

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 II do Departamento de Microbiologia – ICBS/UFRGS, RS

Introdução e Objetivo

O gênero *Enterococcus* está presente na microbiota gastrointestinal dos seres humanos e outros animais de sangue quente, em menor ou maior número, dependendo da espécie. Fatores de virulência são moléculas que aumentam a habilidade de um micro-organismo de causar doenças. Estas bactérias toleram ambientes com condições adversas e apresentam resistência intrínseca e adquirida a diversos antimicrobianos, tornando sua pesquisa importante na área clínica e ambiental. Poucos estudos abordam a presença destas bactérias no trato gastrointestinal (TGI) de insetos. Logo, a partir de enterococos isolados de amostras de fezes da borboleta *Heliconius erato phyllis*, objetivou-se: a) avaliar fenotipicamente os fatores de virulência e a produção de substância antagonista; e b) investigar a presença de genes de virulência por PCR. Foram selecionadas 98 cepas de uma bacterioteca de 178 enterococos isolados de fezes de larvas de borboleta.

Material e Métodos

Os enterococos haviam sido identificados para espécie e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos previamente e estavam armazenados a -20 no laboratório de Microbiologia do ICBS/UFRGS. Estes isolados foram inoculados em caldo BHI para serem submetidos às análises fenotípicas e extração de DNA total pelo método físico-químico (Donato, 2007). Avaliou-se a presença dos genes dos fatores de virulência citolisina (*cylA*), gelatinase (*gelE*), adesina de colágeno (*ace*), substância de agregação (*agg*) e proteína de superfície de enterococos (*esp*) pela técnica de PCR convencional. A atividade das enzimas gelatinase e hemolina, relacionadas com os genes *gelE* e *cylA*, foi avaliada em ensaios fenotípicos. A determinação da produção de substância antagonista foi determinada frente à *Listeria monocytogenes* em ensaio de dupla camada.

Resultados

Os resultados observados para os fatores de virulência foram: 43 cepas (44%) positivas para o gene *esp*, duas (2%) para o *gelE*, duas (2%) para o *ace*, e nenhuma positiva para os fatores de virulência *cylA* e *agg*. Nos testes fenotípicos foi observada atividade hemolítica total ou parcial em todas as cepas (100%) (Figura 1), por outro lado nenhuma das cepas positivas para o *gelE* apresentaram atividade positiva para a enzima gelatinase (Figura 2). Para a análise de produção de substância antagonista foram selecionados 22 isolados que não apresentavam resistência a nenhum dos antibióticos recomendados para enterococos. Destes 15 (68%) apresentaram atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes*.

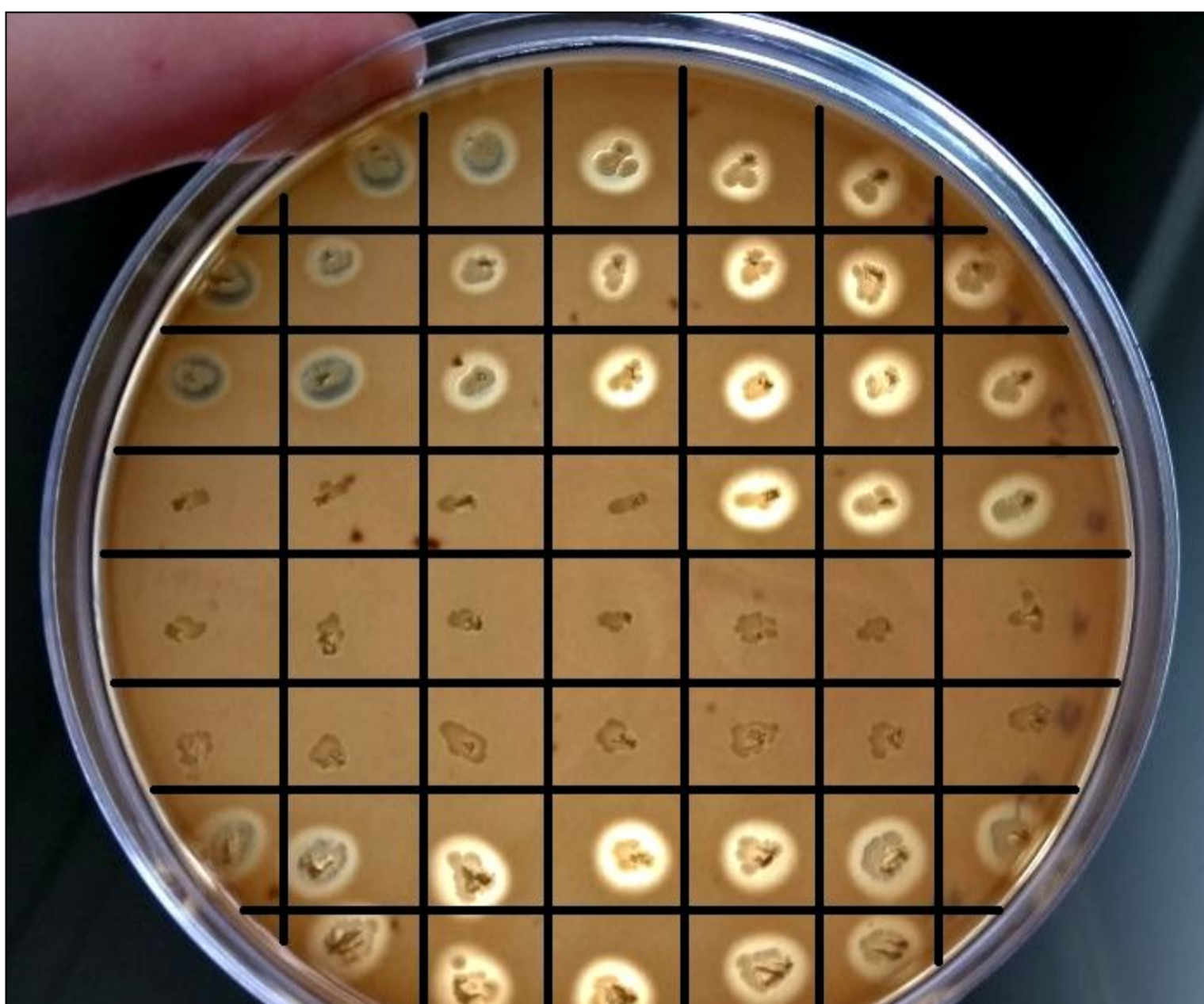


Figura 1. Teste fenotípico para atividade hemolítica. Setas vermelha e amarela indicam cepa positiva e negativa para atividade hemolítica, respectivamente.

