

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Myrna Barbosa Gomes

**CARACTERIZAÇÃO DE *ENTEROCOCCUS* spp. ISOLADOS DE ALIMENTOS
QUANTO À PRESENÇA DE GENES DE VIRULÊNCIA, DA DESCARBOXILASE E
DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

Rio de Janeiro

2013

Myrna Barbosa Gomes

**CARACTERIZAÇÃO DE *ENTEROCOCCUS* spp. ISOLADOS DE ALIMENTOS
QUANTO À PRESENÇA DE GENES DE VIRULÊNCIA, DA DESCARBOXILASE E
DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária

Orientador: Dr. Victor Augustus Marin

Rio de Janeiro

2013

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Gomes, Myrna Barbosa

Caracterização de *Enterococcus* spp. isolados de alimentos quanto à presença de genes de virulência, da descarboxilase e de atividade antimicrobiana / Myrna Barbosa Gomes – Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ. 2013.

96 f, il., tab.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2013, Orientador: Victor Augustus Marin

1. Fatores de Virulência. 2. Aminas Biogênicas. 3. Bacteriocinas. 4. *Enterococcus*

Myrna Barbosa Gomes

**CARACTERIZAÇÃO DE *ENTEROCOCCUS* spp. ISOLADOS DE ALIMENTOS
QUANTO À PRESENÇA DE GENES DE VIRULÊNCIA, DA DESCARBOXILASE E
DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial, para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Aprovado em ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Marco Antônio Lemos Miguel (Doutor)
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Verônica Viana Vieira (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Antônio Eugênio Castro Cardoso de Almeida (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Victor Augustus Marin (Doutor) - Orientador
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

À Deus pelas bênçãos de todos os dias.
Aos meus pais pelo apoio incondicional
Aos meus amigos pela companhia

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por mais uma oportunidade de crescimento e pelos milagres diários que me fizeram chegar até aqui.

Aos meus pais por ajudarem e apoiarem as decisões tomadas por mim, por todos os ensinamentos e a educação, sem os quais não teria sucesso.

Aos meus irmãos: Milene, Rodolfo e Renan pelos momentos de descontração e alegria, pelas conversas sobre ciências e por todo o apoio.

Ao professor Dr. Victor Marin pela orientação, o apoio, pelos ensinamentos, pela paciência, pelo incentivo e suporte para a realização deste trabalho.

A Dra. Suely Fracalanza por abrir as portas, ceder às amostras utilizadas neste trabalho, ajudar sempre que precisei, por me orientar, por toda a paciência e compreensão, mas principalmente por cuidar de mim estes dois anos.

A minha amiga e irmã Nadine, que esteve ao meu lado em todos os momentos, ouvindo meus desabafos, me ajudando a superar os problemas e a desvendar os “segredos do Word/Excel”. São pessoas como você que me fazem acreditar que ainda existe gente boa na terra.

A Bruna Pires minha mais nova amiga para toda a vida, que esteve estes dois anos ao meu lado, alegrando o laboratório com a “dancinha da PCR”, me levando para almoçar, compartilhando desesperos, mas também as alegrias deste fim. Mesmo a distância, estarei sempre contigo.

As pessoas mais que especiais do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Microbiologia Dra. Paola, Dra. Regina, Renata, Maria Luiza, Rafael e Débora agradeço pela paciência, incentivo e apoio principalmente, nos momentos de dificuldades.

A Dra. Verônica, Dra. Elisa, João, Livia e Paulo, do Setor de Identificação Bacteriana, por sempre estarem dispostos a ajudar.

Aos amigos que fiz durante esta jornada, em especial a Jaciara, Natália, Juliana, Rafaela, Patrícia e Hilda.

A duas pessoas especiais, sem as quais eu não teria conseguido alcançar o novo sonho, Dra. Kátia Leandro e Dr. Eugênio Almeida.

Aos antigos amigos que continuam a partilhar comigo esta jornada, Dr. Rubens, Natália, Valéria, Talita e Rosana, obrigada!

Ao professor Dr. Marco Miguel IMPPG/UFRJ, pela doação das cepas de referência e valiosa avaliação deste projeto.

A todos do Departamento de Microbiologia e do Departamento de Imunologia por todo o apoio na infraestrutura para a realização da parte prática deste trabalho, em especial ao Will, Mariana e Regina.

Aos funcionários da secretaria e toda a equipe da Coordenação de Pós-Graduação por terem sempre colaborado nos momentos em que necessitei.

A todos que de alguma forma colaboraram durante todo tempo para a realização deste trabalho.

“Porque dEle, e por Ele, e para Ele são todas as coisas; glória, pois a Ele eternamente. Amém!”

Romanos 11:36

“We keep moving forward, opening new doors, and doing new things, because we're curious and curiosity keeps leading us down new paths.”

Walt Disney

RESUMO

Os micro-organismos do gênero *Enterococcus* constituem uma grande proporção das bactérias naturais da microbiota do trato gastrointestinal da maioria dos mamíferos, aves, répteis e insetos. São ubiqüitários e podem ser encontrados amplamente distribuídos no meio ambiente, em solos, água, plantas e alimentos. Estes micro-organismos foram considerados durante muito tempo comensais com baixo potencial patogênico, mas a medida que aumentou o envolvimento destes micro-organismos nas infecções nosocomiais, multirresistência aos antimicrobianos de uso terapêutico e a falta de informações sobre seus fatores de virulência enfatizaram a importância das caracterizações. O objetivo deste trabalho foi caracterizar genotipicamente amostras de enterococos isoladas de leite e frangos quanto à presença de fatores de virulência, produção de aminas biogênicas e de bacteriocinas. As amostras analisadas pertencem a espécies *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus gilvus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus gallinarum* e *Enterococcus hirae*. A presença do gene *agg* foi detectada em 45 (71,4%) das amostras testadas, o gene *cad* em 41 (65,1%), o gene *ccf* em 55 (87,3%), o gene *cob* foi detectado em 39 (61,9%) das amostras, o gene *cpd* 45 (71,4%), o *cylA* em 7 (11,1%) amostras, o *cylB* em 13 (20,6%) amostras, do *cylM* em apenas 4 (6,3%) amostras e do gene *gelE* em 35 (55,5%). Foram detectadas 27 (42,8%) amostras com o gene *tyrdc*, porém não foi detectado neste estudo amostra possuidora do gene *hdc*. A produção de bacteriocina foi observada em 13 (20,6%) das amostras; sendo apenas o gene da enterolisina detectado em duas delas. Os resultados apresentados neste estudo ressaltam as características das amostras de enterococos isolados de alimentos quanto à presença de fatores responsáveis por agravos a saúde humana.

Palavras chave: Fatores de Virulência. Aminas Biogênicas. Bacteriocinas. *Enterococcus*

ABSTRACT

The microorganisms of genus *Enterococcus* constitute a large proportion of the natural bacteria of the gastrointestinal tract from most mammals, birds, reptiles and insects. They are ubiquitous and can be found widely distributed in the environment in soil, water, plants and foods. These microorganisms have been considered for a long time commensals, but with increasing severity of nosocomial infections caused by them, multidrug resistance to antimicrobial agents and the lack of information about its virulence factors show the importance of new characterizations. The aim of this study was to characterize genotypically enterococci isolates from milk and chicken for the presence of virulence factors, production of biogenic amines and bacteriocins. The samples belong to the species *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus gilvus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus gallinarum*, and *Enterococcus hirae*. The presence of the *agg* gene was detected in 45 (71.4%) of the samples tested, the *cad* gene in 41 (65.1%), gene *ccf* in 55 (87.3%), the gene *cob* was detected in 39 (61.9%) of the samples, the gene *cpd* 45 (71.4%), the *cylA* in 7 (11.1%) samples, *cylB* in 13 (20.6%) samples, the *cylM* in only 4 (6.3%) samples and gene *gelE* in 35 (55.5%). We detected 27 (42.8%) samples with gene *tyrdc*, but was not detected in this study sample possessing the gene *hdc*. The bacteriocin production was observed in 13 (20.6%) of samples, with only the gene of enterolisina A detected in two of them. The results presented in this study emphasize the characteristics of the samples of enterococci isolated from food for the presence of factors responsible for damages to human health.

Keywords: Virulence Factors. Biogenic Amines. Bacteriocins. *Enterococcus*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 – IMAGEM ILUSTRATIVA DA MONTAGEM DAS PLACAS DO TESTE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA. | 48 |
| FIGURA 2 - IMAGEM ILUSTRATIVA DO RESULTADO DO TESTE DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA..... | 48 |
| FIGURA 3 – GEL ILUSTRATIVO DA AMPLIFICAÇÃO PELA PCR DO GENE <i>agg</i> (1210PB). | 52 |
| FIGURA 4 – GEL ILUSTRATIVO DA AMPLIFICAÇÃO PELA PCR DO GENE <i>gelE</i> (419PB). | 53 |
| FIGURA 5 – GEL ILUSTRATIVO DA AMPLIFICAÇÃO PELA PCR DO GENE <i>cylM</i> (742PB). | 54 |
| FIGURA 6 – GEL ILUSTRATIVO DA AMPLIFICAÇÃO PELA PCR DO GENE <i>efaAfm</i> (735PB). | 55 |
| FIGURA 7 – GEL ILUSTRATIVO DA AMPLIFICAÇÃO PELA PCR DO GENE <i>cpd</i> (782PB). | 56 |
| FIGURA 8 – GEL ILUSTRATIVO DA AMPLIFICAÇÃO PELA PCR DO GENE <i>cob</i> (1405PB). | 57 |
| FIGURA 9 – GEL ILUSTRATIVO DA AMPLIFICAÇÃO PELA PCR DO GENE <i>cad</i> (1299PB). | 58 |
| FIGURA 10 – GEL ILUSTRATIVO DA AMPLIFICAÇÃO PELA PCR DO GENE <i>ccf</i> (543PB). | 59 |
| FIGURA 11 - GRÁFICO DA PREVALÊNCIA DOS GENES DE VIRULÊNCIA | 60 |
| FIGURA 12 - GEL ILUSTRATIVO DA AMPLIFICAÇÃO PELA PCR DOS GENES <i>hdc</i> E <i>tyrdc</i> (440 E 1100PB, RESPECTIVAMENTE)..... | 61 |
| FIGURA 13 – IMAGEM ILUSTRATIVA DA PLACA COM O TESTE DE ATIVIDADE ANTI-LISTERIA. | 63 |
| FIGURA 14 – GEL ILUSTRATIVO DA AMPLIFICAÇÃO PELA PCR DO GENE <i>entIA</i> (1100PB). | 64 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1 - SEQUÊNCIA DOS INICIADORES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO, TAMANHO DO PRODUTO E TEMPERATURA DE ANELAMENTO. | 45 |
| TABELA 2 – SEQUÊNCIA DOS INICIADORES UTILIZADOS E TAMANHO DO PRODUTO. | 46 |
| TABELA 3 - SEQUÊNCIA DOS INICIADORES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO E TEMPERATURA DE ANELAMENTO. | 49 |
| TABELA 4 - DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES E FONTES DE ISOLAMENTO ENTRE <i>ENTEROCOCCUS</i> | 51 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB – Aminoácidos Biogênicos
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APPCC – Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
ATCC – *American Type Culture Collection*
BAL – Bactérias Ácido Láticas
BHI – Brain Heart Infusion
BPF – Boas Práticas de Fabricação
CDC – *Centers for Disease Control*
CN – Controle Negativo
CP – Controle Positivo
DNA – Ácido Desoxiribonucleico
dNTP – Desoxiribonucleotídeo Trifosfatado
EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético
FDA – *Food and Drug Administration*
H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio
IPAs – Ilhas de Patogenicidade
LAP – L-leucina-β-naftilamida
MAO – Monoamina Oxidase
MgCl₂ – Cloreto de Magnésio
NaCl – Cloreto de Sódio
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE – Eletroforese em Gel Submetido a Campo Pulsado
PIQ – Padrão de Identidade e Qualidade
PM – Peso Molecular
PYR – L-pirrolidonil-β-naftilamida
PYRase – Pirrolidonilarilamidase
RDC – Resolução da Diretoria Colegiada
RNA – Ácido Ribonucleico
TBE – Tris Borato EDTA
TDC – Tirosina Descarboxilase
UFC – Unidade Formadora de Colônia
UV – Ultra-Violeta
VREs – *Vancomycin-Resistant Enterococcus*

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| 1. | INTRODUÇÃO | 17 |
| 1.1 | CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DO GÊNERO <i>ENTEROCOCCUS</i> | 19 |
| 1.2 | PATOGENICIDADE | 20 |
| 1.3 | FATORES DE VIRULÊNCIA..... | 21 |
| 1.4 | SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS..... | 25 |
| 1.5 | PRESENÇA EM ALIMENTO | 26 |
| 1.6 | AMINAS BIOGÊNICAS | 28 |
| 1.7 | BACTERIOCINAS | 31 |
| 1.8 | TÉCNICAS MOLECULARES | 33 |
| 1.9 | IMPORTÂNCIA SANITÁRIA | 35 |
| 2. | OBJETIVO GERAL | 39 |
| 3. | MATERIAL E MÉTODOS | 41 |
| 3.1 | OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS..... | 41 |
| 3.1.1 | Recuperação das amostras | 42 |
| 3.2 | IDENTIFICAÇÃO CONFIRMATÓRIA | 42 |
| 3.2.1 | Características morfo-tintoriais..... | 42 |
| 3.2.2 | Produção da enzima catalase | 43 |
| 3.2.3 | Hidrolise da esculina em presença de bile | 43 |
| 3.2.4 | Armazenamento das amostras | 43 |
| 3.3 | EXTRAÇÃO DO DNA | 44 |
| 3.4 | DETECÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA | 44 |
| 3.5 | DETECÇÃO DOS GENES DA DESCARBOXILASE..... | 45 |
| 3.6 | AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA | 46 |
| 3.6.1 | Preparo dos micro-organismos utilizados..... | 47 |
| 3.6.2 | Preparo das placas..... | 47 |
| 3.6.3 | Teste para atividade antimicrobiana | 47 |
| 3.7 | AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DE ENTEROCINAS | 48 |
| 4. | RESULTADOS..... | 51 |
| 4.1 | IDENTIFICAÇÃO CONFIRMATÓRIA | 51 |

| | | |
|-----|---|----|
| 4.2 | DETECÇÃO DOS GENES QUE CODIFICAM FATORES DE VIRULÊNCIA | 51 |
| 4.3 | DETECÇÃO DOS GENES DAS ENZIMAS DESCARBOXILASE..... | 60 |
| 4.5 | RESULTADOS DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS <i>ENTEROCOCCUS</i> spp. | 61 |
| 4.6 | IDENTIFICAÇÃO DOS GENES DAS BACTERIOCINAS | 63 |
| 5. | DISCUSSÃO..... | 66 |
| 6. | CONCLUSÃO | 74 |
| | REFERÊNCIAS | 76 |
| | APÊNDICE A – TABELA GERAL DA DISSERTAÇÃO | 93 |

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Enterococcus* compreende um grupo bastante complexo e importante de micro-organismos, principalmente, no que se refere ao seu relacionamento com os seres humanos (FACKLAM, CARVALHO & TEIXEIRA, 2002). Estas bactérias constituem uma grande proporção das bactérias naturais da microbiota do trato gastrointestinal da maioria dos mamíferos, aves, répteis e insetos. São micro-organismos ubíquos, podendo ser encontrados amplamente distribuídos no meio ambiente, em solos, na água, em plantas e alimentos (GIRAFFA, 2003; KLEIN, 2003). Os enterococos são considerados bactérias autóctones e uma vez liberadas no meio ambiente, são capazes de colonizar diversos nichos, pois possuem excepcional capacidade de resistir e se multiplicar em condições ambientais hostis, com grande potencial para contaminar águas e alimentos (IVERSEN *et al.*, 2002).

A taxonomia das espécies de enterococos sofreu consideráveis mudanças desde meados da década de 80. Antes do advento e do uso disseminado de técnicas moleculares para tais análises, estes micro-organismos eram agrupados, por similaridade, aos estreptococos. Posteriormente, seriam classificados como estreptococos do grupo D, segundo esquema sorológico de identificação de Lancefield (KONEMAN, 2008). O avanço dos estudos filogenéticos e moleculares baseados em critérios como: seqüências nucleotídicas do DNA ribossomal 16S e hibridização de DNA:DNA e DNA:RNA de diferentes cepas, forneceram bases para a reorganização do gênero *Streptococcus* em três grupos geneticamente distintos: *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Lactococcus* (STILES & HOLZAFEL, 1997; FACKLAM, SAHM & TEIXEIRA, 2005). O gênero *Enterococcus* foi oficialmente estabelecido após estudos realizados por Farrow *et al.* (1983) e Shleifer & Kilpper-Bälz (1984), em que propuseram a transferência definitiva de duas espécies, *Streptococcus faecalis* e *Streptococcus faecium*, para um novo gênero, sob as denominações de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*. Atualmente, este grupo de micro-organismos compreende aproximadamente 46 espécies (EUZÉBY, 2012).

Os enterococos são bactérias ácido-láticas (BAL) amplamente distribuídas na natureza; elas ocorrem como parte da microbiota natural de muitos alimentos fermentados e entre outras qualidades, podem ser utilizadas como culturas iniciadoras na indústria de alimentos (FRANZ *et al.*, 2003; GIRAFFA, 2003; HUGAS *et al.*, 2003).

Segundo Foulquié-Moreno e colaboradores (2006), o gênero *Enterococcus* é o mais controverso dentro do grupo das bactérias ácido-láticas (BAL), isto se deve particularmente a robustez do micro-organismos, ao seu potencial biotecnológico e o aumento de sua associação com doenças graves envolvendo seres humanos e do seu comportamento frente aos antimicrobianos de uso terapêutico. Estes fatos têm proporcionado um aumento significativo dos estudos envolvendo os enterococos, com o objetivo de avaliar não somente as peculiaridades, como também as principais características e significado destes micro-organismos.

Mesmo não sendo considerados como micro-organismos patogênicos, os enterococos estão entre as bactérias oportunistas mais comumente encontradas em infecções nosocomiais, e associados a infecções graves como: endocardites, bacteremias, infecção do trato urinário e sepse neonatal (KÜHN *et al.*, 2000; VANCANNEYT *et al.*, 2002; FISHER & PHILLIPS, 2009).

Entre espécies de enterococos taxonomicamente definidas atualmente, duas são isoladas com mais frequência, os *E. faecalis* e os *E. faecium*. Estes micro-organismos podem ocorrer como participantes da microbiota, como indicadores de contaminação fecal ou serem deliberadamente adicionados aos alimentos fermentados, para os quais contribuem para propriedades organolépticas (GIRAFFA 2002 e 2003). Algumas espécies desse gênero podem ser utilizadas como probiótico, que por definição são organismos vivos administrados em quantidade adequada, que confere um efeito benéfico à saúde do hospedeiro, como auxiliar no balanço microbiano no intestino e podem ser usado no tratamento de gastroenterites em humanos e animais (GIRAFFA, 2003; FOULQUIE MORENO *et al.* 2006; BHARDWAJ *et al.* 2008).

