# Isolamento e caracterização de *Lactococcus garvieae*

# *Isolation and characterization of* Lactococcus garvieae

**PEDRO ALVES d'AZEVEDO** – Professor Assistente da Disciplina de Microbiologia e Virologia da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA) e Doutorando do curso de Pós-Graduação do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Bolsista do CNPq.
**CHRISTIANO PERIN** – Acadêmico da FFFCMPA.
**FÁBIO LUÍS BECKER** – Acadêmico da FFFCMPA.
**GABRIEL ZATTI RAMOS** – Acadêmico da FFFCMPA.

Endereço para correspondência:
**Prof. Pedro Alves d'Azevedo**
Rua Sarmento Leite 245/211
Porto Alegre – RS – 90050-170
Fone (51)224-8822
E-mail: pedroaze@fffcmpa.tche.br

**SINOPSE**

Microrganismos do gênero *Lactococcus*, devido à similaridade fisiológica com as bactérias do gênero *Enterococcus*, podem ser erroneamente identificados como estes últimos no laboratório clínico. O objetivo deste estudo é apresentar o primeiro relato das características laboratoriais de *Lactococcus garvieae* isolado a partir de espécime clínico na cidade de Porto Alegre/RS. Foram analisadas quanto ao gênero e espécie 456 amostras encaminhadas como possíveis *Enterococcus* ao Laboratório de Cocos Gram Positivos da FFFCMPA no período de julho de 1996 a junho de 1997. Testou-se a susceptibilidade a antimicrobianos das amostras e empregou-se a técnica de eletroforese de proteínas em gel (SDS-PAGE) para confirmação das espécies menos freqüentes. Uma amostra apresentou características fisiológicas não totalmente compatíveis com o gênero *Enterococcus.* Testes adicionais foram realizados e a amostra enviada ao Centers for Disease Control and Prevention (CDC, Atlanta, GE) para identificação e confirmação, sendo identificada como *Lactococcus garvieae*, mesmo resultado encontrado pelo nosso estudo. Concluímos que para aqueles laboratórios clínicos que dispõem de maiores recursos, a análise dos perfis de proteínas totais através da técnica de eletroforese das proteínas em gel de policrilamida (SDS-PAGE) pode ser usada para determinar as espécies mais comuns do gênero *Lactococcus* isolados em infecções humanas, sendo um procedimento simples de se executar e também de menor custo, comparado com a análise genética.

UNITERMOS: *Lactococcus garvieae*, Microbiologia, Urinálise.

**ABSTRACT**

*The microrganisms of the genus* Lactococcus, *due to its physiologic similarity with the genus* Enterococcus, *may be misidentified by the clinical microbiology laboratory. The purpose of this study is to present the first report of the laboratorial features of* Lactococcus garvieae *isolated from a clinical sample in Porto Alegre-RS. A total of 456 samples of presumably* Enterococcus *were sent and analyzed in genus and species at the FFFCMPA Gram-positive Cocci Laboratory during the period of July, 1996 to June, 1997. The antimicrobial susceptibility was tested and whole-cell protein gel eletrophoresis (SDS-PAGE) was used to identify the unusual species. One sample presented physiological features not totally compatible with the* Enterococcus *genus. Additional tests were performed and the isolate was to Centers for Disease Control and Prevention (CDC, Atlanta, GE) for further identification. The isolate was identified as* Lactococcus garvieae, *which confirmed our results. We conclude that those clinical laboratories that have appropriate resources could use the whole protein profile analysis to determine the more common species of* Lactococcus *isolated of human infections through of SDS-PAGE, being it a simple procedure to execute and too less expensive when compared with genetical analysis.*

KEY WORDS: Lactococcus garvieae, *microbiology, urinalysis.*

## INTRODUÇÃO

O gênero *Lactococcus* era antigamente conhecido como o grupo lático dos *Streptococcus* e constituído pelos *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* e *Streptococcus diacetylactis*. Após o gênero *Lactococcus* haver sido reconhecido como um gênero isolado por Schleifer et al. (1985), novas espécies foram adicionadas ao mesmo. Uma das espécies desse novo gênero é o *Lactococcus garvieae*. Esta espécie foi inicialmente descrita como *Streptococcus garvieae* e primeiramente isolada de casos de mastite bovina (1). É um patógeno emergente causador de zoonoses que, além de ser isolado em bovinos, já foi isolado em várias espécies de peixes e em infecções humanas (2).

Atualmente existem sete espécies e subespécies conhecidas de *Lactococcus,* as quais podem ser identificadas por reações fisiológicas (3). *Lactococcus garvieae* é a espécie de *Lactococcus* mais freqüentemente isolada em infecções humanas, seguida pelo *Lactococcus lactis* subespécie *lactis* (4, 5).

Os *Lactococcus* são cocos Gram–positivos, catalase negativos que aparecem como habitantes inócuos de alimentos, principalmente de laticínios. Não são comumentemente considerados patógenos significativos de humanos e animais, pois são pouco isolados clinicamente, sendo mais freqüentemente associados a infecções oportunistas (5, 6).

Nos últimos anos, alguns aspectos têm contribuído para o crescimento da incidência de infecções oportunistas. Dentre eles destacam-se: a maior imunossupressão dos pacientes devido a doenças como a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) e ao uso de imunossupressores, o aumento do número de procedimentos invasivos e o uso abusivo de antibióticos (6).

Infecções sérias por *Lactococcus garvieae* são extremamente raras. A endocardite bacteriana causada por *Lactococcus garvieae* é extremamente incomum, havendo apenas quatro casos descritos na literatura mundial (1).

O gênero *Lactococcus*, devido a sua similaridade fisiológica com o gênero *Enterococcus*, muitas vezes é erroneamente identificado como este último no laboratório clínico. Freqüentemente os

*Lactococcus* são identificados como espécies de *Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Enterococcus seriolicida, Enterococcus durans* e *Enterococcus hirae* (3). Teixeira et al. (1996) verificaram através da análise do perfil de proteínas e dos estudos de hibridização de DNA que as espécies *Enterococcus seriolicida* e *Lactococcus garvieae* na realidade eram uma mesma espécie, e sugeriram a permanência do nome da espécie mais antiga, *Lactococcus garvieae*. Por essas razões, acredita-se que a prevalência de isolados clínicos de *Lactococcus* possa ainda estar sendo subestimada.

O objetivo deste trabalho é o de apresentar o primeiro isolamento de *Lactococcus garvieae* a partir de espécime clínico na cidade de Porto Alegre-RS.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Amostras bacterianas**: foram analisadas 456 amostras inicialmente classificadas como do gênero *Enterococcus* enviadas ao Laboratório de cocos Gram positivos da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre, no período de julho de 1996 a junho de 1997, provenientes de várias instituições de saúde da cidade de Porto Alegre.

**Identificação:** as amostras foram analisadas quanto a suas características fenotípicas através de testes fisiológicos convencionais, segundo Facklan & Collins (1989) e Facklan & Teixeira (1997).

**Testes de susceptibilidade:** as amostras foram testadas quanto à susceptibilidade aos antimicrobianos através do teste de disco difusão, utilizando-se discos impregnados com antimicrobianos (ampicilina 10 µg, ciprofloxacina 5 µg, cloranfenicol 30 µg, eritromicina 15 µg, estreptomicina 300 µg, gentamicina 120 µg, imipenem 10 µg, nitrofurantoína 300 µg, tetraciclina 30 µg e vancomicina 30 µg), seguindo as recomendações do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 1997).

**Eletroforese das proteínas em gel de policrilamida na presença de duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE):** a análise do perfil protéico total foi realizada através da técnica de SDS-PAGE seguindo as recomendações de Merquior et al. (1994).

## RESULTADOS

Uma das amostras apresentou características fisiológicas não totalmente compatíveis com o gênero *Enterococcus* e, portanto, foi submetida a testes adicionais para a sua caracterização. O microrganismo foi isolado da urina de um paciente do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em dezembro de 1996.

As características fisiológicas da amostra estudada estão agrupadas no Quadro 1.

Em relação ao teste de susceptibilidade com disco de difusão, a amostra mostrou-se resistente à ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina e tetraciclina.

A análise do perfil de proteínas totais (Figura 1) não apresentou diferenças importantes com relação ao perfil da cepa padrão *Lactococcus garvieae* SS-1290. A amostra foi confirmada no Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, como sendo *Lactococcus garvieae*.

## DISCUSSÃO

O Quadro 2 lista as características fisiológicas utilizadas para diferenciar *Lactococcus* de outros cocos Gram-positivos, catalase-negativos. Devido à similaridade entre *Lactococcus* e *Enterococcus*, reações adicionais precisam ser realizados, pois muitas amostras de *Lactococcus* são identificadas como *Enterococcus* baseando-se em provas rotineiramente utilizadas como teste da hidrólise da esculina na presença de bile (teste BE) positivo e teste de crescimento em caldo contendo 6,5% de Cloreto de sódio (NaCl 6,5%) e hidrólise da pirroglutamil-β-naftilamida (teste PYR).

A amostra isolada não cresceu quando incubada em caldo à 45ºC em 24 horas e mostrou fraco crescimento

**QUADRO 1** – Características fisiológicas da amostra estudada

| Características | Resultado da amostra |
|---|---|
| Hemólise frente ao sangue de carneiro, humano, cavalo e coelho. | sem hemólise |
| Coloração de Gram | cocos isolados/pares |
| Catalase | - |
| Hidrólise da esculina na presença de bile (teste BE) | + |
| Hidrólise do L-pirroglutamil-β-naftilamida (teste PYR) | + |
| Hidrólise da leucina-β-naftilamida (teste LAP) | + |
| Fermentação de carbohidratos: | |
| arabinose | - |
| lactose | - |
| manitol | + |
| metil-α-D-glicopiranosídeo (MGP) | - |
| rafinose | - |
| sacarose | + |
| sorbitol | - |
| sorbose | - |
| Hidrólise da arginina | + |
| Utilização do piruvato | - |
| Produção de pigmento | - |
| Motilidade | - |
| Resistência a antimicrobianos | Cl, Er, Te, Ci |
| Crescimento à 10 ºC | + |
| Crescimento à 45 ºC | - |
| Crescimento em caldo com 6,5% de NaCl após 48h de incubação | fr + |

+, positivo; –, negativo; fr+, fracamente positivo; Cl, cloranfenicol; Er, eritromicina; Te, tetraciclina; Ci, clindamicina.

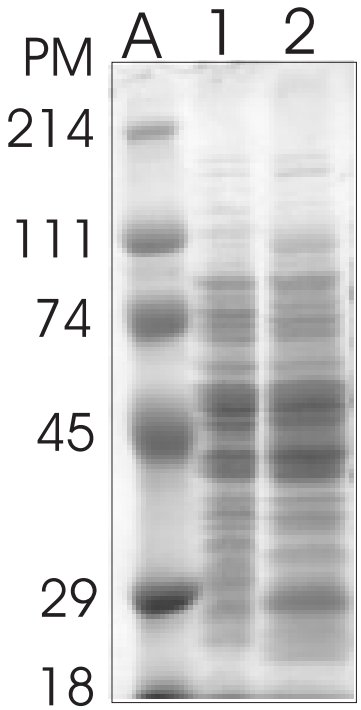



**Figura 1** – Perfis de proteínas totais de amostras obtidas através de SDS-PAGE. **A**, padrões de peso molecular (em kiloDaltons); **1**, SS-1290 *Lactococcus garvieae*; **2**, *Lactococcus garvieae* (amostra confirmada no CDC).

em 48 horas. Ao contrário, os *Enterococcus* crescem plenamente a 45ºC em 24 horas. Além disso, os *Enterococcus* crescem bem em caldo com 6,5% de NaCl, enquanto esta amostra cresceu fracamente nestas condições após 48 horas de incubação.

Pode-se diferenciar os integrantes do gênero *Lactococcus* em laboratório clínico. Assim, *Lactococcus lactis* são normalmente PYR negativos, entretanto cerca de 1/3 podem ser positivos (7), enquanto os *Lactococcus garvieae* são PYR positivos. Entretanto, apesar do teste PYR ser bastante específico para *Lactococcus garviae* (100%), ele possui pouca especificidade, sendo necessários testes adicionais (4, 7). A susceptibilidade à clindamicina pode ser usada para diferenciá-los, pois o *Lactococcus lactis* é sensível à clindamicina e o *Lactococcus garvieae* é resistente, portanto o uso de discos com clindamicina em culturas de *Lactococcus* é um processo útil nos laboratórios clínicos (3). A amostra isolada neste estudo foi resistente à clindamicina.

Para ajudar na diferenciação e identificação de espécies de *Enterococcus* e gêneros relacionados (incluindo *Lactococcus*), Carvalho, Teixeira & Facklam (1998) sugeriram o uso do teste de acidificação do metil-a-D-glicopiranosídeo (MGP) e susceptibilidade à efrotomicina (EFRO). *Lactococcus garvieae* apresenta-se negativo no teste MGP e é susceptível à EFRO, enquanto *Enterococcus faecalis* (espécie mais comumente isolada em infecções humanas), apesar de ser MGP negativo, é resistente à EFRO (8).

Zlotkin et al. (1998) sugerem utilização de um novo teste da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), específico e altamente sensível, baseado em primers deduzidos das regiões que carreiam os genes 16S do rRNA, para identificação de *Lactococcus garvieae*. A utilização deste método, concomitantemente, com o teste de difusão com disco da clindamicina para verificar o halo de inibição por *Lactococcus lactis* (2), conseguem diferenciar estes dois principais microrganismos do gênero *Lactococcus*, porém, infelizmente, estas técnicas ainda não estão disponíveis na rotina de laboratórios clínicos.

A significância de se identificar erroneamente uma amostra de *Lactococcus* como uma de *Enterococcus* é ainda desconhecida, pois existem dados limitados sobre a susceptibilidade aos diferentes antimicrobianos das amostras de *Lactococcus* (2-7). Entretanto, é sugerido que os laboratórios que pretendam identificar os *Enterococcus* à nível de espécie tomem cuidado e introduzam em suas rotinas alguns testes específicos para uma correta identificação de *Lactococcus*. Sugere-se que microrganismos Gram positivos e BE positivos não hemolíticos devam no mínimo ser testados para crescimento em 10°C e 45 °C.

Para aqueles laboratórios que dispõem de maiores recursos, a análise dos perfis de proteínas totais através da técnica de eletroforese das proteínas em gel de policrilamida (SDS-PAGE) pode ser usada para determinar as espécies

**QUADRO 2** – Características para diferenciação de cocos Gram positivos anaeróbios, catalase negativos

| Microorganismo | Arranjo celular | VAN | PYR | LAP | BE | NaCl | HEM | ARG |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Lactococcus* | cadeias curtas, pares | S | V | + | V | V | a, g | V |
| *L. garvieae* | cadeias curtas, pares | S | + | + | V | + | a, g | + |
| *Enterococcus* | cadeias | (S) | + | + | + | + | a, b, g | V |
| *Vagococcus* | cadeias | S | + | + | + | + | a, g | V |
| *Leuconostoc* | cadeias | R | - | - | V | V | a, g | - |
| *Globicatella* | cadeias | S | + | - | - | + | a | - |
| *Streptococcus* | cadeias | S | – * | - | (-) | - | a, b, g | V |
| *Helococcoccus* | tétrades, aglomerados | S | + | - | + | + | g | - |
| *Pediococcus* | tétrades, aglomerados | R | - | + | + | V | a | V |
| *Tetragenococcus* | tétrades, aglomerados | S | - | + | + | + | a | N/A |
| *Aerococcus* | tétrades, aglomerados | S | + | - | V | + | a | - |
| *Gemella* | tétrades, aglomerados | S | + | V | - | - | a, g | - |
| **nosso isolado** | cadeias curtas, pares | S | + | + | + | fr + | g | + |

Adaptado de Facklam & Teixeira (1997). VAN, vancomicina; NaCl, caldo com 6,5%; HEM, hemólise; ARG, arginina; S, sensível; R, resistente; V, reações variáveis; +, positivo; –, negativo; fr+, fracamente positivo; a, alfa; b, beta; g, gama; ( ), maioria é sensível/negativo; *, *Streptococcus* grupo A são positivos; N/A, dado não disponível.

mais comuns do gênero *Lactococcus* isolados em infecções humanas, sendo este um procedimento simples de se executar e também de menor custo, em comparação à análise genética como o PCR ou mesmo a técnica de Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE).

**AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA) e ao Laboratório de Apoio Biotecnológico do Departamento de Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro pelo apoio recebido neste estudo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FEFER JJ, RATZAN KR, SHARP SE, SAIZ E. *Lactococcus garvieae* endocarditis: report of a case and review of the literature. Diagn Microbiol Infect Dis 1998; 29:2731-4.
2. ZLOTKIN A, ELDAR A, GHITTINO C, BERCOVIER H. Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. J Clin Microbiol 1998; 36:983-5.
3. ELLIOT JA, FACKLAM RR. Antimicrobial susceptibilities of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* and a proposed method to discriminate between them. J Clin Microbiol 1996; 34:1296-8.
4. TEIXEIRA LM, MERQUIOR VLC, VIANNI MCE et al. Phenotipic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garvieae* strains isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garvieae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. Int J Syst Bacteriol 1996; 46:664-8.
5. COURVALIN P, VOSS W, RUBENS CE. Genetics of *Streptococci*, *Enterococci*, and *Lactococci*. ASM News 11998; 64:501-4.
6. RUOFF KL. The "new" catalase-negative, gram-positive cocci. Clinical Microbiology Newsletterr 1994; 18:153-6.
7. ELLIOTT JA, COLLINS MD, PIGOTT NE, FACKLAM RR. Diferenciation of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* from humans by comparision of whole-cell protein patterns. J Clin Microbiol 1991; 29:2731-4.
8. CARVALHO MGS, TEIXEIRA LM, FACKLAM RR. Use of tests for acidification of Methyl-α-D-glucopyranoside and suscetibility to Efrotomycin for diferentiation of strains of *Enterococcus* and some related genera. J Clin Microbiol 1998; 36:1584-7.
9. MERQUIOR VLC, PERALTA JM, FACKLAM RR, TEIXEIRA LM. Analysis of electrophoretic whole-cell protein profiles as a tool for characterization of *Enterococcus* species. Cur Microbiol 1994; 28:149-53.
10. FACKLAM RR, COLLINS MD. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. J Clin Microbiol 1989; 27:731-4.
11. FACKLAM RR, TEIXEIRA LM. *Enterococcus*. In: Collier L, Balows A, Sussman M, eds. Microbiology and microbial infections. 9th ed. London: Edward Arnold, 1997; 669-82.