

Comparação genotípica dos fatores de virulência de *Enterococcus* sp. isolados de amostras clínicas e alimentares

Paula Dalcin Martins¹, Rebeca Inhoque¹, Aline Weber Medeiros², Pedro Alves d'Azevedo³, Jeverson Frazzon⁴, Sueli T. Van der Sand³, Ana Paula Guedes Frazzon³

¹Estudante de graduação da UFRGS, ²Aluno (a) do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente (UFRGS), ³Docente do Departamento de Ciências Básicas da Saúde (UFCSPA), ⁴Docente do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (UFRGS), ⁵Docente do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente (UFRGS). Porto Alegre, Rio Grande do Sul – Brasil.

INTRODUÇÃO

Enterococos são bactérias Gram-positivas encontradas no trato gastrointestinal de humanos e de outros animais, em solo, água e alimentos. São importantes agentes produtores de alimentos fermentados e algumas espécies são utilizadas como probiótico. Entretanto, são também microrganismos associados a infecções hospitalares, como endocardites, bacteremias e infecções geniturinárias. Seu papel dualístico na natureza estimula a pesquisa dos fatores que determinam sua virulência. Entre os fatores que contribuem para a virulência em enterococos, destacam-se os genes *gelE*, *esp*, *agg*, *ace* e *cylA*, que codificam proteínas associadas à invasão, adesão e colonização do hospedeiro.

OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi investigar a distribuição dos genes envolvidos com os fatores de virulência e a atividade das enzimas gelatinase e hemolisina codificadas pelos genes *gelE* e *cylA*, respectivamente, entre amostras alimentares e clínicas de *Enterococcus* sp.

METODOLOGIA

Foram selecionados 66 amostras clínicas pertencentes à bacterioteca da UFCSPA e 70 alimentares à bacterioteca da UFRGS; todas as amostras haviam sido previamente identificadas para gênero e espécie. Foi empregada a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a amplificação dos genes supracitados relacionados com virulência em enterococos e foi realizada a identificação fenotípica dos fatores de virulência gelatinase e hemolisina. A presença ou ausência dos genes relacionados com virulência foi realizada amplificando o DNA das amostras por PCR. O gene *esp* foi submetido a PCR-RFLP, com a enzima de restrição *Hind* III, afim de determinar variações genotípicas com posterior sequenciamento para identificação de polimorfismos, como descritas por Shankar *et al.* A identificação de amostras produtoras de gelatinase foi realizada através do cultivo em caldo BHI acrescido em 4% de gelatina, seguido de incubação à 37°C por 48h e, depois, à temperatura de 8°C durante 30 minutos. A degradação da gelatina foi observada pela não solidificação do meio. A produção da enzima hemolisina foi averiguada pelo de crescimento das amostras em ágar sangue através da visualização de halos de degradação de hemácias ao redor das colônias.

RESULTADOS

Como resultados observados até o momento: **a)** as amostras de clínicas de *Enterococcus* apresentaram maior prevalência dos fatores de virulência quando comparadas com amostras alimentares, exceto para os genes *gelE* e *ace*. Em ambas amostragens houve a ocorrência de linhagens positivas para o gene *gelE*, porém sem a expressão da enzima gelatinase, o mesmo ocorrendo com o gene *cylA*. Tais dados indicam a presença de genes silenciosos. A Tabela 1 apresenta as prevalências para genótipo (genes *gelE*, *cylA*, *esp*, *agg* e *ace*) por PCR e fenótipo (testes bioquímicos para a atividade gelatinase e a hemolisina) dos fatores de virulência em enterococos.

Tabela 1: Porcentagem de positividade para presença do gene e de seu produto em amostras clínicas e alimentares de enterococos.

Amostras	<i>gelE</i>	Gelatinase	<i>cylA</i>	Citolisina	<i>esp</i>	<i>agg</i>	<i>ace</i>
Clínicas	73,8 %	32,8 %	51,5 %	20,6 %	64,7 %	57,3 %	70,6 %
Alimentares	80%	67,1 %	5,7 %	4,3 %	0 %	15,7 %	75,7 %