Considerando a multirresistência das espécies do gênero *Enterococcus*, a presença de fatores de virulência e a capacidade de produzir aminas biogênicas, estando estas ainda associadas as diversas patogenias e intoxicações de difícil tratamento, ressalta a necessidade do aumento das pesquisas para a obtenção de dados relevantes sobre esses micro-organismos em alimentos consumidos no Brasil. Portanto este trabalho buscou expandir a caracterização genotípica de amostras de enterococos isoladas de carne de frango e leite pasteurizado realizada por Fracalanza (2007), das quais um grupo de amostras foi selecionado, de acordo com o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, gerando uma amostragem homogênea para o estudo.

1.1 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DO GÊNERO *ENTEROCOCCUS*

Os micro-organismos pertencentes a este gênero são cocos Gram-positivos, podendo apresentar-se isoladamente, aos pares ou em pequenas cadeias, são catalase negativos e não formam esporos. Embora cresçam em presença de oxigênio, são incapazes de sintetizar o composto heme e, portanto, não possuem metabolismo respiratório, são anaeróbios facultativos, e capazes de crescer em condições bastante variadas de temperatura (10° - 45° C) e de pH (5,0 - 9,6) (FACKLAM, SAHM & TEIXEIRA, 2005).

Uma característica importante deste gênero é que possuem metabolismo homofermentativo, ou seja, produz ácido lático como principal substância no final da via de consumo da glicose, sem produção de gás (TEIXEIRA *et al.*, 2003). Algumas das enzimas geradas por estes micro-organismos podem também ser utilizadas para identificação presuntiva como: pirrolidonilarilamidase (PYRase) e leucina aminopeptidase (LAPase), embora ocorram exceções em algumas espécies. São capazes de hidrolisar a esculina na presença de sais biliares, em geral toleram altas concentrações de NaCl (6,5%) e possuem antígeno D de Lancefield (FACKLAM, SAHM & TEIXEIRA, 2005 e DOMIG *et al.*, 2003).

A identificação das espécies de enterococos apenas por meio de testes fisiológicos é problemática devido à considerável diversidade fenotípica destes micro-organismos, sendo comum o isolamento de amostras com características bioquímicas atípicas (PARK *et al.*, 1999; FACKLAM, CARVALHO & TEIXEIRA, 2002; FRACALANZZA *et al.*, 2007).

Os enterococos são considerados, entre as bactérias não-esporuladas, mais termotolerantes conhecidas (GORDON & AHMAD, 1991; FRANZ, HOLZAPFEL & STILES, 1999). *E. faecium*, por exemplo, é capaz de sobreviver ao aquecimento a 65°C durante 30 minutos, 71°C durante 10 minutos e 80°C durante 3 minutos (KEARNS, FREEMAN & LIGHTFOOT, 1995). Como consequência, esta característica é muito importante para a indústria de alimentos, pois podem resistir aos processos de conservação como cozimento, pasteurização e fermentação (FRANZ, HOLZAPFEL & STILES, 1999; HOEBEN, 2003).

1.2 PATOGENICIDADE

Enterococos são bactérias oportunistas, consideradas de baixa virulência, que fazem parte da microbiota do trato gastrointestinal dos seres humanos e de inúmeros animais. Entretanto, emergiram como importantes micro-organismos responsáveis por infecções nosocomiais isolados com frequência de sangue, do trato urinário e sítios cirúrgicos (EATON & GASSON, 2001). Apesar da grande variedade de infecções com as quais os enterococos estão envolvidos, os fatores que realmente determinam a patogenicidade dos membros deste gênero não estão bem esclarecidos, uma vez que essas bactérias apresentam uma grande capacidade tanto de adquirir como de transferir genes (JETT *et al.*, 1994; VANCANNEYT *et al.*, 2002). Vários marcadores de virulência como as citolisinas, gelatinases, hialuronidases, substância de agregação, proteína extra-celular de superfície, têm sido identificados entre os enterococos, principalmente entre os isolados de materiais clínicos, que envolvem um ou mais estágios da patogenia.

Para iniciar e desenvolver um processo infeccioso o patógeno precisa, primeiramente, colonizar os tecidos do hospedeiro, resistir aos mecanismos inespecíficos e específicos de defesa, e produzir alterações patológicas diretamente através da produção de toxinas ou indiretamente através da promoção de respostas (JOHNSON, 1994; FRANZ *et al.*, 2003). A colonização pode não constituir um fator de virulência propriamente dito, mas amplifica o potencial de patogenicidade do micro-organismo em combinação com os demais fatores, propiciando o desenvolvimento da doença.

A resistência dos enterococos a um número cada vez maior de grupos de antimicrobianos contribui efetivamente para sua patogenicidade. O tratamento de infecções associadas aos enterococos pode ser dificultado, pois estes micro-organismos são intrinsecamente resistentes a importantes grupos de uso terapêutico, incluindo a resistência intermediária a beta-lactâmicos, as cefalosporinas, clindamicina e aos aminoglicosídeos. Além disso, eles podem adquirir resistência a outros agentes antimicrobianos como a ciprofloxacina, eritromicina, tetraciclina, linezolida, a daptomicina, quinupristina/dalfopristina e vancomicina (KONEMAM, 2008; HAMMERUM *et al.*, 2010).

E. faecalis e *E. faecium* representam, respectivamente, cerca de 75% e 20% de todas as infecções relacionadas aos enterococos (CONDE-ESTEVEZ *et al.*, 2011; PEEL *et al.*, 2011). Entretanto, o número de casos reportados de bacteremias causadas por enterococos

não-faecalis e não-faecium tem crescido gradualmente e de maneira representativa (TAN *et al.*, 2010).

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), em uma pesquisa realizada sobre as infecções nosocomiais, indicou que os enterococos foram responsáveis por 13,9% delas, sendo ao lado da *Escherichia coli* considerados entre os principais agentes causadores de infecções hospitalares do trato urinário (DESAI *et al.*, 2001). Segundo o programa de vigilância antimicrobiana SENTRY (EUA), projetado para monitorar os micro-organismos patogênicos e tendências de resistência aos antimicrobianos em uma escala global, os enterococos foram classificados na América do Norte, como 4º (10,2%) e na Europa como 5º (7,2%) principal patógeno responsável por infecções na corrente sanguínea (ICS), porém com uma incidência muito menor na América Latina (3,3%) (BIEDENBACH *et al.*, 2004). O trabalho realizado por Marra e colaboradores (2011), mostrou que os enterococos estavam entre os dez micro-organismos mais isolados de infecções da corrente sanguínea.

Os enterococos, embora considerados micro-organismos de baixa virulência e reduzido impacto clínico, atualmente são reconhecidos entre os principais agentes bacterianos envolvidos, tanto em infecções adquiridas em ambientes nosocomiais, como nas adquiridas na comunidade. Entretanto o aumento da incidência das infecções graves envolvendo esse micro-organismo e a dificuldade de tratamento colocam estes organismos entre os mais importantes patógenos humanos emergentes (FRANZ *et al.*, 1999; AMMERLAAN *et al.*, 2012).

1.3 FATORES DE VIRULÊNCIA

A patogenia das infecções enterocócicas ainda não está bem elucidada, muito embora se tenha conhecimento, de que vários potenciais atributos de virulência contribuem efetivamente para seu sucesso. Somado a isso, sabe-se que os enterococos são intrinsecamente resistentes a diversos grupos de antimicrobianos e além disto podem facilmente adquirir resistência aos antibióticos de uso clínico. A baixa susceptibilidade aliada a presença de fatores de virulência reforçam potencialmente a atuação desses micro-organismos como efetivos patógenos oportunistas em infecções nosocomiais (MUNDY, SAHM, & GILMORE, 2000; KAYSER, 2003; BIAVASCO *et al.*, 2007).

Os fatores de virulência das bactérias são componentes estruturais ou produtos do metabolismo, que possibilitam aos micro-organismos causarem danos ao hospedeiro. Estes fatores podem estar associados à célula, assim como podem ser extra-celulares, fazendo parte de sua composição anatômica ou fisiológica (KONEMAN, 2008).

Os genes de virulência dos patógenos bacterianos podem estar presentes no cromossomo ou em elementos extra-cromossômicos como os plasmídeos e transposons. A virulência nos micro-organismos é multi-fatorial e coordenadamente regulada por genes frequentemente aglomerados no genoma, em regiões distintas chamadas Ilhas de Patogenicidade - IPAs - (TENDOLKAR *et al.*, 2004).

Entre os fatores de virulência associados aos enterococos, são considerados de grande importância: as citolisinas (Cyl), gelatinase (GelE), substância de agregação (Agg), proteína de superfície extra-celular (Esp) e outras adesinas (MANNU *et al.* 2003; SEMEDO *et al.* 2003; SANCHEZ VALENZUELA *et al.* 2009; RUIZ-MOYANO *et al.*, 2010).

As citolisinas (também chamadas de hemolisinas) são toxinas bacterianas, cujo operon está localizado em um plasmídeo ferormônio-responsivo ou no cromossomo e são capazes de causar lise em inúmeros tipos de células, inclusive as bacterianas. As subunidades, grande e pequena, da citolisina são codificadas respectivamente pelos genes *cyl_L* e *cyl_S*, e são modificadas pós-tradução pelo produto do gene *cyl_M*. As subunidades de citolisina modificada são posteriormente, após serem secretadas da célula por um transportador ABC codificado pelo gene *cyl_B*. No ambiente extracelular as duas subunidades são ativadas por uma protease codificada pelo *cyl_A*, resultando numa citolisina funcional (HAAS *et al.*, 2002).

A grande incidência de isolamento de bactérias apresentando esse grupo de genes em amostras clínicas, associada com a habilidade dos enterococos em adquirir, acumular e compartilhar elementos extra cromossômicos, tanto entre bactérias do mesmo gênero como entre diferentes espécies, sinalizam para a necessidade do aumento da vigilância e dos estudos para avaliarem corretamente a evolução da patogenicidade neste gênero (SEMEDO *et al.*, 2003; KOCH *et al.*, 2004; FISHER & PHILLIPS, 2009; HÄLLGREN *et al.*, 2009).

A produção de gelatinase, que é uma endopeptidase zinco dependente extracelular responsável pela hidrólise de colágeno, gelatinina e pequenos peptídeos, tem a função principal de prover nutrientes ao micro-organismo pela degradação do tecido do hospedeiro. O gene (*gelE*), que codifica a enzima está localizado no cromossomo e é regulado de maneira dependente da densidade da célula. Em alguns estudos foram encontrados enterococos

isolados, que não apresentavam atividade de gelatinase expressa, porém os genes estavam presentes. Por não serem expressos, foram denominados de “genes silenciosos” e foram detectados tanto em amostras de origem clínica como de alimentos. Entretanto, os mesmos podem ser ativados por fatores ambientais como, por exemplo, as condições físicas do trato gastrintestinal ou os efeitos do sinergismo da microbiota bacteriana (GILMORE, 2002; KOCH *et al.*, 2004; VANCKERCKOVEN *et al.*, 2004; MOHAMED & HUANG, 2007; FISHER & PHILLIPS, 2009).

A substância de agregação (Agg) é uma glicoproteína de superfície, ferormônio-induzível, que aumenta a hidrofobicidade na superfície celular dos enterococos e media a formação de agregados durante a conjugação, induzindo a localização do colesterol no fagossoma, impedindo a fusão com os lisossomas, e possibilitando a transferência mais eficiente do material genético. É codificada pelo gene *asa1*, e em geral está presente na espécie *E. faecalis*, sendo este micro-organismo o principal isolado de alimentos e considerando a alta incidência de transferência de genes entre as espécies desse gênero, cada fator de virulência deve ser bem elucidado, como forma de auxiliar o tratamento das doenças causadas (EATON & GASSON, 2001; VANCKERCKOVEN *et al.*, 2004; FISHER & PHILLIPS, 2009; HÄLLGREN *et al.*, 2009).

A proteína, associada à virulência, descrita em espécies de enterococos foi a proteína extracelular de superfície (Esp) localizada na superfície da parede celular. Algumas variações em sua estrutura podem contribuir para a capacidade de amostras de *E. faecalis* em não serem detectadas pelo sistema imunológico do hospedeiro e persistirem nos sítios de infecção, como foi descrito por Shankar e colaboradores, em 1999. O gene *esp* possui 922 pares de base e é encontrado com frequência em isolados envolvidos com infecções. Esta proteína também contribui para a formação de biofilme por enterococos, tornando-os a resistente ao estresse do ambiente e permitindo a sua adesão a células eucarióticas (FOULQUIE MORENO *et al.*, 2006; FISHER & PHILLIPS, 2009). *E. faecalis* Esp-negativas após receberem por transferência plasmidial o gene codificante da proteína, se tornaram hábeis na produção da Esp (LATASA *et al.*, 2006). A presença deste gene tem sido atualmente detectada com frequência em linhagens de *E. faecium*, tanto sensíveis como resistentes à vancomicina com grande capacidade de formar biofilme (HARRINGTON *et al.*, 2003; TENDOLKAR *et al.*, 2004; BILLSTRÖM *et al.*, 2008).

Um gene codificando um antígeno dominante de aproximadamente 37kDa de *E. faecalis* (EfaA) foi previamente identificado por Lowe e colaboradores (1995), utilizando soro de um paciente com um quadro de endocardite. A sequência da proteína traduzida mostrou de 55 a 60% de homologia com proteínas de espécies de *Streptococcus*, conhecidas como adesinas. Devido a esta homologia, propuseram a hipótese de que a EfaA funcionaria como uma adesina nas endocardites. Estudos mais recentes sugerem que esta adesina funcione como um receptor solúvel de proteínas de ligação para o sistema de transporte de manganês nos *E. faecalis*, e que é responsável pela sobrevivência e crescimento da maioria dos micro-organismos (LOW *et al.*, 2003; ABRANTES *et al.*, 2011). Produção de EfaA por enterococos é comum e, em um estudo realizado por Eaton e Gasson (2001), o gene *efaA* foi detectado em todos os isolados de amostras médicas (sangue, pus, urina, fezes e do ambiente hospitalar) e em quase todos de amostras de alimentos (leite, carne e queijo).

A facilidade com que os enterococos adquirem, e transferem genes de resistência e/ou de virulência tem sido apontada como um importante fator de virulência destes micro-organismos. Em amostras multirresistentes (resistência a dois ou mais antimicrobianos diferentes), Murray (1998) descreveu três diferentes sistemas de conjugação, que podem ocorrer entre os micro-organismos do gênero, o principal sistema corresponde à transferência do plasmídeo conjugativo na presença de ferormônios e é altamente eficiente. Estes peptídeos também estão envolvidos na resposta inflamatória do hospedeiro (JETT, 1994; DUNNY & JHONSON, 2011).

A conjugação ferormônio-induzida consiste em uma comunicação intercelular, onde peptídeos sinais informam a células, que contém plasmídeos sobre a proximidade com potenciais células receptoras. Os plasmídeos ferormônio-induzidos fazem uso de uma combinação de produtos codificados pelos genes do hospedeiro e do plasmídeo, para sentir o ferormônio exógeno, e para subsequentemente ativar a expressão dos genes de transferência, permitindo a indução pelo ferormônio, que é codificada no cromossomo da célula hospedeira. Os ferormônios são pequenos peptídeos hidrofóbicos, que podem se ligar a componentes apolares da célula sem especificidade, portanto, requerendo exportação ativa para se dissociarem da célula. Embora uma célula única possa produzir inúmeros ferormônios, cada plasmídeo responde especificamente a um peptídeo cognato, com alta sensibilidade (DUNNY & LEONARD, 1997; DUNNY, ANTIPORTA & HIRT, 2001; CHANDLER & DUNNY, 2004).

Os níveis de regulação genética do sistema, ainda estão sendo estudados, os genes mais conhecidos são *cad*, *cpd* e *ccf*, já se sabe que eles compartilham um mecanismo similar de regulação, que parece ser único para os enterococos. Outro gene associado a produção de peptídeo-resposta, específico à transferência de plasmídeos contendo bacteriocinas, chamado *cob*, possui um sistema de regulação diferente dos demais, porém ainda não elucidado (NAKAYAMA *et al.*, 1995; CHANDLER & DUNNY, 2004; DUNNY & JHONSON, 2011).

O segundo sistema de conjugação envolve transferência de plasmídeos entre espécies diferentes de enterococos ou outros micro-organismos Gram positivos. E finalmente um terceiro tipo de troca genética pode ocorrer através de transposons conjugativos entre enterococos e micro-organismos de diferentes espécies bacterianas inclusive as Gram negativas.

Estudos atuais também têm comprovado que os enterococos, provenientes de diversas origens alimentares, podem expressar fatores de virulência, assim como os utilizados intencionalmente na produção de alimentos (ABRIOUEL *et al.*, 2008; GOMES *et al.*, 2008; VALENZUELA *et al.*, 2008; MARTÍN - PLATERO *et al.*, 2009; RUIZ – MOYANO *et al.*, 2010; VALENZUELA *et al.*, 2010).

1.4 SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

As infecções causadas por enterococos representam uma real ameaça à saúde humana, principalmente devido ao seu comportamento frente aos antimicrobianos de uso terapêutico. O gênero *Enterococcus* ganhou considerável importância como patógeno nosocomial, particularmente pelas características de resistência intrínseca e adquirida aos antimicrobianos mais comumente administrados nos tratamentos das infecções graves por Gram-positivos (SHEPARD & GILMORE, 2002; GILMORE & FERRETTI, 2003; BIAVASCO *et al.*, 2007; VIGNAROLI *et al.*, 2011).

A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno genético relacionado à existência de elementos, que codificam diferentes mecanismos bioquímicos, os quais de alguma maneira impedem a ação das drogas usadas no tratamento das infecções. A resistência pode ser originada por mutações ocorridas no material genético, mas também produto da importação

de genes causadores do fenômeno, envolvendo mecanismos de transformação e conjugação, frequentemente situados em plasmídeos e transposons.

Entre os mecanismos de resistência já elucidados, o mais importante, está relacionado aos glicopeptídeos, por serem os fármacos de escolha no tratamento de infecções enterocócicas graves. Enterococos vancomicina-resistentes (VRE) foram reportados inicialmente na década de 80, em alguns países da Europa. Desde então, eles tem sido relatados em várias partes do mundo. Nos anos 90, diferentes autores detectaram um aumento na prevalência de VRE em amostras de alimentos de origem animal e no meio ambiente (TORRES *et al.*, 1994; DEVRIESE *et al.*, 1996; ROBREDO *et al.*, 2000). Estudos sugerem que a cadeia alimentar pode ser um potencial veículo de transmissão dos VREs de animais para seres humanos (BATES *et al.*, 1994; BIAVASCO *et al.*, 2007; AGERSØ *et al.*, 2008). Dados sobre a ocorrência no Brasil foram apresentados inicialmente em Curitiba / PR (DALLA COSTA *et al.*, 1998), seguido por relatos em São Paulo / SP (ZANELLA *et al.*, 1999). Na cidade do Rio de Janeiro o primeiro relato de VRE ocorreu em 2000, envolvendo *E. faecalis* portador do gene van A (ALBUQUERQUE, 2001), sendo em todos estes casos, amostras de origem hospitalar.

