificação das espécies foi realizada pela combinação de três técnicas: PCR Multiplex⁴, empregando oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos para *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. casseliflavus* e *E. gallinarum*, testes bioquímicos convencionais⁵ e sequenciamento da região 16S rRNA⁶. Os perfis de suscetibilidade⁷ dos isolados foram analisados através do método de disco-difusão em Ágar Müller-Hinton para os seguintes antibióticos (concentração em µg ml⁻¹): ampicilina (10), vancomicina (30), eritromicina (15), tetraciclina (30), ciprofloxacina (5), norfloxacina (10), nitrofurantoína (300), cloranfenicol (30), gentamicina (120) e estreptomicina (300). Para os isolados com perfil de resistência à tetraciclina, testou-se a presença dos genes *tet(L)* e *tet(M)*, e para os resistentes à eritromicina, o gene *erm(B)*⁸.

Resultados

Do total de 200 isolados, 160 foram classificados como sendo do gênero *Enterococcus*. A técnica do PCR Multiplex permitiu a identificação de 103 isolados. Os demais foram submetidos a provas bioquímicas convencionais e somente 8 foram identificados. Os 49 isolados restantes geraram perfis fenotípicos atípicos que foram submetidos ao sequenciamento da região 16S rRNA. Observou-se que a espécie *E. faecalis* (50,62%) foi a mais prevalente, conforme Figura 1. Noventa e três (58,12%) isolados foram sensíveis aos antimicrobianos testados, sendo a maior resistência encontrada para eritromicina (Figura 2). Ainda, dentre os 10 *E. hirae* resistentes a tetraciclina, 3 apresentaram o gene *tet(M)* e nenhum o gene *tet(L)*. Dos 34 resistentes à eritromicina, apenas 2 apresentaram o gene *erm(B)*, ambos da espécie *E. casseliflavus*.

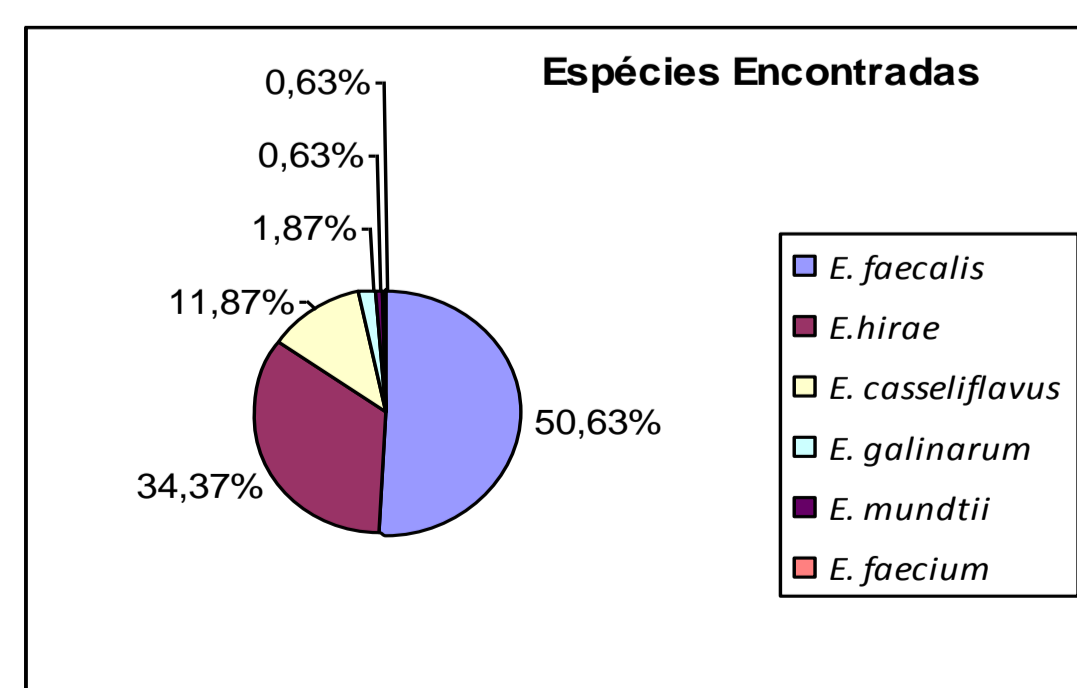


Figura 1. Percentual de espécies de enterococos da microbiota intestinal de lobos-marinhos, calculado sobre o total de isolados (n=160) de *Enterococcus* spp. obtidos de amostras fecais destes animais, encontrados no litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.

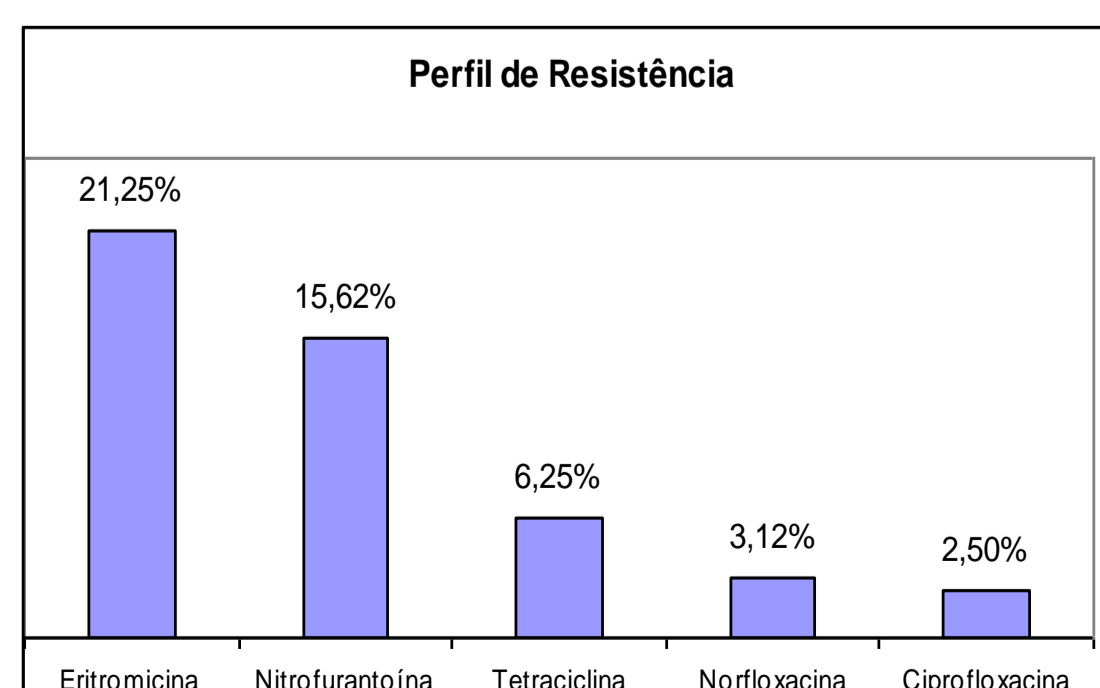


Figura 2. Percentual de resistência apresentado pelos enterococos da microbiota intestinal de lobos-marinhos frente a diferentes antimicrobianos testados.

Conclusões

Como conclusão, esta é a primeira vez que se identifica espécies de enterococos em fezes de lobo-marinho. A presença de cepas resistentes pode estar associada à contaminação do ambiente marinho por resíduos urbanos, chegando à cadeia alimentar, ou pela hipótese do resistoma ambiental. Mais estudos para determinar os mecanismos de resistência envolvidos são necessários para compreender a disseminação de micro-organismos no ambiente marinho.

Referências

- LEBRETON, F.; WILLEMS, R.J.L.; GILMORE, M.S. Enterococcus Diversity, Origins in Nature and Gut Colonization. In: GILMORE, M.S.; CLEWELL, D.B.; IKE, Y.; SHANKAR, N. [editors]. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.
- DONATO, S.T.; SIDRIM, J.J.C. (orient). Comparação de métodos convencionais e semi-automatizados para identificação de *Enterococcus* spp. frente a *Biologia Molecular em identificações discrepantes*. 86 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Fortaleza, Brasil, 2007.
- KE, D.; PICARD, F.J.; MARTINEAU, F.; MENARD, C.; ROY, P.H.; OUELLETTE, M.; BERGERON, M.G. Development of a PCR assay for rapid detection of Enterococci. *J. Clin. Microbiol.*, v.37, p.3497-3503, 1999.
- NÄCHTIGALL, G.; JESUS, A.G.; ZVOBODA, D.A.; SANTESTEVAN, N.A.; MINOTTO, E.; MOURA, T.M.; D'AZEVEDO, P.; FRAZZON, J.; VAN DER SAND, S.; FRAZZON, A.P.G. Diversidade e perfil de suscetibilidade antimicrobiana de *Enterococcus* spp. isolados das águas do Arroio Dilúvio - Porto Alegre, RS, Brasil. *Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre*, v. 11, n. 2, p. 235-241, 2013.
- TEIXEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G.; SHEWMAKER, P.L.; FACKLAM, R.R. *Enterococcus*. In: VERSALOVIC, J.; CARROLL, K.C.; FUNKE, G.; JORGENSEN, J.H.; LANDRY, M.L.; WARNOCK, D.W. *Manual of Clinical Microbiology 10th ed.*, Washington, DC: American Society for Microbiology Press, p.350-364, 2011.
- GONTANG, E.A.; FENICAL, W.; JENSEN, P.R. Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Appl Environ Microbiol., United States*, v.73, p. 3272-3282, 2007.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Third Informational Supplement. M100-S23, Wayne, PA, USA, 2013.
- FRAZZON, A.P.G.; GAMA, B.A.; HERMES, V.; BIERHALS, C.G.; PEREIRA, R.I.; GUEDES, A.G.; D'AZEVEDO, P.A.; FRAZZON, J. Prevalence of antimicrobial resistance and molecular characterization of tetracycline resistance mediated by *tet(M)* and *tet(L)* genes in *Enterococcus* spp. isolated from food in Southern Brazil. *World J Microbiol Biotechnol.*, v.26, p.365-370, 2010.