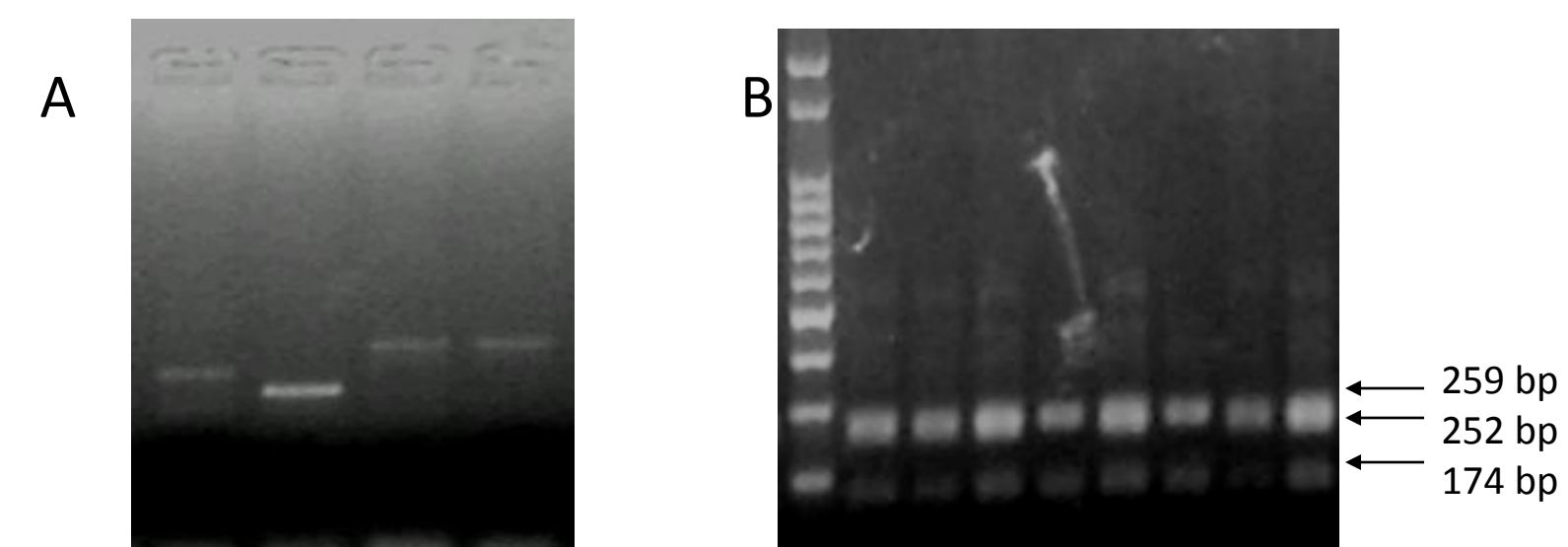


Figura 2: a) Produto de PCR para o gene *esp* em gel de agarose 0.8%, apresentando fragmentos de diferentes tamanhos e **b)** PCR-RFLP do gene *esp* demonstrando diferenças nos padrões de bandas.

b) foram observados polimorfismos no tamanho do gene *esp* (Figura 2a), que foi submetido à restrição com *Hind* III, revelando diferenças no número de repetições (Figura 2b). Estas amostras serão avaliadas através de seqüenciamento, última etapa deste projeto, que encontra-se em desenvolvimento.

CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que amostras de origem alimentar podem abrigar genes de virulência, muitos deles silenciosos, o que reforça o questionamento sobre a segurança desses microrganismos em alimentos. Amostras clínicas apresentaram uma alta frequência de fatores de virulência, sugerindo sua provável relação com a potencialidade da patogênese. Genes de virulência são conhecidos por sua associação com plasmídeos altamente transmissíveis, podendo ser transferidos para linhagens comensais humanas e também para cepas utilizadas na indústria alimentícia.

Referências:

- DUPONT, H.; VAEL, C.; MULLER-SERIEYS C., et al., Prospective evaluation of virulence factors of enterococci isolated from patients with peritonitis: impact on outcome. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 60(3):247-53. 2008
- MANNU, A. PABA, E. DAGA, R. COMUNIAN, S. ZANETTI, I. DUPRÉ AND L.A. SECHI, Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin, *International Journal of Food Microbiology* 88. 291-304. 2003
- QIN, K.V. SINGH, G.M. WEINSTOCK and B.E. MURRAY, Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence, *Infection and Immunity* 68 (2000), pp. 2579-2586
- CAMARGO, I. L. B. C. *Estudo dos fatores de virulência em Enterococcus sp. isolados no Brasil.* 153 f. (Tese – Doutorado em Biociências Aplicadas à Farmácia) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2005.

Apoio: