

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 de outros animais, em menor ou maior número, dependendo da espécie. Biofilmes podem ser definidos como grupos de células microbianas aderidas a superfícies bióticas ou abióticas envoltas por uma matriz de substâncias extracelulares produzidas pela própria comunidade. Estudos que avaliam a capacidade de formação de biofilme por enterococos isolados de animais marinhos ainda são escassos. A técnica da eletroforese em campo pulsado “Pulsed-Field Gel Electrophoresis” - PFGE é um método de tipagem molecular que visa discriminar linhagens bacterianas de uma mesma espécie, comparando características genotípicas. Nesse sentido, o presente estudo avaliou a capacidade de formação de biofilme, bem como, a diversidade genética dos enterococos isolados de fezes de tartarugas marinhas.

Material e Métodos

Foram selecionados 158 enterococos isolados de tartarugas marinhas, identificados previamente em espécies. Esses isolados foram submetidos a avaliação da capacidade de formação de biofilme *in vitro*, segundo metodologia de Stepanovic et al. (2000). Para a análise do perfil genotípico das amostras por PFGE foram selecionados 60 isolados de um total de 158, que possivelmente representariam os perfis clonais existentes. A seleção das amostras levou em consideração características fenotípicas de perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos e genotípicas como a presença ou ausência de fatores de virulência e resistência. A técnica de PFGE foi realizada de acordo com protocolos adaptados de Pinto et al. (2013).

Resultados

Os enterococos avaliados se mostraram, na sua maioria, não formadores (64/158), moderados (55/158) e fracos (37/158) formadores de biofilme (figura 1). Somente dois isolados da espécie *E. faecalis* foram classificados como forte formador de biofilme. Cerca de 50% (44/88) dos *E. faecalis* foram moderados e 34,1% (30/88), fraco formadores de biofilme. *Enterococcus hirae* foi a espécie que não apresentou capacidade de formação de biofilme. Entre os *E. faecium* e *E. casseliflavus*, 56,7% (21/37) e 77,8% (7/9), respectivamente, foram classificados como não formadores biofilme nas microplacas.

Em relação a diversidade genética, dos 60 isolados previamente selecionados, somente 54 foram avaliados. A análise por PFGE dos isolados revelou diferentes perfis de fragmentação do DNA cromossômico distribuídos em 10 perfis clonais (PC) distintos e 4 *singletons*, formado por 4 perfis não relacionados aos demais. O ponto de corte para considerar as bactérias como pertencentes ao mesmo perfil clonal foram de 80% de similaridade. Cada um dos 10 perfis clonais foi constituído por enterococos de uma mesma espécie. Todos os perfis clonais formados tiveram mais de 90% de similaridade, sendo que 4 perfis clonais, PC 4, PC 6, PC 7 e PC 10 apresentaram 100% de similaridade (figura 2).

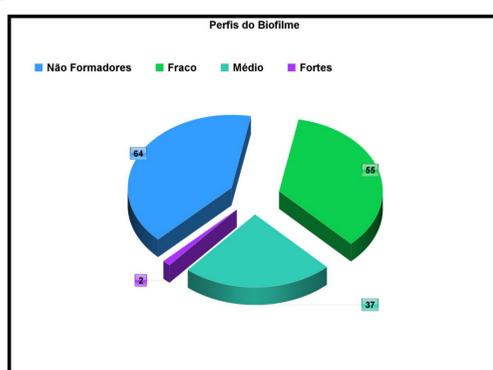


FIGURA 1: Gráfico mostrando os perfis de biofilme apresentado pelos isolados avaliados

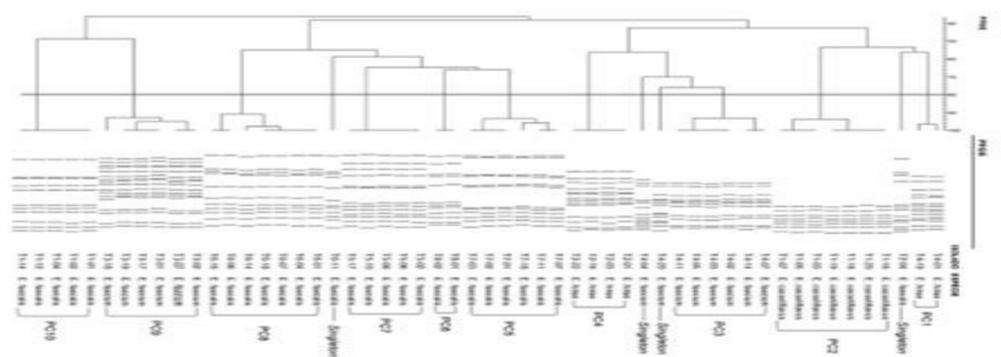


Figura 2. Dendrograma representativo dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico obtidos por eletroforese em campo pulsado (PFGE) após digestão pela enzima *SmaI*, demonstrando os 10 perfis clonais (PC).

Conclusões

Quanto à capacidade de formação de biofilme, houve diferenças na formação de acordo com as espécies de enterococos avaliadas, no entanto a maioria dos isolados se mostrou não formador de biofilme. Com relação a análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico dos enterococos realizada por meio da eletroforese em gel de agarose submetido a um campo pulsado (PFGE) demonstrou uma alta clonalidade entre os isolados de uma mesma amostra.

Referências

- LEBRETON, F.; WILLEMS, RIL; GILMORE, MS. Enterococcus Diversity, Origins in Nature and Gut Colonization. In GILMORE MS; CLEWELL DB; IKE Y; SHANKAR, N [editors]. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.
- DONATO, ST; SIDRIM, JIC (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, FJ; MARTINEAU, F; MENARD, C; ROY, PH; OUELLETTE, M; BERGERON, MG. Development of a PCR assay for rapid detection of Enterococci. *J. Clin. Microbiol*, v.37, p.3497-3503, 1999.
- NACHTIGALL, G; JESUS, AG; ZVODODA, DA; SANTESTEVAN, NA; MINOTTO, E; MOURA, TM; D'AZEVEDO, P; FRAZZON, J; VAN DER SAND, S; FRAZZON, APG. Diversidade e perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *Enterococcus* sp. 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 LM; CARVALHO, MG; SHEWMAKER, PL; FACKLAM, RR. *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, EA; FENICAL, W; JENSEN, PR. 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, APG; GAMA, BA; HERMES, V; BIERHALS, CG; PEREIRA, RI; GUEDES, AG; D'AZEVEDO, PA ; 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.