No Brasil, poucos estudos investigaram a presença de VREs em alimentos. Entretanto, a emergência de enterococos com esse perfil, isolados de amostras clínicas e associado a surtos hospitalares, evidencia a necessidade de se pesquisar estes micro-organismos em outras fontes. O trabalho de Fracalanza e colaboradores (2007) analisou enterococos isolados de frango e leite pasteurizado, mas não foram encontrados micro-organismos com esse perfil. Já Ribold e colaboradores (2009), conseguiram isolar um VRE de queijo colonial.

1.5 PRESENÇA EM ALIMENTO

A natureza ubíqua dos enterococos faz com que seja comum seu isolamento de uma ampla variedade de alimentos, mesmo aqueles passam por processamentos na tecnologia de produção onde os micro-organismos presentes são submetidos à condições extremas de temperatura, pH e salinidade são passíveis de os apresentarem viáveis no final do processo (GIRAFFA, 2002; FOULQUIÉ-MORENO *et al.*, 2006).

A contaminação em alimentos de origem animal, pelos enterococos, pode ocorrer de duas maneiras: endógena, se as bactérias forem provenientes do próprio animal ou exógenas, quando provenientes do meio ambiente (solo, água, equipamentos e manipuladores), que tenham contato com o alimento em alguma fase de sua preparação distribuição e consumo. Entretanto, enquanto alguns estudos revelam a correlação entre os enterococos e a deterioração dos produtos, outros defendem o papel deste micro-organismo no desenvolvimento de características sensoriais especiais em produtos como: queijos, salames e produtos fermentados (FOULQUIÉ-MORENO *et al.*, 2006; GOMES *et al.*, 2008).

Os enterococos são frequentemente isolados de carne de gado, aves e carcaças de suínos procedentes de abatedouros (AARESTRUP *et al.*, 2002b; KLEIN *et al.*, 2003). Quando presentes nos alimentos crus, esses micro-organismos são capazes de sobreviver e de se multiplicar também durante alguns processos de conservação como, por exemplo, a pasteurização, a fermentação e a refrigeração (GIRAFFA *et al.*, 2002). Entretanto, a contaminação pelos enterococos ocorre não apenas em produtos cárneos crus, sendo frequentemente encontrados também em produtos cárneos processados, pois suas características de robustez, eles são capazes de permanecer como contaminantes até o produto final.

A presença dos enterococos no trato gastrointestinal de animais pode levar a contaminação da carne durante o processo de abate. As espécies pertencentes ao gênero, *E. faecalis* foi a predominantemente isolada de cortes de bovinos e suínos, enquanto *E. faecium* foi mais frequentemente envolvida com produtos embutidos. Em amostras de frangos coletadas de diferentes abatedouros, o coco Gram positivo predominante foi *E. faecalis* (STILES *et al.*, 1978; KNUDTSON AND HARTMAN, 1993; FRANZ *et al.*, 2003).

O isolamento dos enterococos em produtos lácteos pode ser considerado resultado de condições precárias de higiene durante a produção e o processamento do leite, assim como contaminação direta pelo animal e pelos manipuladores. Sua presença também pode ser associada indiretamente a fontes de água contaminadas, as carcaças dos animais, ao equipamento de processamento do leite e aos tanques de armazenagem. Entretanto, atualmente estes micro-organismos podem ser considerados como componentes normais da microbiota de alimentos lácteos e não só um indicador de pouca higiene (GELSOMINO *et al.*, 2001, 2002; GIRAFFA, 2002, REVIRIEGO *et al.*, 2005).

Os enterococos pertencem ao grupo de bactérias ácido-lácticas, importantes na tecnologia de produção de alimentos, devido as suas características bioquímicas, responsáveis pelo desenvolvimento de propriedades organolépticas específicas e para fazerem parte da maturação de uma grande variedade de carnes fermentadas e queijos. Elas também são capazes de tornar o produto seguro, do ponto de vista microbiológico, por competir com outros micro-organismos e por produzir antimicrobianos. A produção de substâncias antimicrobianas, que são frequentemente ativas contra alguns patógenos alimentares Gram positivos (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium botulinum*), é a razão para a inclusão desses micro-organismos como biopreservativos de alimentos, aumentando ainda mais o interesse da indústria e sua utilização no gênero alimentício (FRANZ *et al.*, 2007).

O uso de linhagens de enterococos como cultura starter (iniciadoras) que são colônias adicionadas a alguns produtos intencionalmente com controle metabólico e tecnológico, tem o intuito de desenvolver diferentes qualidades em determinados produtos. Isto se deve a capacidade desses micro-organismos em produzir ácido láctico, aumentar a atividade proteolítica e a presença de grupos amino livres, fornecendo sabor, aroma, cor e estrutura diferenciadas dos demais produtos (SUZZI *et al.*, 2000; SARANTINOPOULOS *et al.*, 2002).

1.6 AMINAS BIOGÊNICAS

Os compostos nitrogenados possuem uma importante função metabólica nas células, sendo essenciais para a formação das proteínas presentes no organismo humano. A degradação destes compostos através de enzimas ocorre naturalmente em seres humanos e esta reação dará origem às aminas biogênicas (AB). As AB são fonte de nitrogênio e precursoras para a síntese de hormônios, alcalóides, ácidos nucleicos e proteínas (SILLAS-SANTOS, 1996). Estas aminas também podem influenciar alguns processos biológicos no organismo humano como, por exemplo, a regulação da temperatura corporal, nutrição e aumento ou diminuição da pressão sanguínea (GREIF *et al.*, 1997).

As aminas biogênicas (AB) são moléculas orgânicas de baixo peso molecular, que podem causar efeitos fisiológicos indesejáveis como a estimulação nervosa e o aumento pressão sanguínea em seres humanos e animais, particularmente, quando consumido em

quantidades significativas ou, quando a capacidade dos seres humanos em oxidá-las esta reduzida. Também é conhecido o potencial dessas substâncias como precursoras das nitrosaminas carcinogênicas (LU *et al.*, 2010). Em alimentos, a produção de aminas biogênicas deriva principalmente da descarboxilação dos aminoácidos durante o processo de maturação, da degradação do alimento ou da transaminação dos aldeídos e cetonas, realizada por micro-organismos presentes no meio (HALÁSZ *et al.*, 1994).

Muitos gêneros bacterianos, incluindo os produtores de ácido láctico, são capazes de descarboxilar aminoácidos (MARCOBAL *et al.*, 2004; GARAI *et al.*, 2007). Entre as bactérias ácido-lácticas (BAL), amostras pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc*, são aptas à produção de aminas em vários alimentos como queijo, carnes fermentadas, vegetais e bebidas (MIAJALA, 1993; BOVER-CID & HOLZAPFEL, 1999; MORENO-ARRIBAS *et al.*, 2003).

De acordo com a estrutura química das aminas biogênicas, elas podem ser classificadas em alifáticas (putrescina, cadaverina, espermina e espermidina), aromáticas (tiramina e feniletilamina) ou heterocíclicas (histamina e triptamina). Recentemente, os genes relacionados à produção de AB foram identificados em bactérias ácido-lácticas. Foi demonstrado que essas vias de produção são dependentes da cepa, preferencialmente, espécie específica, sugerindo uma transferência horizontal dos genes em BAL (LUCAS *et al.*, 2005; MARCOBAL *et al.*, 2006a; COTON & COTON, 2009). As enzimas envolvidas nas vias de produção das aminas biogênicas podem ser codificadas por plasmídeos instáveis (LUCAS *et al.*, 2005; SATOMI *et al.*, 2008).

Muito embora os enterococos possuam características desejáveis e sejam utilizados amplamente na indústria de alimentos, estes micro-organismos são reconhecidos por serem também grandes produtores de aminas biogênicas (LEUSCHNER, KURIHARA & HAMMES, 1999; BOVER-CID *et al.*, 2001; MARCOBAL *et al.*, 2004). O consumo de alimentos com uma grande quantidade dessas aminas pode gerar consequências toxicológicas graves, principalmente quando há produção de tiramina e histamina, que são produzidas e degradadas como parte do metabolismo celular normal. Entretanto a ingestão de grandes quantidades dessas aminas biogênicas pode causar problemas conhecidos como vasoativos e psicoativos, incluindo dores de cabeça, náuseas, vermelhidão na face, dificuldade respiratória, suor excessivo, palpitações no coração, rash cutâneo, sensação de queimação na boca e hiper ou hipotensão (BRINK *et al.*, 1990; HALÁSZ *et al.*, 1994; SHALABY, 1996).

Histamina e tiramina têm sido as AB mais estudadas devido a suas implicações com envenenamento dos alimentos (SILLA SANTOS, 1996). A tiramina é formada pela ação enzimática da tirosina descarboxilase (TDC). Sendo esta uma potente vasoconstritora, pode induzir a hipertensão arterial, hemorragia cerebral e falhas na frequência cardíaca. No organismo de mamíferos, a tiramina é quebrada pela monoamina oxidase (MAO), entretanto o mecanismo de detoxificação em seres humanos, não é suficiente, quando o nível de ingestão é muito alto, quando os indivíduos são alérgicos ou em pacientes que consomem drogas que inibam a MAO (PEREIRA *et al.*, 2009).

A histamina está contida em mastócitos e em basófilos, seus efeitos são normalmente observados, quando esta em grande quantidade durante uma reação alérgica. Esta amina age como um neurotransmissor e um vasodilatador no sistema nervoso central e no sistema cardiovascular. Ela se liga aos receptores presentes na membrana das células do trato respiratório, cardiovascular, gastrointestinal, ao sistema imuno-hematológico e a pele. É considerada a agente responsável por alguns episódios de envenenamento alimentar, que se manifestam por reações alérgicas, caracterizadas pela dificuldade de respirar, prurido, erupção, vômito, febre e hipertensão. As pessoas que possuem o mecanismo de detoxificação das AB naturalmente deficientes por razões genéticas ou devido a inibição do mecanismo pelo uso de medicamentos (inibidores de monoamina oxidase) são mais susceptíveis ao envenenamento por histamina (HERNANDEZ-JOVER *et al.*, 1997; YONGMEI *et al.*, 2009; NAILA *et al.*, 2010).

A principal fonte de AB exógena é proveniente da alimentação, a quantidade e o tipo de aminas nos alimentos em geral, dependem da natureza, origem, etapas de processamento e micro-organismos presentes. Muitos países vêm realizando estudos para identificar alimentos que possam conter estes compostos, principalmente os que impactam a saúde e a economia. Produtos derivados de carnes, leites, principalmente quando fermentados são os mais prováveis de conterem AB, pois requerem a presença de micro-organismos potencialmente produtores de descarboxilase, concentrações adequadas de precursores de aminoácidos livres associado a fatores ambientais, que favorecem o crescimento microbiano e a síntese da descarboxilase (CURIEL *et al.*, 2011). A presença de BA em alimentos é consequência de um complexo equilíbrio entre sua composição e as atividades enzimáticas da população microbiana presente. Este fator deve ser então levado em consideração durante a escolha dos micro-organismos que serão utilizados no processo de fabricação dos alimentos.

Os limites toxicológicos são difíceis de serem estabelecidos devido a grande diferença entre as pessoas e a robustez de seu sistema de detoxificação. Entretanto concentrações acima de 100mg/Kg de alimento são supostamente deletérias, especialmente em consumidores pertencentes ao grupo de risco – tendo deficiência da MAO (SILLA-SANTOS, 1996). No Brasil há apenas uma legislação sobre concentrações máximas permitidas de histamina e ela regula somente pescados frescos e seus derivados (BRASIL, 1997). Embora essas regulamentações sejam válidas, elas apenas tratam da histamina, enquanto os alimentos podem carrear outras aminas biogênicas, tão perigosas quanto esta.

Outro problema relacionado a regulamentação é que a legislação existente apenas determina a concentração máxima de AB nos alimentos, porém não leva em consideração a presença de micro-organismos passíveis de produzirem enzimas descarboxilase no produto acabado. De acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 12 de 2001 (BRASIL) existe uma tolerância máxima da presença de algumas bactérias nos mais variados alimentos, quando os resultados analíticos estão dentro dos padrões descritos, os produtos são considerados como “em condição sanitária satisfatória” e liberados para consumo humano. Os parâmetros determinados por esta RDC permitem que muitos alimentos possam apresentar teores tóxicos de aminas biogênicas devido à presença, mesmo que pequena, de micro-organismos. Por isso faz-se necessária, no mínimo, a detecção dos genes, que codificam para AB em *Enterococcus* presentes nos alimentos.

1.7 BACTERIOCINAS

Os micro-organismos do gênero *Enterococcus* abrigam alguns traços ou peculiaridades biotecnológicas importantes, tais como, a habilidade em produzir bacteriocinas, que atuam inibindo o desenvolvimento de importantes patógenos, como *L. monocytogenes* e *S. aureus*, que representam sérios problemas para a Vigilância Sanitária (DE VUYST *et al.*, 1994; GIRAFFA *et al.*, 1997; HUGAS, 1998; LAUKOVA *et al.*, 1999). Essa característica é uma potencial alternativa ou complemento aos antibióticos convencionais utilizados no tratamento de infecções e na produção industrial (HAMMAMI *et al.*, 2010).

As enterocinas, bacteriocinas produzidas por enterococos, são proteínas e peptídeos sintetizados nos ribossomos, em sua maioria são moléculas catiônicas, hidrofílicas ou

ampifílicas, compostas de 20 a 60 aminoácidos e estão divididas em 3 classes (KLAENHAMMER *et al.*, 1993; NES *et al.*, 1996; COTTER *et al.*, 2005; FRANZ *et al.*, 2007).

A classe I é composta pelos lantibióticos, pequenos peptídeos (5kDa) membrana ativados, termoestáveis, hidrofóbicos, alterados pós-traducionalmente, e que contém aminoácidos incomuns em sua formação, lantionina e metilantionina. São subdivididas em dois tipos, de acordo com sua estrutura: tipo A, inclui moléculas flexíveis e alongadas que tem carga positiva, atuando na despolarização da membrana, a nisina, produzida por *Lactococcus lactis* é a principal representante do grupo. O tipo B corresponde às moléculas globulares, que atuam interferindo nas reações enzimáticas celulares de outras bactérias Gram-positivas (SAHL & BIERBAUM, 1998).

Bacteriocinas de classe II são peptídeos pequenos, hidrofóbicos, termoestáveis, porém não sofrem modificações após a tradução, este grupo pode ser dividido em 3 subclasses: IIa ou tipo pediocina, que apresenta um forte efeito anti-listeria e possui uma sequência de consenso em sua região N-terminal (YGNGV); IIb são os que precisam de duas cadeias de polipeptídios para plena atividade; IIc são as que não pertencem aos outros subgrupos, incluído as bacteriocinas sec-dependentes.

A classe III corresponde às grandes proteínas, hidrofílicas e termolábeis, estas bacteriocinas possuem diferentes domínios estruturais com funções de translocação, receptor de ligações e atividade letal. A enterolisina A, produzida por enterococos, pertence a esta classe (NIELSEN, NES & HOLO, 2003; FOULQUIÉ MORENO *et al.*, 2006, ALVAREZ-CISNEROS *et al.*, 2010).

Uma quarta classe de bacteriocinas complexas, que requerem carboidratos ou lipídios para sua ativação, foi sugerida por Klaenhammer (1993); entretanto, elas não foram adequadamente caracterizadas quanto sua forma bioquímica e, portanto, ainda não é reconhecida pelos pesquisadores.

Com a descoberta das bacteriocinas, o uso dos enterococos como culturas iniciadoras ou co-culturas tem sido estudado por inúmeros pesquisadores, não só para o desenvolvimento de propriedades organolépticas, mas também por seu efeito sobre patógenos de alimentos (GIRAFFA, 2003). Desde 1955, quando a primeira substância semelhante a bacteriocina dentro do grupo D dos *Streptococcus* foi descrita (KJEMS, 1955), uma enorme quantidade de enterocinas tem sido descobertas. A primeira enterocina purificada homoganeamente foi a

AS-48, produzida por cepa de *E. faecalis* (GÁLVEZ *et al.*, 1989; MARTÍNEZ-BUENO *et al.*, 1994) e desde então, o número de novas enterocinas caracterizadas tem aumentado potencialmente (HAMMAMI *et al.*, 2010).

As enterocinas melhor caracterizadas foram descritas em amostras originárias de alimentos. Isto inclui as de classe II, enterocina A, B, P e bacteriocina 31. As principais bacteriocinas produzidas por micro-organismos isolados de amostras clínicas foram a AS-48 e a citolisina. De uma maneira interessante, seu fenótipo está frequentemente associado com plasmídeos conjugativos ferormônio-induzível, como no caso da bacteriocina 31, da citolisina e da AS-48 (DU TOIT *et al.*, 2000).

A primeira bacteriocina de classe III descrita, produzida por enterococos, foi a enterolisina A, cuja ação está relacionada a degradação da parede celular de bactérias sensíveis (NIELSEN, NES & HOLO, 2003). O estudo realizado por Sanchez e colaboradores, em 2007, conseguiu purificar um novo peptídeo, determinar sua sequência nucleotídica e a expressão heteróloga sec-dependente. Esta enterocina foi produzida por uma cepa de *E. hirae* e chamado de hiracinaJM79. Em 2010, um estudo revelou uma nova bacteriocina da subclasse IIa, caracterizada bioquimicamente e geneticamente, advindas de *E. avium* (BIRRI *et al.*, 2010).

Várias espécies de enterococos associadas com a cadeia alimentar, principalmente de *E. faecalis* e *E. faecium*, são capazes de produzir uma variedade de enterocinas, com atividade contra os principais patógenos dos alimentos: *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Clostridium* ssp. e *Vibrio cholerae*, além de pertencerem a classe II (pequenos peptídeos termoestáveis). Estas propriedades tornam as enterocinas potenciais substâncias a serem utilizadas como biopreservativos na produção de alimentos (GIRAFFA, 2003).

1.8 TÉCNICAS MOLECULARES

Tradicionalmente, a detecção e a identificação de bactérias eram realizadas baseadas nos principais meios de obtenção de carbono e energia, das exigências nutricionais e dos meios de cultivo para seu crescimento, além da observação direta ao microscópio. Entretanto, a utilização dessas metodologias fornecia informações limitadas com necessidades de maiores

especificidades. Foram então desenvolvidas outras metodologias, dentre as quais se destacam, principalmente, aquelas baseadas nos ácidos nucleicos (JUNIOR *et al.*, 2002).

O uso de ferramentas moleculares para detecção precoce e rápida de micro-organismos indesejados, principalmente nos alimentos, tem sido objeto de vários estudos já publicados. Esses métodos são acurados e confiáveis, usam vários genes alvo sendo possível identificar e/ou quantificar todas as bactérias envolvidas. As técnicas da PCR e de hibridização DNA são as metodologias mais importantes, devido as suas vantagens como: rapidez, sensibilidade, simplicidade e especificidade na detecção dos genes alvo. A biologia molecular acelera a obtenção de resultados e permite a introdução antecipada de medidas de controle para evitar o desenvolvimento dos micro-organismos presentes (COTON & COTON, 2005; MARCOBAL *et al.*, 2006b; LADERO *et al.*, 2008).

A técnica molecular mais conhecida, PCR (*Polimerase Chain Reaction*), consiste na amplificação enzimática “in vitro” de fragmentos específicos de DNA, utilizando 2 iniciadores, que se hibridizam com as fitas opostas, em regiões que flanqueiam o segmento a ser amplificado. Isto acontece em progressão geométrica, visando à produção de milhões de cópias desta sequência. A aplicação dessa técnica para identificação da presença/ausência de genes, quando bem desenvolvida e validada, possui os resultados mais confiáveis (SETTANNI *et al.*, 2005).