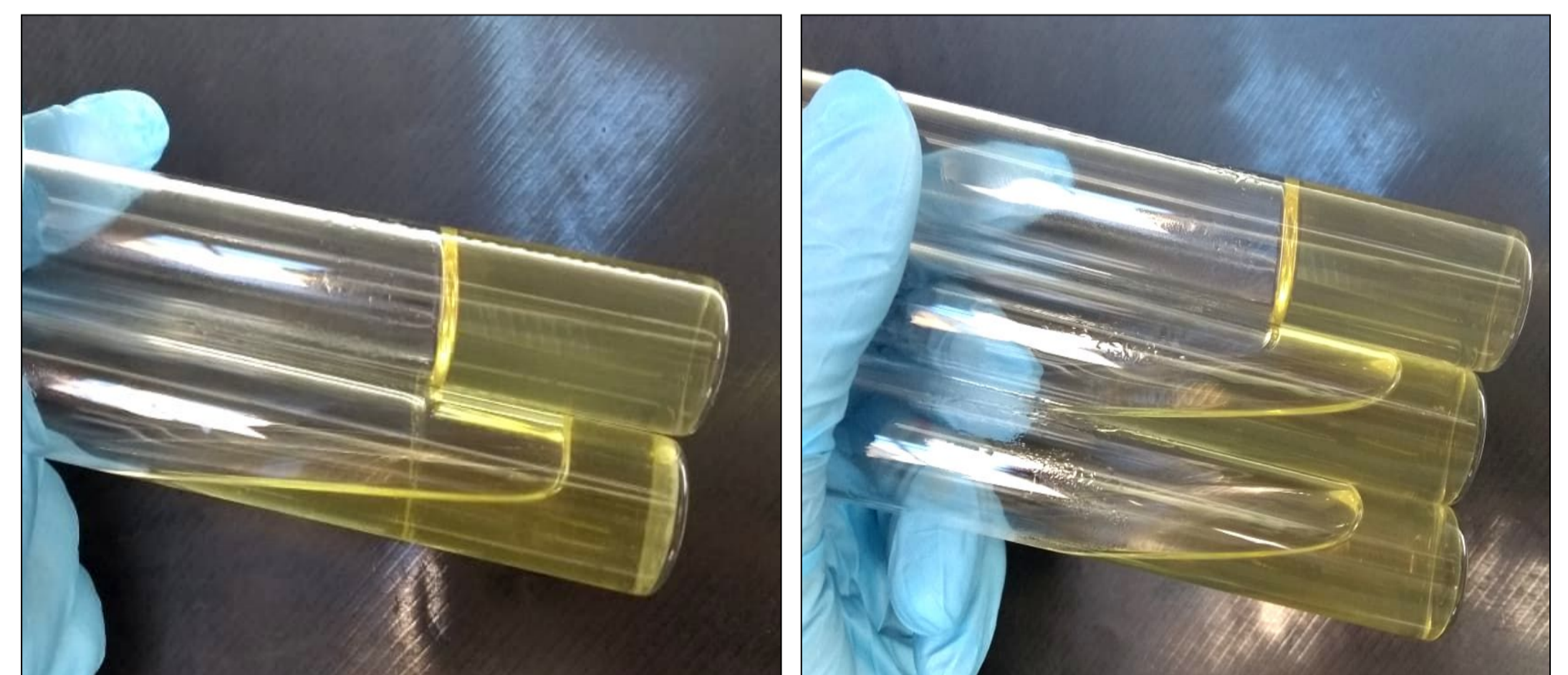


Figura 2. Teste fenotípico da enzima gelatinase. A) *E. casseliflavus* 6.12 utilizado como controle negativo (meio sólido) e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como controle positivo (meio líquido). B) Controle negativo e isolados *E. faecalis* 6.18 e 6.19 com resultado positivo (meio líquido).

Conclusões

Em conclusão, a presença de cepas de enterococos isoladas de fezes de larvas de borboletas carregando o gene associado com adesão à célula do hospedeiro (*esp*) e produzindo compostos como atividade antimicrobiana que contribuem para o equilíbrio da microbiota, demonstra uma importante interação entre o hospedeiro e sua microbiota.

Referências

- ¹ 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.
- ² DONATO, S.T.; SIDRIM, 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.
- ³ 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.
- ⁴ NACHTIGALL, G.; JESUS, A.G.; ZVOBODA, D.A.; SANTESTEVEAN, N.A.; MINOTTO, E.; MOURA, T.M.; D'AZEVEDO, P.; FRAZZON, J.; VAN DER SAND, S.; FRAZZON, A.P.G. Diversidade e perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *Enterococcus* sp. isolados das águas do Arroio Dilúvio - Porto Alegre, RS, Brasil. *Revista Brasileira de Biotecnologia*, Porto Alegre, v. 11, n. 2, p. 235-241, 2013.
- ⁵ 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.
- ⁶ 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.
- ⁷ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Third Informational Supplement. M100-S23, Wayne, PA, USA, 2013.
- ⁸ 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.