A detecção de diferentes genes alvo em uma única reação simultaneamente, foi descrita em 1988 por Chamberlain e colaboradores, chamada de Multiplex PCR, a técnica desenvolvida tem o mesmo princípio da PCR simples, porém são incluídos na reação vários pares de iniciadores para os diferentes genes alvos. Para garantir a especificidade do sistema (um alvo por par de iniciador), é fundamental, que o iniciador desenhado seja maior que o utilizado no monoplex PCR e possua alta temperatura de anelamento. A confiabilidade da multiplex PCR é baseada na acessibilidade do DNA das espécies de interesse.

Os métodos moleculares são altamente específicos e seus resultados são fáceis de interpretar quando comparados com os métodos convencionais, o que os torna os mais indicados para a análise dos micro-organismos presentes nos alimentos.

1.9 IMPORTÂNCIA SANITÁRIA

Nas duas últimas décadas, os enterococos vêm adquirindo destacada relevância entre os micro-organismos, mais comumente envolvidos em infecções hospitalares de difícil tratamento, devido particularmente ao seu comportamento frente aos antimicrobianos usados no tratamento, além da facilidade que possuem na aquisição e disseminação de seus fatores de virulência. A possibilidade de que essas bactérias sejam veiculadas através da cadeia alimentar as coloca como objeto de grande atenção da Saúde Pública.

O artigo nº 196 da Constituição Federal de 1988 coloca a saúde como direito de todos e dever do Estado, garantido mediante políticas sociais e econômicas, que visem à redução do risco de doenças e de outros agravos e ao acesso universal e igualitário às ações e serviços para a sua promoção, proteção e recuperação. Assim como o artigo nº 197, que dispõe sobre a relevância pública das ações e serviços de saúde, cabendo ao Poder Público dispor, nos termos da lei sobre sua regulamentação, fiscalização e controle, devendo sua execução ser feita diretamente ou através de terceiros e, também, por pessoa física ou jurídica de direito privado (Brasil, 1988).

É importante considerar o dever do Estado perante a situação da saúde de sua população. Para que o disposto na Constituição Federal tivesse valor, foi criada uma lei para regulamentação, em todo território nacional, das ações e serviços de saúde, a Lei 8080, de 19 de setembro de 1990. Em seu artigo 3º está definido como fatores determinantes e condicionantes da saúde, entre outros, a alimentação, a moradia, o saneamento básico, o meio ambiente, o trabalho, a renda, a educação, o transporte, o lazer e o acesso aos bens e serviços essenciais; os níveis de saúde da população expressam a organização social e econômica do País (Brasil, 1990).

Sendo assim, conforme descrito no artigo nº 6, inciso I da lei 8080/90, estão incluídas no escopo de ação do Sistema Único de Saúde (SUS) a Vigilância Sanitária e a epidemiológica, e determinado pelo inciso VIII, a fiscalização e inspeção de alimentos, água e bebidas para o consumo humano.

Em 1999, com a necessidade de inspecionar e fiscalizar o cumprimento do que foi determinado, é sancionada a Lei 9782, de 26 de janeiro de 1999 do Senado Federal, que em seu artigo 3º cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária e no artigo 8º a incumbe de regulamentar, controlar e fiscalizar os produtos e serviços que envolvam risco à saúde

pública. Entre os produtos descritos na lei podemos citar: alimentos, inclusive bebidas, águas envasadas, seus insumos, suas embalagens, aditivos alimentares, limites de contaminantes orgânicos, resíduos de agrotóxicos e de medicamentos veterinários (Brasil, 1999).

A busca pela qualidade dos alimentos consumidos pela população não é resultado de ações recentes, em 1969, através do Decreto-Lei 986, o governo instituiu normas básicas para a defesa e a proteção da saúde individual ou coletiva, no tocante a alimentos, desde a sua obtenção até o seu consumo. Assim como o Ministério da saúde aprovou a Portaria N° 1428, em 26 de novembro de 1993, que dispõe o Regulamento Técnico para Inspeção Sanitária de Alimentos, Diretrizes para o estabelecimento de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e de Prestação de Serviços na Área de Alimentos, e o Regulamento Técnico para Estabelecimento de Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) para Produtos na Área de Alimentos.

Baseada no Código Internacional Recomendado de Práticas: Princípios Gerais de Higiene dos Alimentos CAC/VOL. A, Rev. 4 (1969), do Codex Alimentarius, e harmonizada no Mercosul, a Portaria n°. 326, de 1997 estabelece os requisitos gerais sobre as condições higiênico-sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos. Em 2002, a RDC n°. 275 foi desenvolvida com o propósito de atualizar a legislação geral, introduzindo o controle contínuo das BPF, além de promover a harmonização das ações de inspeção sanitária por meio de instrumento genérico de verificação das BPF.

Todas as medidas descritas acima estabelecem padrões de qualidade para os alimentos de forma abrangente, porém em 2001 foi implementada a resolução da diretoria colegiada (RDC) N° 12 considerando a definição de critérios e padrões microbiológicos para alimentos, indispensáveis para a avaliação das Boas Práticas de Produção de Alimentos e Prestação de Serviços, da aplicação do Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC/HACCP) e da qualidade microbiológica dos produtos alimentícios, incluindo a elucidação de Doença Transmitida por Alimentos (Brasil, 2001). Atualmente, com a modificação dos perfis microbianos e as novas técnicas de análise faz-se necessária uma revisão desta resolução.

A presença de micro-organismos patogênicos nos alimentos é resultante de uma complexa interação de fatores, que envolvem os patógenos e o alimento que irá veiculá-lo, que podem atuar para amplificar ou atenuar a contaminação e os níveis de multiplicação destes micro-organismos. Entre esses fatores pode-se citar o processamento, a distribuição, o

consumo e a imunidade da população. Portanto para garantir segurança microbiológica aos alimentos, deve-se atuar em todas as fases, minimizando os níveis iniciais de contaminação, prevenindo ou limitando o potencial de multiplicação e eliminando os micro-organismos indesejáveis (Nero, 2005).

OBJETIVOS

2. OBJETIVO GERAL

Caracterizar genotipicamente, quanto à presença de genes de virulência, da enzima descarboxilase e avaliar a produção de atividade antimicrobiana em amostras de *Enterococcus* spp. isoladas a partir de alimentos.

Objetivos específicos:

- Verificar a presença de genes marcadores de virulência nos micro-organismos isolados (*agg*, *cad*, *ccf*, *cob*, *cpd*, *cylA*, *cylB*, *cylM*, *efaAfm*, *efaAfs* e *gelE*)
- Analisar a presença de genes, que codificam a produção da enzima descarboxilase (*hdc* e *tyrdc*), formadora das aminas biogênicas.
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos *Enterococcus* spp. por teste de difusão.
- Identificar presença de genes codificantes de bacteriocinas para amostras com atividade antimicrobiana (Avicina A, AS48, Bacteriocina 31, Enterocina A, Enterocina B, Enterocina P, Enterocina Q, Hiracina JM79).

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras bacterianas foram obtidas por Fracalanza (2007), a partir de 50 matrizes de alimentos sendo: 25 de carne de frango crua e 25 de leite pasteurizado dos tipos B, C e desnatado foram coletados aleatoriamente na cidade do Rio de Janeiro/RJ, no período de outubro de 2002 a outubro de 2005. Foram processados para análise microbiológica, segundo a metodologia preconizada por Andrews & June (1998). Os micro-organismos isolados foram identificados fenotipicamente e então, foram estocados em criotubos contendo 2,0 mL da solução de Skim Milk (Difco) a 10%, glicerol (Merck) a 10% (v/v) a -70° C. Estas amostras foram submetidas aos testes fisiológicos convencionais com base nas recomendações de Facklam e colaboradores (1999), para identificação quanto ao gênero, que incluíram: observação das características morfo-tintoriais em esfregaços corados pelo método de Gram, produção da catalase, hidrólise da esculina em presença de bile, crescimento 35 em presença de 6,5% de NaCl, hidrólise do L-pirroglutamil- β -naftilamida (teste do PYR) e hidrólise da L-leucina- β -naftilamida (teste do LAP). Quando as amostras bacterianas apresentaram-se como pertencentes, presuntivamente, ao gênero *Enterococcus* foram submetidas ao esquema para identificação dos microrganismos quanto à espécie, segundo recomendações de Carvalho, Teixeira & Facklam (1998) e Teixeira & Facklam (2003).

Fracalanza (2007) avaliou a susceptibilidade aos antimicrobianos através da utilização do teste de difusão em ágar, conforme recomendações do Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI M2-A9, 2006a; CLSI – M100 – S16, 2006b). Os seguintes antimicrobianos foram testados: Ampicilina-AM (10 μ g), Ciprofloxacina-CI (5 μ g) (5 μ g), Cloranfenicol-CO (30 μ g), Eritromicina-ER (15 μ g), Estreptomicina-ES (300 μ g), Gentamicina-GE (120 μ g), Imipenem-IM (10 μ g), Linezolida-LN (30 μ g), Nitrofurantoina-NI (30 μ g), Norfloxacina-NO (10 μ g), Penicilina-PE (10 μ g), Tetraciclina-TT (30 μ g), Teicoplanina-TE (30 μ g) e Vancomicina-VA (30 μ g). Foi também realizada a detecção dos genes codificadores de resistência à vancomicina, à tetraciclina, à eritromicina e a níveis elevados de aminoglicosídeos.

Foram selecionadas, para nosso trabalho, 63 amostras das 294 isoladas e previamente identificadas no trabalho citado (FRACALANZZA, 2007), sendo considerados para nossa escolha, os perfis de resistência aos antimicrobianos testados, sendo: 30 (47,5%) multirresistentes (possuíam dois ou mais genes de resistência detectados), 18 (27,9%) com resistência intermediária (concentrações inibitórias do agente antimicrobiano que se aproximam de níveis sanguíneos e tissulares atingíveis e para os quais as taxas de resposta podem ser inferiores àquelas para isolados sensíveis) e 15 (24,6%) sensíveis (não foram detectados genes de resistência). As amostras pertenciam tanto a carne frango quanto ao leite, totalizando 52 (82%) e 11 (18%) respectivamente. Estes micro-organismos pertencem as seguintes espécies e 36 *E. faecalis*, 14 a *E. casseliflavus*, quatro a *E. gilvus*, quatro a *E. faecium*, três a *E. durans*, uma a *E. gallinarum* e 1 a *E. hirae*.

3.1.1 Recuperação das amostras

A recuperação das amostras bacterianas foi realizada a partir da inoculação em caldo BHI, com posterior incubação a 37° C durante 24h. O crescimento obtido foi repicado em placas de Petri contendo ágar BHI (Brain Heart Infusion Broth; Becton Dickinson Microbiology Systems). As colônias formadas foram utilizadas em uma identificação fenotípica simples, apenas para confirmação e verificação de possíveis contaminações.

3.2 IDENTIFICAÇÃO CONFIRMATÓRIA

As amostras bacterianas foram submetidas aos testes fisiológicos convencionais com base nas recomendações de Facklam, Sahn & Teixeira (1999), para identificação quanto ao gênero, que incluíam: observação das características morfo-tintoriais em esfregaços corados pelo método de Gram, produção da catalase, hidrólise da esculina em presença de bile. Como controle para os testes realizados foi utilizada cepa de referência *E. faecalis* SS1273.

3.2.1 Características morfo-tintoriais

Foram produzidas, a partir do crescimento do micro-organismo em ágar BHI, incubado a 37° C durante 24h, suspensões em salina fisiológica (NaCl 0,85%) com as quais foi preparado esfregaço em lâminas de vidro. Após coloração pelo método de Gram as

características morfo-tintoriais das células foram observadas ao microscópio óptico. As amostras bacterianas caracterizadas como cocos Gram-positivos, aos pares, isolados ou em pequenas cadeias foram, então, submetidas ao teste da catalase objetivando a caracterização presuntiva do gênero *Enterococcus*.

3.2.2 Produção da enzima catalase

A observação da produção da enzima catalase foi verificada pela metodologia convencional, em lâmina de vidro. A partir de um crescimento recente (18 a 24h a 37°C) em BHI, uma suspensão espessa do micro-organismo depositada sobre uma gota de peróxido de hidrogênio [H₂O₂ a 3% (v/v)]. A ausência de formação de bolhas, que são resultantes da hidrólise da H₂O₂ pela ação da enzima catalase, é indicativa de reação negativa característica dos enterococos.

3.2.3 Hidrólise da esculina em presença de bile

Todas as amostras foram inoculadas em meio para isolamento de *Enterococcus* (Enterococose agar – Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, USA). O teste foi considerado positivo, quando houve crescimento acompanhado de enegrecimento do meio resultante da hidrólise da esculina formando esuletina. Após o período de incubação as colônias com coloração negra, foram repicadas para meio BHI (Brain Heart Infusion Broth; Becton Dickinson Microbiology Systems), permitindo seu crescimento sem a presença de possíveis inibidores.

3.2.4 Armazenamento das amostras

Para todas as amostras com a identificação confirmada, foram preparadas suspensões espessas do micro-organismo em criotubos, contendo 2,0 mL da solução de Skim Milk (Difco) a 10%, glicerol (Merck) a 10% (v/v) e conservadas em freezer a -20° C. Estas amostras foram utilizadas durante todo o trabalho, para a realização dos testes a seguir.

3.3 EXTRAÇÃO DO DNA

As amostras bacterianas utilizadas foram inoculadas em caldo BHI e incubadas em estufa a 37°C por 24h. O DNA total das amostras foi obtido a partir deste crescimento realizou-se a extração do DNA, seguindo-se as recomendações do fabricante do kit DNA mini (Qiagen, Hilden, Germany).

3.4 DETECÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA

Para detecção dos genes associados à virulência de *Enterococcus spp.* foi utilizada a metodologia de PCR, conforme Ruiz-Moyano e colaboradores (2010). Foram utilizadas as seguintes cepas como controle positivo e negativo respectivamente, *E. faecalis* ATCC 29212 e *E. faecium* ATCC 19434.

A reação teve 50µl de volume, que continham a mistura de 1,5 mM de MgCl₂, 0,4 µM do primer para cada um dos genes testados separadamente (tabela 1), 200 µM de dNTP, tampão da enzima 10X, 2U de Platinum® Taq DNA polimerase (Invitrogen, Brasil) e 5 µg do DNA. As amostras foram submetidas a um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, anelamento a temperatura apropriada (tabela 1) por 2 minutos e extensão a 72°C por 2 minutos, seguido por 29 ciclos de desnaturação a 92°C por 15 segundos, anelamento a temperatura apropriada (tabela 1) por 15 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. O termociclador utilizado para a amplificação foi PTC 200 (*Peltier Thermal Cycler, MJ Research*).

Os amplicons foram visualizados em transiluminador (UVP- Dual-Intensity Transilluminator), sob luz UV, após eletroforese em gel de agarose (Type I-A/Agargen) a 1% durante 1 h sob corrente constante de 90V. O tampão utilizado na corrida eletroforética foi TBE 1X [Tris base (Sigma) 0,2M, ácido bórico (Sigma) 0,2M e EDTA (Sigma) 0,5M (pH 8,0)]. Os géis foram corados com brometo de etídio 0,5mg/mL durante 10 minutos, e posteriormente, capturados utilizando o fotodocumentador L-Pix EX (Loccus do Brasil LTDA., São Paulo, Brasil).

Tabela 1 - Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação, tamanho do produto e temperatura de anelamento.

| Gene | Fatores de virulência | Iniciador | Produto (pb) | Referencia |
|---------------|---|---|--------------|----------------------|
| <i>agg</i> | Substância de agregação | TE32 GTTGTTTTAGCAATGGGGTAT TE33 CACTACTTGTAATTCATAGA | 1210 | Eaton e Gasson, 2001 |
| <i>cad</i> | Ferormônio | TE42a TGCTTTGTCATTGACAATCCG TE43a ACTTTTTCCCAACCCCTCAA | 1299 | Eaton e Gasson, 2001 |
| <i>ccf</i> | Ferormônio | TE53 GGGAATTGAGTAGTGAAGAAG TE54 AGCCGCTAAAATCGGTAAAAT | 543 | Eaton e Gasson, 2001 |
| <i>cob</i> | Ferormônio | TE49 AACATTCAGCAAACAAAGC TE50 TTGTCATAAAGAGTGGTCAT | 1405 | Eaton e Gasson, 2001 |
| <i>cpd</i> | Ferormônio | TE51 TGGTGGGTTATTTTTCAATTC TE52 TACGGCTCTGGCTTACTA | 782 | Eaton e Gasson, 2001 |
| <i>cylA</i> | Ativação da citolisina | TE17 TGGATGATAGTGATAGGAAGT TE18 TCTACAGTAAATCTTTTCGTCA | 517 | Eaton e Gasson, 2001 |
| <i>cylB</i> | Transporte da citolisina | TE15 ATTCCTACCTATGTTCTGTTA TE16 AATAAACTCTTCTTTTCCAAC | 843 | Eaton e Gasson, 2001 |
| <i>cylM</i> | Modificação pós-traducional da citolisina | TE13 CTGATGGAAAGAAGATAGTAT TE14 TGAGTTGGTCTGATTACATTT | 742 | Eaton e Gasson, 2001 |
| <i>efaAfm</i> | Adesinas de parede <i>E. faecium</i> | TE37 AACAGATCCGCATGAATA TE38 CATTTCATCATCTGATAGTA | 735 | Eaton e Gasson, 2001 |
| <i>efaAfs</i> | Adesinas de parede <i>E. faecalis</i> | TE5 GACAGACCCTCACGAATA TE6 AGTTCATCATGCTGTAGTA | 705 | Eaton e Gasson, 2001 |
| <i>gelE</i> | Gelatinase | TE9 ACCCCGTATCATTGGTTT TE10 ACGCATTGCTTTTCCATC | 419 | Eaton e Gasson, 2001 |

3.5 DETECÇÃO DOS GENES DA DESCARBOXILASE

Foi realizado multiplex-PCR para amplificação dos genes que codificam para a aminoácido descarboxilase segundo descrito por Coton *et al.* (2004) e Coton e Coton (2005).

O método para a detecção dos genes *hdc* e *tyrdc* combina dois pares de iniciadores (descritos na tabela 2). Foram utilizadas as seguintes cepas como controle positivo e negativo respectivamente, *E. faecalis* ATCC 29212 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

A reação teve 50µl de volume, que continham a mistura de 1,5 mM de MgCl₂, 0,4 µM de cada primer (tabela 2), 200 µM de dNTP, tampão da enzima 10X, 1U de Platinum® Taq DNA polimerase (Invitrogen, Brasil) e 5 µg do DNA. As amostras foram submetidas a uma fase de desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido por 32 ciclos de desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 52°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e 15 segundos, e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. O termociclador utilizado para a amplificação foi PTC 200 (*Peltier Thermal Cycler, MJ Research*).

Os amplicons foram visualizados em transiluminador (UVP- Dual-Intensity Transilluminator), sob luz UV, após eletroforese em gel de agarose (Type I-A/Agargen) a 1% durante 1 h sob corrente constante de 90V. O tampão utilizado na corrida eletroforética foi TBE 1X [Tris base (Sigma) 0,2M, ácido bórico (Sigma) 0,2M e EDTA (Sigma) 0,5M (pH 8,0)]. Os géis foram corados com brometo de etídio 0,5mg/mL durante 10 minutos, e posteriormente, capturados utilizando o fotodocumentador L-Pix EX (Loccus do Brasil LTDA., São Paulo, Brasil).

Tabela 2 – Sequência dos iniciadores utilizados e tamanho do produto.

| Gene | Enzima | Iniciador | Produto (pb) | Referência |
|--------------|-----------|--|--------------|---------------------------|
| <i>hdc</i> | Histamina | HDC3 GATGGTATTGTTTCKTATGA HDC4 CAAACACCAGCATCTTC | 440 | Coton <i>et al.</i> ,2004 |
| <i>tyrdc</i> | Tiramina | TD2 ACATAGTCAACCATRTTGAA TD5 CAAATGGAAGAAGAAGTAGG | 1100 | Coton <i>et al.</i> ,2004 |

3.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A avaliação da produção da atividade antimicrobiana pelos enterococos foi realizada através da utilização do teste de difusão em ágar, conforme descrito por Ammor e colaboradores (2006) e segundo as recomendações da farmacopéia brasileira (BRASIL,

2010). Foram utilizados no teste as espécies: *Lactococcus lactis* ATCC 11454 como controle positivo e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ATCC 14365 como controle negativo.

Os micro-organismos contra os quais os enterococos foram testados são considerados os principais patógenos alimentares: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e *Salmonella enterica* ATCC 10708.

3.6.1 Preparo dos micro-organismos utilizados

As amostras bacterianas (enterococos) e os patógenos utilizados foram crescidos em 10 mL de caldo BHI a 37° C durante 24h, antes do preparo das placas.

3.6.2 Preparo das placas

Para a confecção das placas utilizadas nos testes foi produzido meio BHI em duas diferentes concentrações de ágar, que perfizeram duas camadas na placa. A primeira com 15 mL de ágar BHI (1,5% de ágar) foi preparada pela distribuição do ágar uniformemente, colocadas em superfície nivelada para que a camada de meio tenha uniformidade correta. Após sua solidificação, ponteiros de 1000 µL foram equilibradas sobre o ágar com a parte superior para baixo, de maneira que formassem entre si ângulo de 60° e com raio de 2,8 cm.

No preparo da segunda camada - superfície, adicionamos ao volume de 10 ml do meio ágar BHI (0,75% de ágar), que foi fundido e resfriado entre 46°C e 48°C, 20µL (0,2 mL/100 mL) de inóculo do patógeno determinado. Os tubos foram agitados, por rotação, para obter suspensão homogênea e adicionamos o meio inoculado em cada placa de Petri, contendo a camada base e as ponteiros. Após solidificação da camada superior de ágar, as ponteiros foram cuidadosamente removidas para deixar os poços de 5 mm de diâmetro (figura 1). A disposição das ponteiros permitiu a formação de 6 poços por placa.

3.6.3 Teste para atividade antimicrobiana

Foram aplicados nos poços 15 µL do cultivo das amostras a serem testadas quanto à produção de bacteriocina. Dos seis poços presentes na placa, dois continham os controles positivo e negativo do teste, nos quatro restantes foram aplicadas diferentes amostras de enterococos. As placas foram cuidadosamente fechadas e envolvidas com parafilme, para então serem incubadas a 30°C por 24 h. Todo o teste foi feito em triplicata para confirmação dos resultados. Após o período de incubação as placas foram examinadas, para verificar a formação de zonas de inibição, sem crescimento microbiano. A atividade antimicrobiana foi

dada como negativa quando não houve halo de inibição em volta do poço e positiva se além do halo as réplicas também apresentassem o mesmo resultado. Cada atividade antagonista foi relacionada com o diâmetro (mm) da zona de inibição exibida (figura 2).

Figura 1 – Imagem ilustrativa da montagem das placas do teste atividade antimicrobiana.

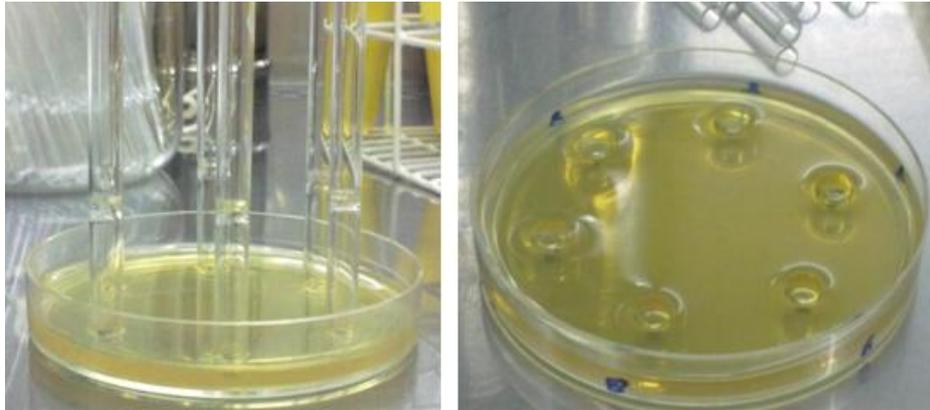
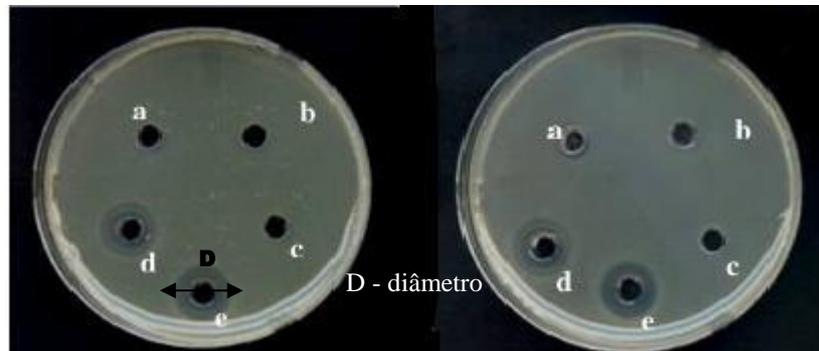


Figura 2 - Imagem ilustrativa do resultado do teste de atividade antimicrobiana.



Fonte: Naghmouchi, *et al.*, 2007

3.7 AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DE ENTEROCINAS

Para a amplificação dos genes das enterocinas foi realizada a técnica da PCR segundo Valenzuela e colaboradores (2010). O DNA dos enterococos utilizados para este teste correspondeu aos que apresentaram resultado positivo no teste de atividade antimicrobiana (3.6.3).

A reação teve 50µl de volume, que continham a mistura de 1,5 mM de MgCl₂, 0,5 µM do primer para cada um dos genes testados separadamente (tabela 3), 200 µM de dNTP, tampão da enzima 10X, 1U de Platinum® Taq DNA polimerase (Invitrogen, Brasil) e 5 µg do DNA. As amostras foram submetidas a uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 92°C por 1 minuto, anelamento a temperatura apropriada (tabela 3) por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. O termociclador utilizado para a amplificação foi PTC 200 (*Peltier Thermal Cycler, MJ Research*).

Os amplicons foram visualizados em transiluminador (UVP- Dual-Intensity Transilluminator), sob luz UV, após eletroforese em gel de agarose (Type I-A/Agargen) a 1% durante 1 h sob corrente constante de 90V. O tampão utilizado na corrida eletroforética foi TBE 1X [Tris base (Sigma) 0,2M, ácido bórico (Sigma) 0,2M e EDTA (Sigma) 0,5M (pH 8,0)]. Os géis foram corados com brometo de etídio 0,5mg/mL durante 10 minutos, e posteriormente, capturados utilizando o fotodocumentador L-Pix EX (Loccus do Brasil LTDA., São Paulo, Brasil).

Tabela 3 - Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação e temperatura de anelamento.

| Enterocinas | Iniciador | Anelamento (°C) | Referência |
|-----------------------|---|-----------------|------------------------------|
| Avicina A | AvFwr: ACNTAYTAYGGNAAYGGNGT AvRev: GCNCCNCCNGTNGCNARRTTNGC | 64 | Birri <i>et al.</i> , 2009 |
| AS48 | A48f:GAGGAGTTTCATGATTTAAAGA A48r: CATATTGTTAAATTACCAAGCAA | 53 | Du Toit <i>et al.</i> (2000) |
| Bacteriocin 31 | B31f:TATTACGGAAATGGTTTATATTGT B31r: TCTAGGAGCCCAAGGGCC | 58 | Du Toit <i>et al.</i> (2000) |
| Enterocina A | EcAf: AAATATTATGGAAATGGAGTGTAT EcAr: GCACTTCCCTGGAATTGCTC | 57 | Du Toit <i>et al.</i> (2000) |
| Enterocina P | EcPf:TATGGTAATGGTGTATTGTAAT EcPr: ATGTCCCATACCTGCCAAAC | 56 | Du Toit <i>et al.</i> (2000) |
| Enterocina B | EcBf: GAAAATGATCACAGAATGCCTA EcBr: GTTGCATTTAGAGTATACATTTG | 54 | Du Toit <i>et al.</i> (2000) |
| Enterolisina A | EntIA3: GGACAACAATTCGGGAACACT EntIA9: GCCAAGTAAAGGTAGAATAAA | 56 | Nilsen (1999) |
| Hiracina JM79 | HirAf: TGAATTCAAACACTTTTTATGACG HirAr: TGGGACTGATGAATCAGAATTG | 59 | Sánchez <i>et al.</i> , 2007 |
| Enterocina Q | EcQf: ATGAATTTTCTTCTTAAAAATGGTATCGCA EcQr: TTAACAAGAAATTTTTTCCCATGGCAA | 65 | Citti <i>et al.</i> , 2002 |

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 IDENTIFICAÇÃO CONFIRMATÓRIA

Quanto à identificação prévia das espécies utilizamos 36 *E. faecalis*, 14 a *E. casseliflavus*, quatro a *E. gilvus*, quatro a *E. faecium*, três a *E. durans*, uma a *E. gallinarum* e 1 a *E. hirae*. Todos os dados obtidos estão compilados na tabela 4. Todas as amostras analisadas foram confirmadas como pertencentes ao gênero *Enterococcus*, sendo cocos Gram-positivos, catalase negativos, capazes de hidrolisar a bile em presença de esculina.

Tabela 4 - Distribuição das espécies e fontes de isolamento entre *Enterococcus*.

| Espécies | Número de amostras/Fontes de isolamento | | |
|-------------------------|---|-------|-------|
| | Carne de Frango | Leite | Total |
| <i>E. faecalis</i> | 28 | 8 | 36 |
| <i>E. casseliflavus</i> | 13 | 1 | 14 |
| <i>E. faecium</i> | 4 | 0 | 4 |
| <i>E. gilvus</i> | 4 | 0 | 4 |
| <i>E. durans</i> | 1 | 2 | 3 |
| <i>E. gallinarum</i> | 1 | 0 | 1 |
| <i>E. hirae</i> | 1 | 0 | 1 |
| Total de amostras | 52 | 11 | 63 |

Fonte: Fracalanza (2007)

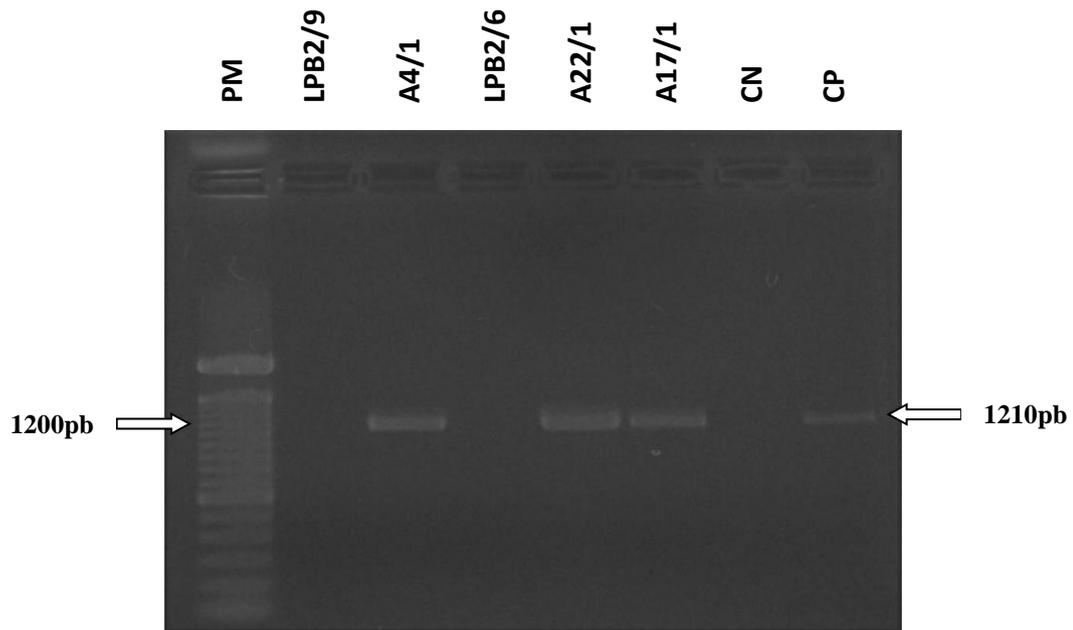
4.2 DETECÇÃO DOS GENES QUE CODIFICAM FATORES DE VIRULÊNCIA

Todas as 63 amostras selecionadas foram caracterizadas quanto a presença de genes de virulência através da PCR para *agg*, *cad*, *ccf*, *cob*, *cpd*, *cylA*, *cylB*, *cylM*, *efaAfm*, *efaAfs* e *gelE*. Os resultados foram considerados positivos, quando a presença foi confirmada pela amplificação das bandas com fragmentos de DNA do tamanho esperado (tabela 1).

A presença do gene *agg* foi verificada em 45 (71,4%) das amostras testadas, destas, 29 pertencem a espécie *E. faecalis*, sete a espécie *E. casseliflavus*, quatro a espécie *E. gilvus*, duas *E. durans* e uma de cada das seguintes espécies *E. faecium*, *E. hirae*, *E. gallinarum*. A Figura 3 representa alguns resultados da PCR para o gene.

Entre as amostras positivas para a presença deste marcador de virulência, 23 são multirresistentes, 13 possuem resistência intermediária e nove foram sensíveis aos antimicrobianos testados, 38 são procedentes de carne de frango e sete procedentes de leite pasteurizado.

Figura 3 – Gel ilustrativo da amplificação pela PCR do gene *agg* (1210pb).

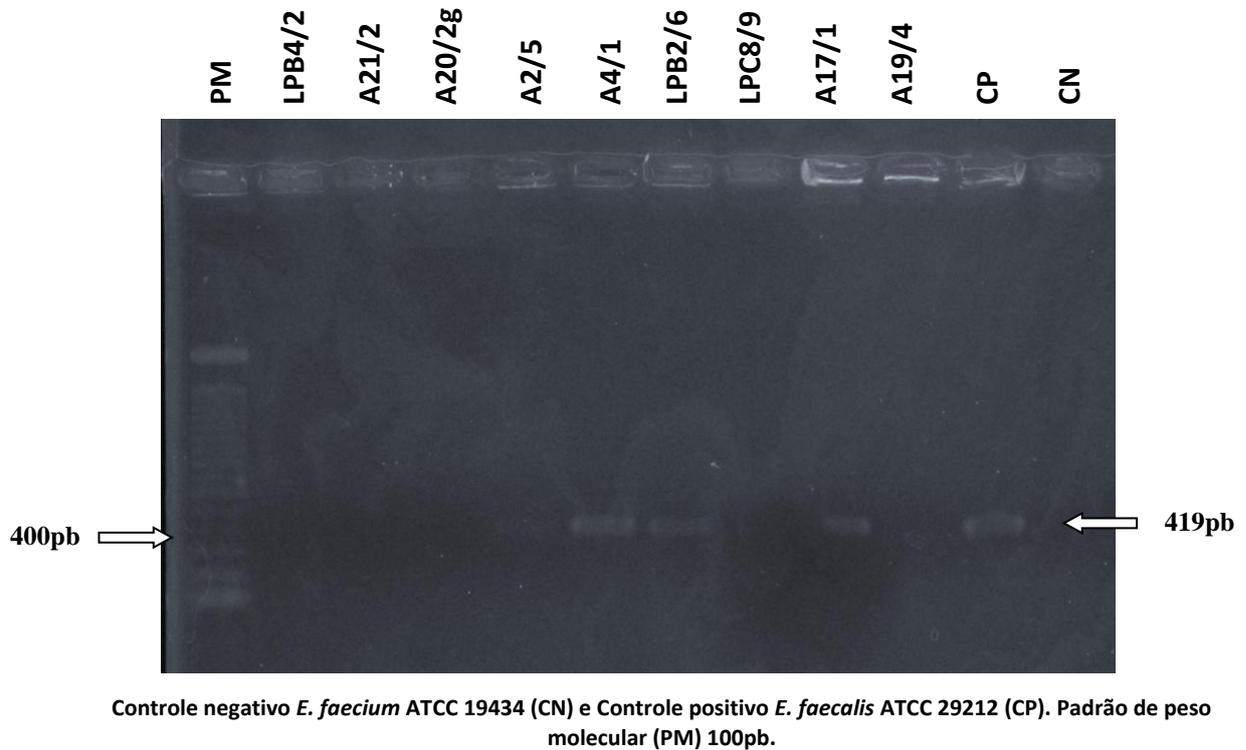


Controle negativo *E. faecium* ATCC 19434 (CN) e Controle positivo *E. faecalis* ATCC 29212 (CP). Padrão de peso molecular (PM) 100pb.

A presença do gene *gelE*, que codifica para a produção da gelatinase, foi detectada em 35 (55,5%) isolados, das espécies: *E. faecalis*, *E. casseliflavus*, *E. faecium*, *E. gilvus*, *E. durans* e *E. hirae* (Figura 4). Destas, 17 possuem perfil de multirresistencia, sete possuem resistência intermediária e 11 são sensíveis. São procedentes de carne de frango 31 e quatro são de leite pasteurizado.

Considerando as 35 amostras positivas, 28 delas também possuem o gene que codifica para substância de agregação (*agg*).

Figura 4 – Gel ilustrativo da amplificação pela PCR do gene *gelE* (419pb).

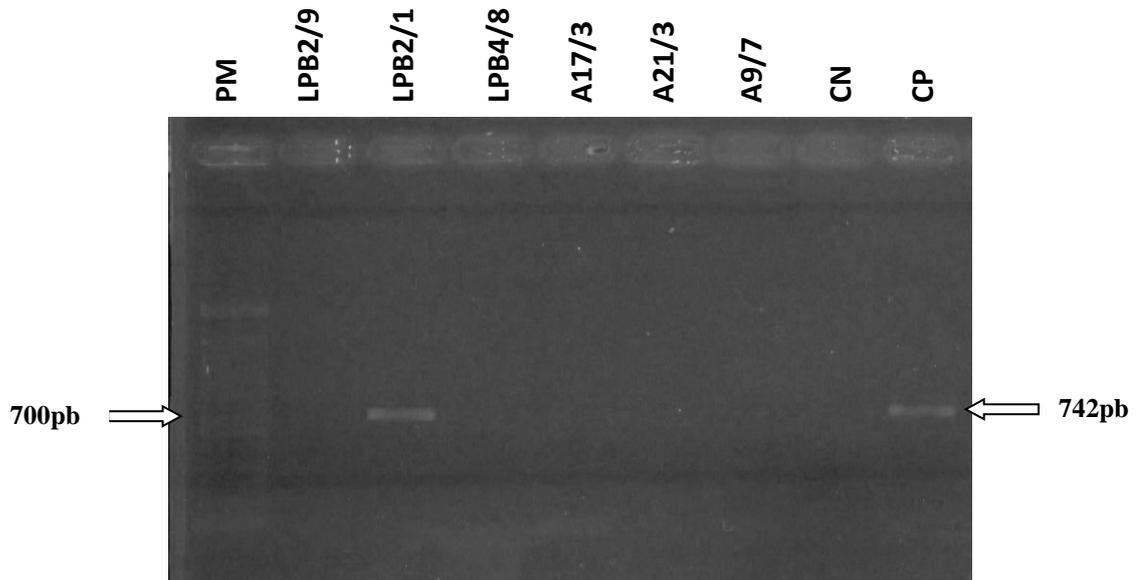


A presença do gene *cylM* foi verificadas em apenas quatro (6,3%) amostras de duas espécies diferentes *E. faecalis* e *E. casseliflavus* (Figura 5). A origem dos isolados foi três amostras provenientes de leite e uma de carne de frango. Para o gene *cylB* foi verificado sua presença em 13 amostras de apenas duas espécies diferentes, o *E. faecalis* e *E. casseliflavus*. E para o *cylA*, gene que codifica a citolisina, sete amostras foram positivas, pertenciam a três espécies distintas, *E. faecalis*, *E. casseliflavus* e *E. gallinarum*.

De todas as amostras, cujos resultados foram positivos, apenas 2 apresentaram os três genes ao mesmo tempo. A amostra A3/4 que teve seu isolamento de carne de frango e a amostra LPB2/1 isolada de leite, ambas possuem perfil de multirresistência aos antimicrobianos testados.

A amostra LPB2/1 foi também positiva para os genes *agg* e *gelE*, já a LPC7/6, embora tenha sido negativa para *cylA* apresentou resultado positivo para os mesmos dois genes.

Figura 5 – Gel ilustrativo da amplificação pela PCR do gene *cylM* (742pb).

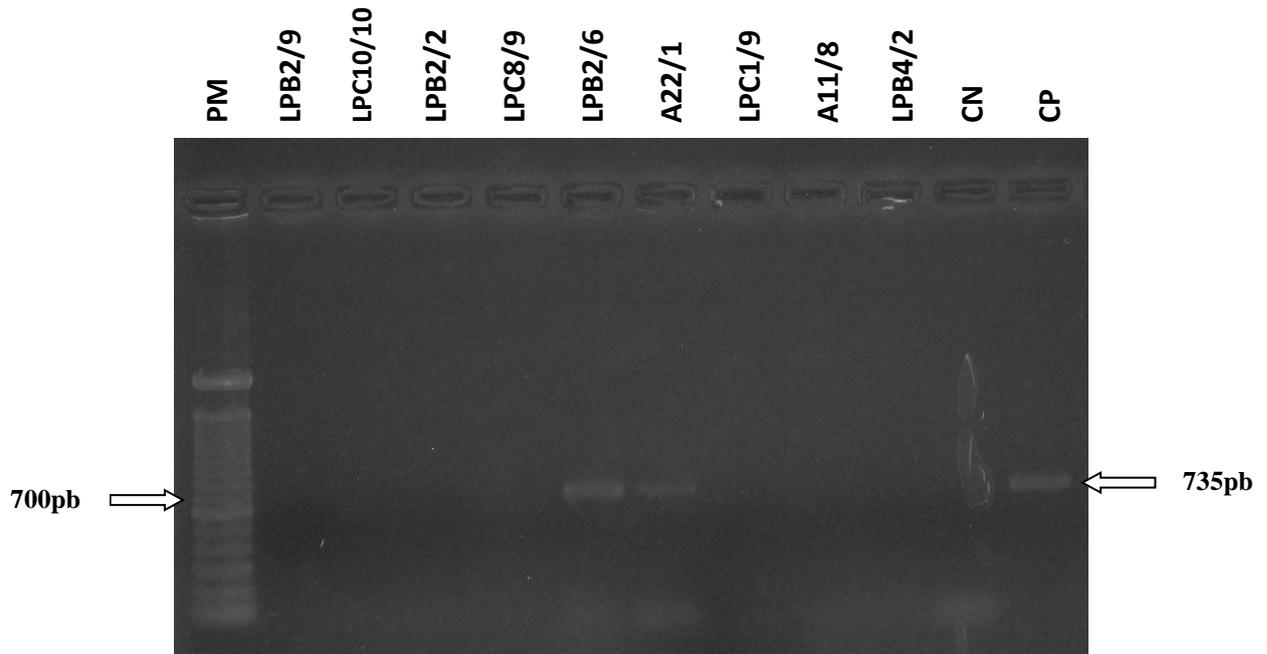


Controle negativo *E. faecium* ATCC 19434 (CN) e Controle positivo *E. faecalis* ATCC 29212 (CP). Padrão de peso molecular (PM) 100pb.

A presença do gene *efaAfm*, que codifica uma adesina, foi identificada em 21 (33,3%) amostras testadas, embora este gene seja mais comum em *E. faecium* ele também foi encontrado em outras espécies como: *E. faecalis*, *E. gilvus*, *E. casseliflavus* e *E. gallinarum* (Figura 6). Para o gene *efaAfs* foram encontradas 30 (47,3%) amostras positivas, e mesmo sendo esse gene comum para *E. faecalis*, foram também encontradas outras duas espécies, *E. faecium* e *E. casseliflavus*, carregando o gene.

A presença de ambos os genes num mesmo micro-organismo foi verificada para 13 amostras, sete pertencentes aos *E. faecalis*, três a *E. faecium* e três a *E. casseliflavus*. Todos são procedentes de carne de frango com perfil multirresistente e de resistência intermediária. Nenhum deles possui os genes *cylA*, *cylB* e *cylM*, porém cinco amostras foram positivas tanto para *agg* quanto para *gelE*.

Figura 6 – Gel ilustrativo da amplificação pela PCR do gene *efaAfm* (735pb).

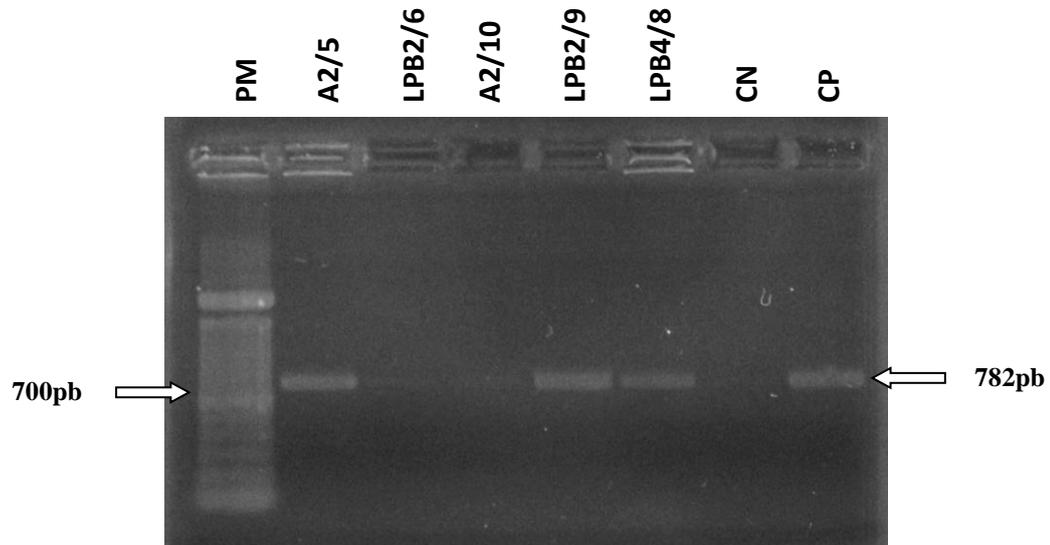


Controle negativo *E. faecium* ATCC 19434 (CN) e Controle positivo *E. faecalis* ATCC 29212 (CP). Padrão de peso molecular (PM) 100pb.

Os resultados obtidos com a PCR para o gene *cpd* foram muito expressivos, 45 (71,4%) amostras apresentam o gene (Figura 7). Somente a espécie *E. gallinarum* não teve a presença do gene, todas as outras espécies tinham pelo menos um representante que continha o *cpd*. Foram 37 amostras oriundas de carne de frango e oito de leite, sendo ainda 21 amostras multirresistentes, 14 com resistência intermediária e 11 sensíveis aos antimicrobianos testados.

A amostras LPB2/1, que teve a presença confirmada dos genes *agg*, *gelE*, *cylA*, *cylB* e *cylM*, também foi positivo para o gene *cpd*.

Figura 7 – Gel ilustrativo da amplificação pela PCR do gene *cpd* (782pb).

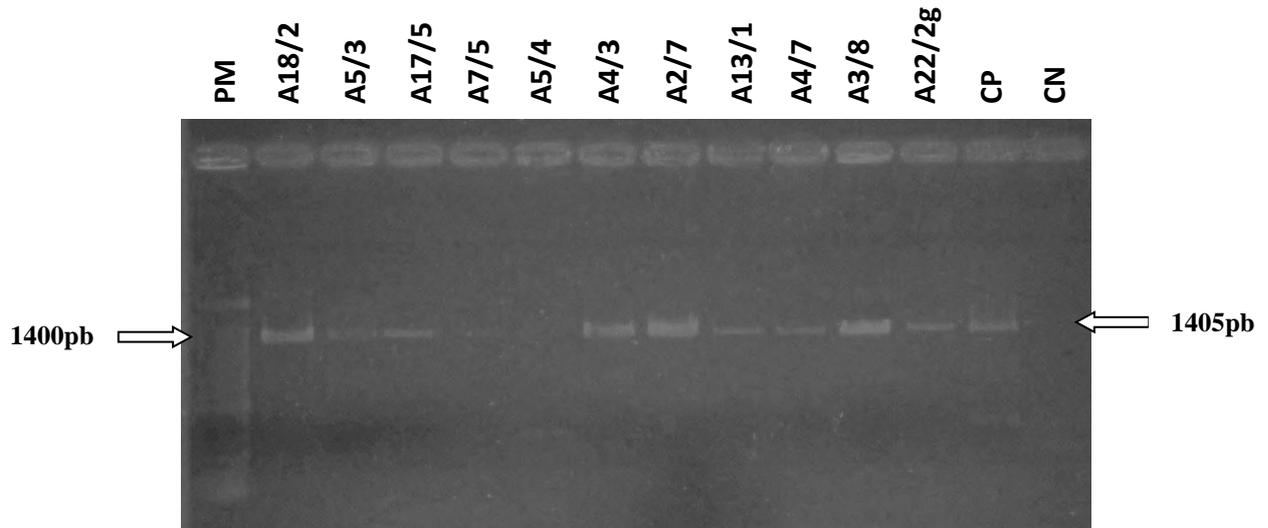


Controle negativo *E. faecium* ATCC 19434 (CN) e Controle positivo *E. faecalis* ATCC 29212 (CP). Padrão de peso molecular (PM) 100pb.

Para o gene *cob* foram identificadas 39 (61,9%) amostras positivas. Novamente apenas a espécie *E. gallinarum* não teve a presença confirmada do gene, todas as outras espécies tinham pelo menos um representante, que continha o *cob* (Figura 8). Foram 33 amostras procedentes de carne de frango e seis de leite, sendo ainda 20 amostras com perfil de multirresistência, cinco com resistência intermediária e 14 sensíveis aos antimicrobianos testados.

Entre as 39 amostras positivas para *cob*, 30 também apresentavam o gene *cpd* que codifica para ferormônio. A amostras LPB2/1, que teve a presença confirmada dos genes *agg*, *gelE*, *cylA*, *cylB*, *cylM* e *cpd*, também foi positivo para o gene *cob*.

Figura 8 – Gel ilustrativo da amplificação pela PCR do gene *cob* (1405pb).

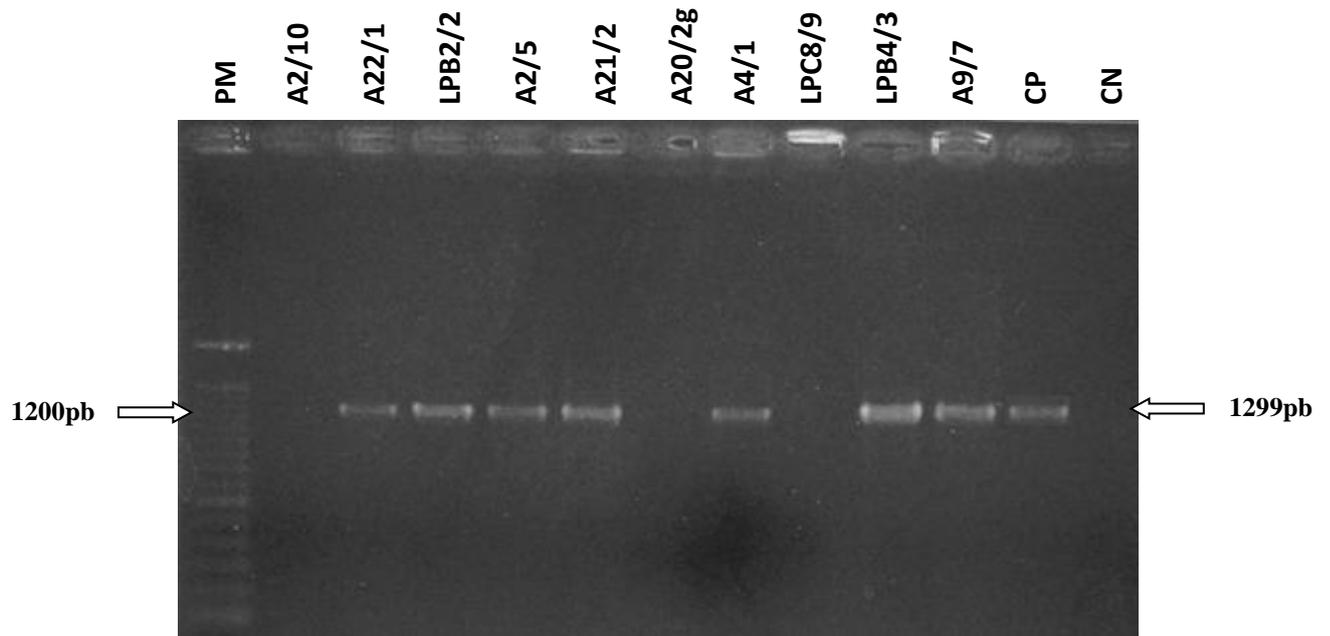


Controle negativo *E. faecium* ATCC 19434 (CN) e Controle positivo *E. faecalis* ATCC 29212 (CP). Padrão de peso molecular (PM) 100pb.

A presença do gene *cad* foi verificada em 41 (65,1%) amostras de pelo menos uma de cada espécie isolada (Figura 9). Foram 34 amostras oriundas de carne de frango e sete de leite, sendo ainda 20 amostras com perfil de multirresistência, 13 com resistência intermediária e oito sensíveis aos antimicrobianos testados.

Entre as 41 amostras positivas para *cad*, 20 também apresentaram os genes *cpd* e *cob* que codifica para ferormônio. Em 12 amostras foi confirmada a presença de *agg* e *gelE* além dos três genes citados. A amostra LPB2/1, que teve a presença confirmada dos genes *agg*, *gelE*, *cylA*, *cylB*, *cylM*, *cpd* e *cob* também foi positivo para o gene *cad*.

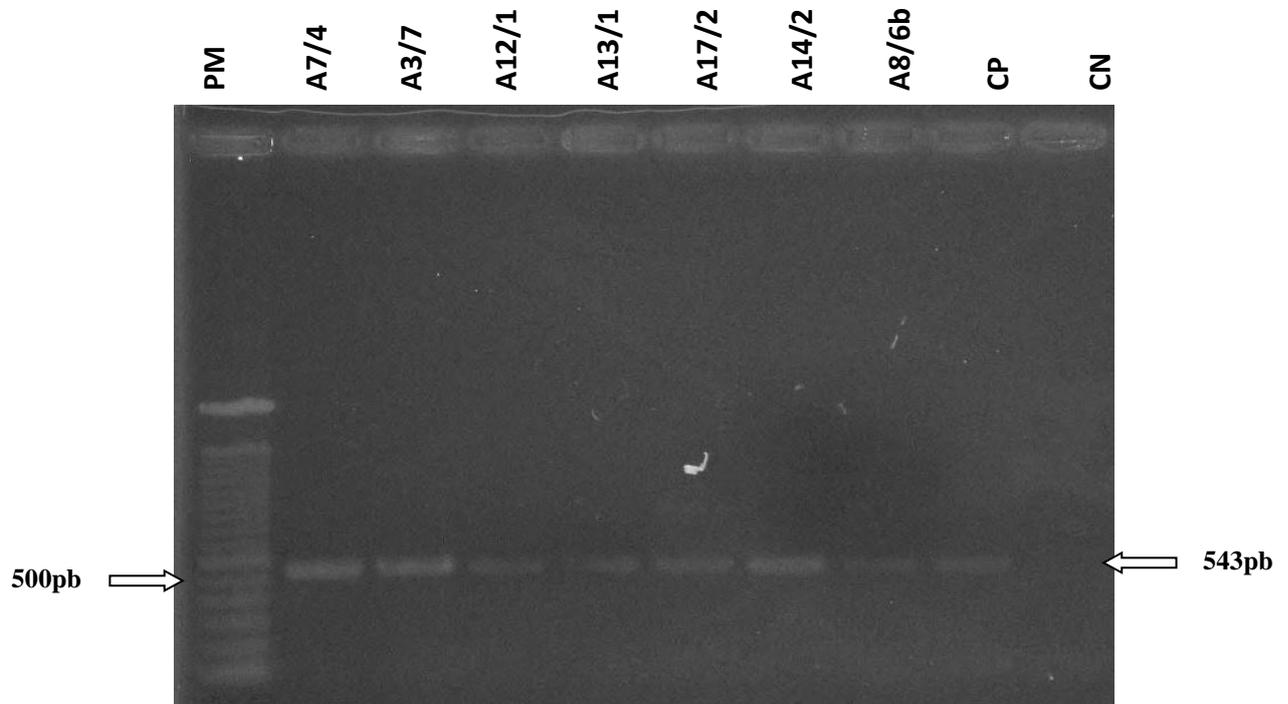
Figura 9 – Gel ilustrativo da amplificação pela PCR do gene *cad* (1299pb).



Controle negativo *E. faecium* ATCC 19434 (CN) e Controle positivo *E. faecalis* ATCC 29212 (CP). Padrão de peso molecular (PM) 100pb.

A presença do gene *ccf* foi a mais expressiva entre todos os genes pesquisados no estudo. Foram 55 (87,3%) amostras isoladas que possuíam o gene, apenas a espécie *E. gallinarum* não teve a presença do gene, todas as outras espécies tinham pelo menos um representante que o continha (Figura 10). Sendo 45 procedentes de carne de frango e 10 de leite, e ainda 27 amostras multirresistentes, 15 com resistência intermediária e 13 sensíveis aos antimicrobianos testados.

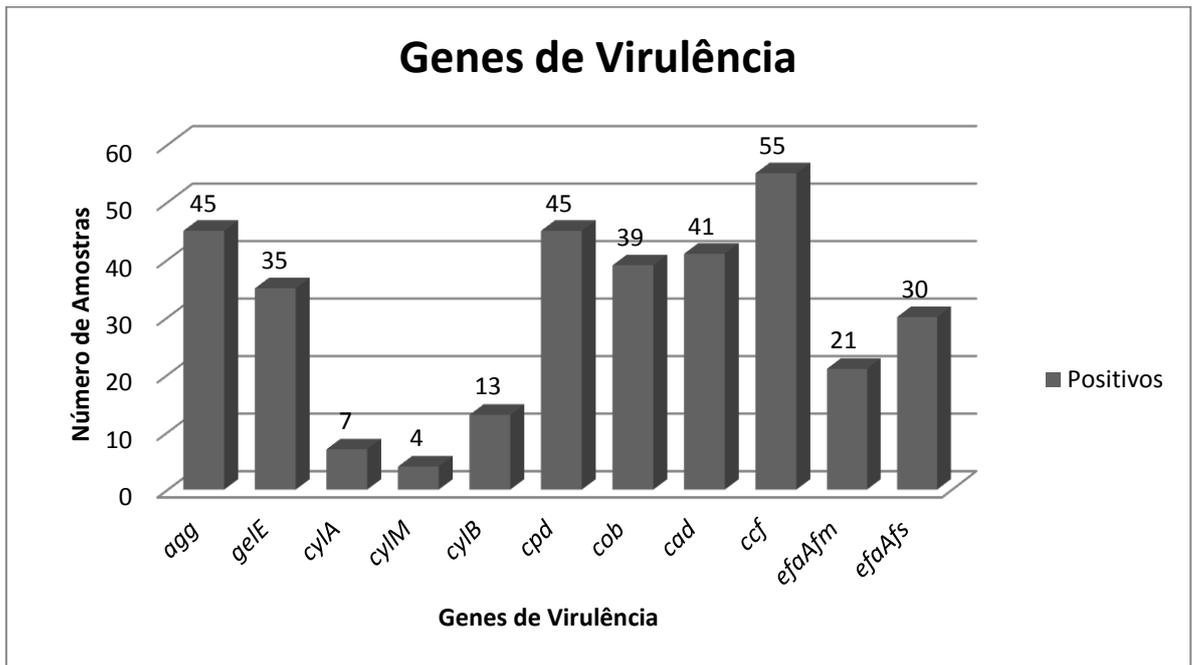
Entre as 55 amostras positivas para *ccf*, 19 também apresentaram os genes *cpd*, *cob* e *cad* que codificam para ferormônios. Em 11 amostras foi confirmada a presença de *agg* e *gelE* além dos quatro genes citados. A amostra LPB2/1, que teve a presença confirmada dos genes *agg*, *gelE*, *cylA*, *cylB*, *cylM*, *cpd*, *cob* e *cad*, também foi positivo para o gene *ccf*.

Figura 10 – Gel ilustrativo da amplificação pela PCR do gene *ccf* (543pb).

Controle negativo *E. faecium* ATCC 19434 (CN) e Controle positivo *E. faecalis* ATCC 29212 (CP). Padrão de peso molecular (PM) 100pb.

A prevalência dos genes de virulência pesquisados neste trabalho está disposta no gráfico abaixo. O gene *ccf*, que codifica ferormônios, foi o mais presente em todas as amostras analisadas, seguido pelo *cpd* e pelo *agg*.

Figura 11 - Gráfico da prevalência dos genes de virulência



Substância de Agregação (*agg*), gelatinase (*gelE*), ativação da citolisina (*cyIA*), modificação pós-traducional de citolisina (*cyIM*), transporte da citolisina (*cyIB*), ferormônios (*cpd*, *cob*, *cad*, *ccf*), adesina de parede de *E. faecium* (*efaAfm*) e adesina de parede de *E. faecalis* (*efaAfs*)

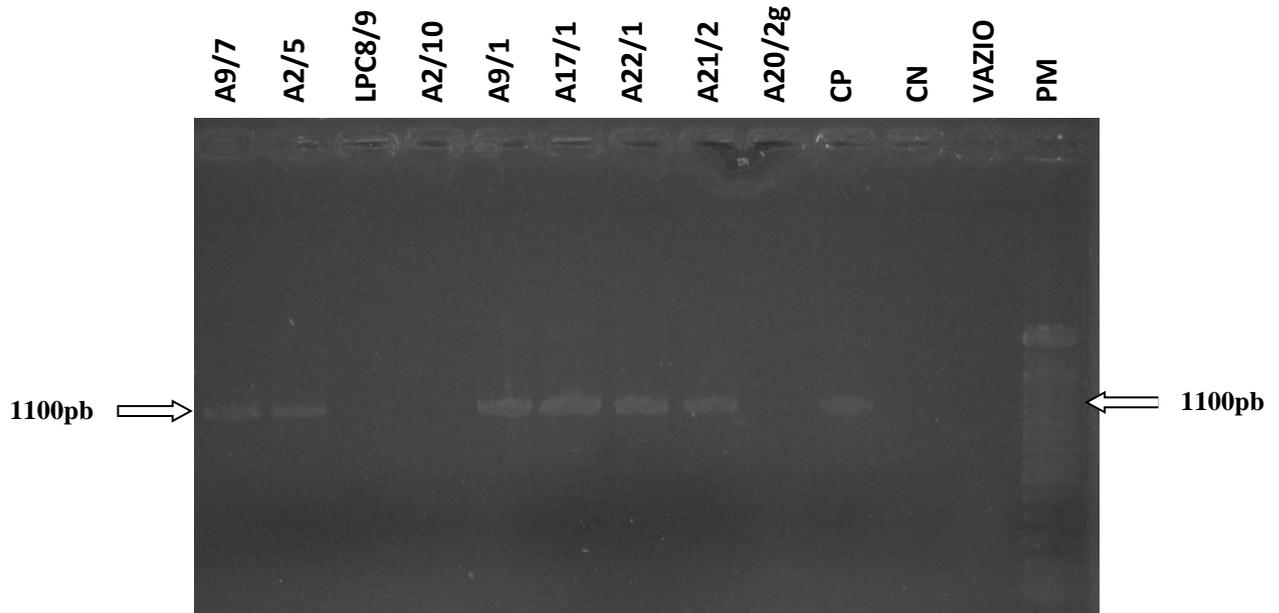
4.3 DETECÇÃO DOS GENES DAS ENZIMAS DESCARBOXILASE

A busca pelos genes que codificam as enzimas descarboxilase, responsáveis pela formação da histamina e da tiramina, mostrou, que embora nenhuma amostra tenha sido positiva para a histidina descarboxilase, 27 (42,8%) enterococos possuíam o gene que codifica a tirosina descarboxilase (Figura 12). Sendo 20 procedentes de carne de frango e sete de leite, e ainda nove amostras multirresistentes, nove com resistência intermediária e nove sensíveis aos antimicrobianos testados.

Entre as 27 amostras positivas para *tyrdc*, 11 apresentaram os genes *cpd*, *cob*, *cad* e *ccf*, que codificam para ferormônios. Em quatro amostras foi confirmada a presença de *agg* e *gelE* além dos 5 genes citados. A amostra LPB2/1, que teve a presença confirmada dos genes *agg*, *gelE*, *cyIA*, *cyIB*, *cyIM*, *cpd*, *cob*, *cad* e *ccf* também foi positivo para o gene *tyrdc*.

Apenas a amostra A2/10 não apresentou nenhum fator de virulência testado, porém também não demonstrou capacidade de inibir nenhum dos patógenos testados. Pertence a espécie *E. faecium*, oriunda de carne de frango e apresenta perfil de resistência intermediário.

Figura 12 - Gel ilustrativo da amplificação pela PCR dos genes *hdc* e *tyrdc* (440 e 1100pb, respectivamente).



CN, controle negativo e CP, controle positivo. Padrão de peso molecular (PM) 100pb

4.5 RESULTADOS DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS *ENTEROCOCCUS* spp.

Todas amostras do estudo foram testadas para a capacidade de inibir o crescimento de micro-organismos patogênicos. Das 63 amostras, 13 foram capazes de inibir o crescimento de pelo menos um dos patógenos testados, contra *S. aureus* foram seis amostras e contra *L. monocytogenes* foram sete, não foram encontrados enterococos capazes de inibir *Salmonella*, e nenhum foi capaz de inibir dois dos patógenos testados (tabela 5).

Entre as seis amostras inibidoras de *S. aureus*, duas pertencem ao gênero *E. faecalis*, duas ao *E. casseliflavus*, uma *E. hirae* e uma *E. gallinarum*. Foram cinco amostras oriundas de carne de frango e uma de leite, apenas a amostra A3/7 é sensível a todos os antimicrobianos testados, entretanto, ela possui o gene para produção da tirosina descarboxilase (tabela 5). Todas as amostras testadas apresentam ao menos um gene de virulência, a LPB2/6 foi a única que não apresentou nenhum gene que codifica ferormônios.

Foram sete amostras capazes de inibir a *L. monocytogenes*, destas, três pertencem ao gênero *E. faecalis*, três ao *E. casseliflavus* e 1 ao *E. durans*. Foram quatro amostras

isoladas de leite e três de carne de frango, apenas as amostras LPC8/9 e LPC10/10 tinham perfil de resistência intermediária aos antibióticos testados e não foram encontradas amostras sensíveis (Tabela 5). As amostras A3/4, LPB2/1 e LPC7/6 apresentam o gene para tirosina descarboxilase. Todas as amostras utilizadas neste estudo apresentam ao menos um gene de virulência e a LPB2/1 possui todos os genes de virulência testados.

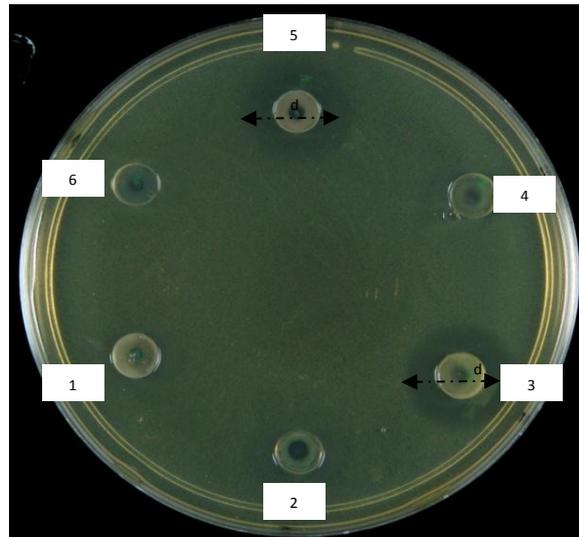
Tabela 5 – Apresentação das amostras produtoras de atividade antimicrobiana contra patógenos alimentares, com suas características principais.

| ATIVIDADE ANTIMICROBIANA | | | | | | |
|--------------------------|-------------------------|-----------------|---------------------------|------------------|-------------------------|-------------------|
| AMOSTRAS | IDENTIFICAÇÃO | ORIGEM | RESISTÊNCIA | PATÓGENOS | | |
| | | | | <i>S. aureus</i> | <i>L. monocytogenes</i> | <i>Salmonella</i> |
| A3/8 | <i>E. faecalis</i> | Carne de Frango | ERI, TET, CLIN, ESTREP | POS | NEG | NEG |
| A5/4 | <i>E. casseliflavus</i> | Carne de Frango | TET, GEN, CLIN, ESTREP | POS | NEG | NEG |
| A5/7 | <i>E. gallinarum</i> | Carne de Frango | GEN, CLIN, ESTREP | POS | NEG | NEG |
| A21/3 | <i>E. casseliflavus</i> | Carne de Frango | ERI, TET, CLIN | POS | NEG | NEG |
| A3/4 | <i>E. faecalis</i> | Carne de Frango | ERI, TET, CLIN, ESTREP | NEG | POS | NEG |
| A4/6 | <i>E. casseliflavus</i> | Carne de Frango | ERI, TET, CLIN | NEG | POS | NEG |
| A5/3 | <i>E. casseliflavus</i> | Carne de Frango | TET, GEN, CLIN | NEG | POS | NEG |
| LPB2/1 | <i>E. faecalis</i> | Leite | ERI, TET, CLIN | NEG | POS | NEG |
| LPC7/6 | <i>E. faecalis</i> | Leite | ERI, TET, CLO, CLIN | NEG | POS | NEG |
| LPC8/9 | <i>E. durans</i> | Leite | Resistência intermediária | NEG | POS | NEG |
| LPC10/10 | <i>E. casseliflavus</i> | Leite | Resistência intermediária | NEG | POS | NEG |
| LPB2/6 | <i>E. faecalis</i> | Leite | Resistência intermediária | POS | NEG | NEG |
| A3/7 | <i>E. hirae</i> | Carne de Frango | Sensíveis a todos | POS | NEG | NEG |

ERI – eritromicina, TET – tetraciclina, CLIN – clindamicina, ESTREP – estreptomicina, GEN – gentamicina, CLO – clorafenicol, POS – positivo, NEG – Negativo.

As placas produzidas nesse teste foram analisadas de forma visual após a incubação de 24h. Cada poço recebeu um número, de 1 a 6, que correspondia a um determinado micro-organismo. Os poços 5 e 6 pertenciam aos controles do teste e os demais recebiam os enterococos a serem testados. Os halos de inibição das amostras positivas, tiveram seu diâmetro medido conforme a Figura 13.

Figura 13 – Imagem ilustrativa da placa com o teste de atividade anti-listeria.

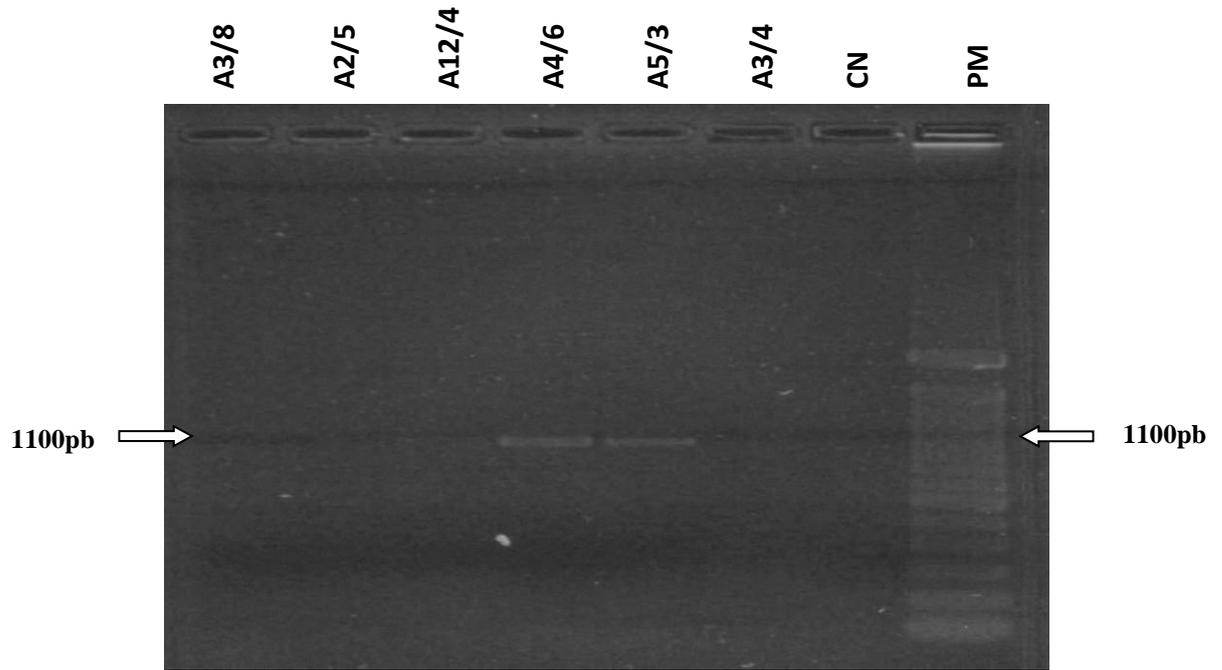


Poços 1, 2 e 4 possuem as seguintes amostras: A17/5, A3/7 e A13/4, respectivamente, todas negativas. No poço 3 está a amostra A5/3 positiva e nos poços 5 e 6 estão os controles positivo e negativo, respectivamente.

4.6 IDENTIFICAÇÃO DOS GENES DAS BACTERIOCINAS

Foram selecionados para o estudo os genes das enterocinas mais produzidas por enterococos, segundo a literatura, para pesquisarmos sua presença nas amostras de possíveis produtoras. Foram elas: a avicina A, AS-48, bacteriocina 31, a enterocina A, enterocina P, enterocina B, enterocina Q, enterolisina A e Hiracina JM79. As 13 amostras produtoras de bacteriocinas foram usadas nesse teste, além de uma não produtora escolhida aleatoriamente.

Apenas duas amostras, A4/6 e A5/3, ativas contra *L. monocytogenes* tiveram a detecção do gene (Figura 14), pertencente a grupo da enterolisina A. Ambas apresentam perfil de multiresistência e são oriundas de carne de frango.

Figura 14 – Gel ilustrativo da amplificação pela PCR do gene *entlA* (1100pb).

CN, controle negativo, padrão de peso molecular (PM) 100pb

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Enterococcus spp. são comensais do trato gastrointestinal de humanos e animais, tradicionalmente considerados patógenos oportunistas, sem atividade específica quanto a infecção gerada. Entretanto, nas últimas décadas, ele emergiu como uma das principais causas de infecções nosocomiais (KOLA *et al.*, 2010) e responsáveis por bacteremias, peritonites e endocardites (CRETI *et al.*, 2004; GREGERSEN *et al.*, 2010). O aumento do número de amostras de enterococos resistentes aos antimicrobianos de uso terapêutico cresceu rapidamente pelo mundo, criando uma grave ameaça para o tratamento das infecções (FREEMAN, 2004). Estes micro-organismos possuem ainda uma capacidade memorável para adquirir novos traços genéticos (COBURN *et al.*, 2007), esta característica permite não só o aumento da virulência como também a habilidade de colonizar novas áreas no hospedeiro e causar infecção. Todos estes fatores destacam a necessidade de um maior entendimento sobre as características e a epidemiologia, com constante monitoramento desse gênero.

A presença dos enterococos na microbiota do trato gastrintestinal de seres humanos e animais, explica claramente sua possibilidade de ocorrência nos mais variados alimentos. Uma vez presentes nos alimentos, esses micro-organismos são capazes de sobreviver e multiplicar, podendo até mesmo resistir aos processos tecnológicos de preparação e preservação dos alimentos (AARESTRUP *et al.*, 2000; GIRAFFA, 2003).

Embora este trabalho tenha sido realizado com amostras previamente isoladas e caracterizadas, as escolhas dos micro-organismos utilizados levaram em consideração apenas os principais perfis de susceptibilidade (resistência, resistência intermediária e sensibilidade aos antimicrobianos) obtidos. Sendo assim, nossos estudos nos conduziram a diferenças nos percentuais entre as espécies, os *E. faecalis* foram a espécie predominante (57,1%), seguidos pelos *E. casseliflavus* (22,2%). A procedência das amostras isoladas foi de 82% de carne de frango e 18% de leite pasteurizado. Estes dados estão em concordância com resultados de outros trabalhos, descaracterizando possíveis vieses (FRANZ *et al.*, 1999; GIRAFFA, 2003; POETA *et al.*, 2006, MARTIN-PLATERO *et al.*, 2009; CHAMPAGNE *et al.*, 2011).

Por muitas décadas, a resistência aos antibióticos de escolha terapêutica tem sido reconhecida como um dos grandes desafios da saúde global. As duas maiores organizações de saúde do mundo, o CDC (*Center for Disease Control*) e o FDA (*Food and Drug*

Administration), reconheceram este fato, como o maior desafio enfrentado no século XXI (FDA, 2000; CDC, 2010).

As taxas de resistência entre espécies de enterococos isolados de materiais clínicos têm alcançado proporções endêmicas ou epidêmicas na América do Norte, e na Europa, em menor número, mas com níveis também crescentes. Algumas das causas prováveis mais aceitas, por exemplo, é o uso exacerbado e inapropriado de antibióticos para infecções não bacterianas. A presença de enterococos apresentando marcadores para níveis de resistência aos antimicrobianos não é exclusiva do ambiente hospitalar, eles são detectados também em produtos alimentícios, particularmente de origem animal (LEVY, 2002; MANNU *et al.*, 2003; MUTNICK *et al.*, 2003; FRACALANZZA *et al.*, 2007).

Há poucas dúvidas sobre o fato, de que a resistência aos antimicrobianos pode se disseminar entre amostras tanto de origem animal e humana, como também ambiental. Por outro lado também é bastante conhecido, que patógenos e mesmo não patógenos podem ser transmitidos via cadeia alimentar. Desde que *Enterococcus* spp. emergiram como importantes causas de problemas nosocomiais e, portanto, com potencial de risco para a saúde humana, tornou-se necessário ampliar os estudos sobre a resistência aos antimicrobianos, bem como considerar a diversidade genética, fator importante, característico deste grupo de micro-organismos.

As amostras utilizadas neste trabalho apresentaram um perfil variado de susceptibilidade, foram 30 amostras (47,5%) multirresistentes, 18 (27,9%) com resistência intermediária e 15 (24,6%) sensíveis. Os *E. faecalis* apresentaram-se como a espécie com maior número de representantes multirresistentes, 18 (60%). Estes dados são semelhantes aos relatos da literatura (HAYES *et al.*, 2003, LANTHIE *et al.*, 2010; KLIBI *et al.*, 2013). Nas últimas décadas, uma maior atenção tem sido reservada aos enterococos que podem ser veiculados por alimentos, pois podem funcionar como importantes reservatórios de marcadores de resistência aos principais antimicrobianos disponíveis como opções terapêuticas para as infecções nosocomiais.

Embora os enterococos pareçam apresentar um potencial cada vez maior como agentes de graves infecções, nenhum dos fatores que condicionam a virulência dos mesmos foi exclusivamente associado com, ou comprovadamente indispensável para a manifestação de uma doença, entretanto, a presença desses fatores deve contribuir para a severidade das infecções. Considerando este fato e incluindo o crescente aumento do isolamento de

enterococos apresentando resistência aos antimicrobianos, a necessidade de mais estudos sobre o panorama que cerca este micro-organismo tornou-se prioridade no meio acadêmico.

Os resultados deste trabalho mostraram que 71,4% das amostras analisadas continham o gene *agg*, que codifica para substância de agregação da superfície dos enterococos, sendo principalmente detectados em *E. faecalis* e *E. casseliflavus*. Todas as amostras positivas para este gene também apresentavam ao menos um gene que codifica para a produção de ferormônio, já que a formação desta glicoproteína é induzida pela presença da substância no meio. Estes resultados estão em concordância com os dados da literatura, que apontam enterococos isolados de humanos e alimentos frequentemente albergando o gene *agg* (KOCH *et al.*, 2004; FISHER & PHILLIPS, 2009; SANCHEZ VALENZUELA *et al.*, 2009; BELGACEM *et al.*, 2010).

A principal função da produção de gelatinase pelo micro-organismo é obter nutrientes para seu metabolismo. Alguns estudos mostram, que embora seja muito comum que os enterococos apresentem o gene *gelE*, a grande maioria não o expressa, pois ela depende de condições e compostos específicos do meio para sua expressão. Entre as amostras estudadas neste trabalho, 55,5% apresentavam o *gelE*, sendo principalmente detectado em *E. faecalis*, conforme descrito na literatura (CRETI *et al.*, 2004; JURKOVIC *et al.*, 2006; CARIOLATO *et al.*, 2008; SANCHEZ VALENZUELA *et al.*, 2009; BELGACEM *et al.*, 2010).

Fatores de virulência dos enterococos, quando secretados, sempre desempenham uma função na patogenia da infecção, um exemplo é a citolisina (hemolisina), que funciona como uma toxina destruindo células humanas e de outras bactérias (HÄLLGREN *et al.*, 2009). A detecção dos genes correspondentes a produção da citolisina *cylA*, *cylB* e *cylM*, mostram uma baixa incidência dos mesmos nas amostras deste estudo. O *cylB* foi o principal observado entre os 3 genes, dado corroborado pela literatura (SANCHEZ VALENZUELA *et al.*, 2009; BELGACEM *et al.*, 2010). Segundo Smedo e colaboradores (2003), a presença destes genes é mais comum em amostras clínicas (33%), quando comparada com amostras de alimentos (6%), confirmando os nossos resultados.

A presença do gene que codifica a adesina de parede em *E. faecium* (*efaAfm*) foi detectada em 33,3% das amostras pesquisadas. A função exata desta adesina como fator de virulência ainda é desconhecida. Alguns estudos presumem que ela esteja envolvida com a adesão dos enterococos a superfícies ou com a evasão do sistema imune, diferente da adesina de parede de *E. faecalis* (*efaAfs*) que já foi demonstrado poder influenciar a patogenicidade

em modelos animais, em nosso estudo foi encontrado em 47,3% das amostras (SINGH *et al.*, 1998; CARIOLATO *et al.*, 2008). Segundo a literatura estes genes apresentam alta incidência entre as espécies *E. faecalis* e *E. faecium*, entretanto em nosso estudo, além da presença dos dois genes em um micro-organismo, a espécie *E. casseliflavus* também albergava os genes (MARTIN-PLATERO *et al.*, 2009; SANCHEZ VALENZUELA *et al.*, 2009; BELGACEM *et al.*, 2010).

Os enterococos possuem um mecanismo de transferência de genes altamente efetivo, que permite a conjugação pela presença de ferormônios. Muitos genes de virulência estão associados a algum plasmídeo transmissível (EATON & GASSON, 2001). Os genes *cpd*, *cob*, *cad* e *ccf* foram identificados em um grande número de amostras, todas possuem pelo menos um dos genes citados e não houve diferença significativa entre as espécies estudadas. Esses dados estão de acordo com os resultados mais recentes da literatura (RUIZ-MOYANO *et al.*, 2009; SANCHEZ VALENZUELA *et al.*, 2009; BELGACEM *et al.*, 2010).

A amostra LPB2/1 foi a única a apresentar todos os genes de virulência testados neste estudo. Ela é proveniente de leite tipo B, foi identificada como *E. faecalis* e possui perfil multirresistente diante dos antimicrobianos testados. A presença desta bactéria em leite, que passou por processo de pasteurização se deve a capacidade deste grupo de micro-organismos em resistir a altas temperaturas (GIRAFFA *et al.*, 1997; McAULEY *et al.*, 2012). Outros estudos mostram, que *E. faecalis* representa a espécie prevalente em alimentos e que alberga mais genes de virulência, confirmando este resultado obtidos por outros pesquisadores (FRANZ *et al.*, 2001; GELSOMINO *et al.*, 2002; GELSOMINO *et al.*, 2003; GIRAFFA, 2003; LOPES *et al.*, 2005; POETA *et al.*, 2006; FRACALANZZA *et al.*, 2007; McAULEY *et al.*, 2012).

Neste estudo, observou-se a presença de diferentes genes de virulência nas amostras de enterococos isoladas tanto de frango como de leite. Genes estes, associados principalmente à transmissão e à aquisição de elementos genéticos móveis, mostrando, que estes micro-organismos possuem grande capacidade realizar conjugação, conforme descrito em diversas pesquisas (EATON & GASSON, 2001; CHANDLER & DUNNY, 2004; RUIZ-MOYANO *et al.*, 2009, DUNNY & JOHNSON, 2011; CHAMPAGNE *et al.*, 2011).

As aminas biogênicas desempenham funções essenciais no desenvolvimento, metabolismo e fisiologia dos seres humanos. Entretanto, quando ingerida em altas concentrações podem ocasionar graves efeitos tóxicos. Muitos países vêm realizando estudos

para identificar alimentos que possam conter estes compostos, principalmente aqueles que impactam de alguma maneira a saúde e a economia.

Em nosso estudo todas as amostras foram testadas, quanto à presença de duas aminas, a histamina e a tiramina, responsáveis por ocasionar principalmente, reações alérgicas e aumento da pressão arterial (TIL *et al.*, 2007; NAILA *et al.*, 2010). Os resultados mostraram que 42,8% das amostras têm a capacidade de produzir tiramina e 74% delas foi identificado como *E. faecalis*. Segundo estudos recentes, esta espécie é a principal bactéria ácido láctica formadora de tiramina e embora seja necessária a presença de tirosina no meio, outros fatores como pH, temperatura, concentração de sais e CO₂ não influenciam a formação dessa amina, podendo então ser isolada dos mais variados tipos de alimentos (MARCOBAL *et al.*, 2004; FERNADEZ *et al.*, 2007; KOMPRDA *et al.*, 2008; KULEY & OZOGUL, 2011; FADHLAOU-ZIDA *et al.*, 2012).

Embora os resultados para tiramina tenham sido expressivos, nenhuma das amostras testadas possui o gene *hdc*. Em um estudo realizado por Martin-Platero e colaboradores (2009), também foi encontrado apenas o gene *tyrdc* em enterococos isolados de leite e queijo. Em outro trabalho, Silva e Glória (2002) testaram os níveis de histamina e tiramina em frango, os resultados foram baixas concentrações para ambos. A presença de histamina em alimentos foi relatada por diversos trabalhos, entretanto, a principal fonte de isolamento desta amina são os peixes, pois estes possuem uma alta concentração de histidina livre nos músculos (GOMAA *et al.*, 2011; HWANG *et al.*, 2011; FADHLAOU-ZIDA *et al.*, 2012).

A incidência de relatos mundiais sobre a presença de aminas biogênicas, as extensivas discussões em trabalhos científicos e o risco associado mostram a importância de uma maior atenção a este tema. No continente Europeu existem legislações específicas, que determinam uma concentração máxima de aminas biogênicas em alguns tipos de alimentos. Os níveis limite de histamina para pescado fresco é de 100mg/Kg e para produtos curados de 400mg/Kg (Commission Regulation (EC)2073/2005). A americana Food and Drug Administration (FDA) considera que o nível de histamina possivelmente causador de risco a saúde é igual a 500mg/Kg. No Brasil há apenas uma legislação sobre concentrações máximas permitidas de histamina e ela trata sobre pescados frescos e seus derivados (Brasil, 1997).

Outro problema relacionado a regulamentação é que a legislação existente apenas determina a concentração máxima de AB nos alimentos, porém não leva em consideração a presença de micro-organismos que são passíveis de produzirem enzimas descarboxilase no

produto acabado. De acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 12 de 2001 (BRASIL) existe uma tolerância máxima para a presença de algumas bactérias nos mais variados alimentos, quando os resultados analíticos estão dentro dos padrões descritos os produtos são considerados como “em condição sanitária satisfatória” e liberados para consumo humano. Os parâmetros determinados por esta RDC permitem que muitos alimentos possam apresentar teores tóxicos de amins biogênicas devido à presença, mesmo que pequena, de micro-organismos.

Observou-se que, entre as 63 amostras estudadas, nenhuma delas possuía os genes que codificam para a histidina descarboxilase (formadora da histamina), porém 27 (42,8%) amostras apresentaram o gene que codifica a tirosina descarboxilase (formadora da tiramina). Estes fatos demonstram a necessidade de se ampliar o escopo de busca e avaliar novos limites em relação à presença de amins biogênicas em alimentos.

A capacidade das espécies do gênero *Enterococcus* em produzir enzimas proteolíticas e inibir o crescimento de outros micro-organismos, desperta o interesse da indústria alimentícia para sua utilização em processos biotecnológicos. Este grupo de bactérias é comumente utilizado na Europa para a produção de vários alimentos fermentados regionais, como queijos e salsichas, e como resultado desta utilização, temos o desenvolvimento de algumas características organolépticas únicas nos produtos (FRANZ *et al.*, 2003).

Neste estudo, avaliamos a capacidade dos enterococos em inibir o crescimento dos principais patógenos de alimentos e a presença dos genes, que codificam as principais enterocinas produzidas por eles. Através do teste de difusão, 20,6% das amostras foram capazes de inibir crescimento de *S. aureus* (seis amostras) e *L. monocytogenes* (sete amostras). Quanto à presença dos genes, que codificam as principais enterocinas, apenas duas amostras das 14 testadas foram positivas para enterolisina A.

A prevalência de amostras produtoras de atividade antimicrobiana em nosso trabalho está de acordo com os relatos na literatura. Yusif e colaboradores (2005) obtiveram 27,3% de suas amostras capazes de produzir bacteriocinas ativas contra *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *S. aureus*. Ben Omar e colaboradores (2004) analisaram enterococos isolados a partir de alimentos na Espanha e obtiveram 34% de amostras produtoras de bacteriocinas contra *E. faecalis*. Sanchez-Valenzuela e colaboradores (2009) isolaram enterococos de alimentos de origem animal e encontram 24% de amostras capazes de inibir o patógeno *Enterococcus* S47,

neste trabalho também foi avaliada a presença dos genes para as principais enterocinas e foram encontradas a enterocina A, B e P.

Embora tenhamos encontrado amostras capazes de inibir o crescimento dos patógenos testados, mais estudos serão necessários para a identificação e caracterização dos compostos que produziram estes resultados.

As espécies do gênero *Enterococcus* podem ser encontradas em diferentes fontes de alimentos. Embora possuam características benéficas e de interesse da indústria, estes micro-organismos são também considerados patógenos oportunistas, que podem conter inúmeros fatores de virulência e genes de resistência aos antimicrobianos. Além da capacidade de adquirir e transferir genes por mecanismos de conjugação entre diferentes espécies, além da capacidade de produzir aminas biogênicas, pois ainda existem lacunas de conhecimento, capazes de gerar graves consequências à saúde humana.

Diante dos resultados por nós obtidos, principalmente, a presença de significantes percentuais de marcadores de virulência e também de genes para a produção da enzima descarboxilase entre os enterococos isolados de amostras de alimentos de origem animal, além da escassez de informações sobre estes micro-organismos em alimentos comercializados no Brasil, demonstram a importância em se monitorar constantemente os micro-organismos portadores de marcadores de virulência e com capacidade de produzir aminas biogênicas presentes nessas fontes e comprova a necessidade de se aprofundar os estudos para ampliar o conhecimento sobre este gênero bacteriano. A segurança é o requisito básico, que deve ser plenamente atendido em se tratando de alimentos, portanto a presença de fatores, que possam colocar em risco a saúde humana ressalta a importância de qualquer iniciativa para suprimir esse perigo.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

- Presença dos genes de virulência:

Em todas as amostras estudadas foi verificada a presença de pelo menos um dos genes de virulência testados.

A presença do gene *agg* foi verificada em 71,4% das amostras, do gene *gelE* em 55,5%, do gene *cylM* em 6,3%, do gene *cylB* em 20,6%, do gene *cylA* em 11,1%, do gene *cpd* em 71,4% das amostras, do gene *cob* em 61,6%, do gene *cad* em 65,1%, do gene *ccf* em 87,3%.

Somente uma amostra foi positiva para todos os genes de virulência testados.

- Presença dos genes da enzima descarboxilase:

Foi detectado em 42,8% das amostras, o gene *tyrdc*, entretanto, nenhum micro-organismo pesquisado apresentou o gene *hdc*.

- Produção de atividade antimicrobiana:

Entre as 63 amostras testadas, foram encontrados 13 (20,6%) isolados com a atividade antimicrobiana.

- Presença dos genes das bacteriocinas:

Foi encontrado apenas um dos genes de bacteriocinas pesquisados, enterolisina A, em duas das 14 amostras testadas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F.M. *et al.* Antimicrobial resistance among enterococci from pigs in three European countries. **Applied Environmental Microbiology**, 68: 4127 – 4129, 2002b.
- ABRANTES, M.C.; LOPES, M.D.F.; KOK, J. Impact of Manganese, Copper and Zinc Ions on the Transcriptome of the Nosocomial Pathogen *Enterococcus faecalis* V583. **PLoS ONE**, 6, 10, 1-9, e26519, 2011.
- ABRIOUEL, H. *et al.* Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. **International Journal of Food Microbiology**, 123, 38–49, 2008.
- AGERSØ, Y. *et al.* Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* isolates from a Danish patient and two healthy human volunteers are possibly related to isolates from imported turkey meat. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 62, 844–845, 2008.
- ALBUQUERQUE, V.S. **Enterococcus resistentes a níveis elevados de gentamicina (HLRG): caracterização fenotípica, detecção de genes de resistência e diversidade genética.** il. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, Brasil, 2001.
- ALVAREZ-CISNEROS, Y.M. *et al.* Biochemical characterization of a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Enterococcus faecium* MXVK29, isolated from Mexican traditional sausage. **Journal Science Food Agriculture**, 90:2475–2481, 2010.
- AMMERLAAN, H.S.M. *et al.* Secular Trends in Nosocomial Bloodstream Infections: Antibiotic-Resistant Bacteria Increase the Total Burden of Infection. **Clinical Infectious Diseases**, 2012. “Article in press”
- AMMOR, S.; TAUVERON, G.; DUFOUR, E.; CHEVALLIER. I. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. 1—Screening and characterization of the antibacterial compounds **Food Control**, 17, 454–461, 2006.
- ANDREWS, W.H.; JUNE, G.A. Food Sampling and Preparation of homogenate, Ch. 1. In: Food and drug Administration Bacteriological Analytical Manual, 8th ed. (revision A), R. L. Merker (Ed.). AOAC International, Gaithersburg, MD, 1998.

- BATES, J.; JORDENS, J.Z.; GRIFFITHS, D.T. Farm animals as a putative reservoir for vancomycin-resistant enterococcal infection in man. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 34:507–514, 1994.
- BELGACEM, Z.B. *et al.* Antimicrobial activity, safety aspects, and some technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from artisanal Tunisian fermented meat **Food Control** 21. 462–470, 2010.
- BEN OMAR, N. *et al.* Functional and safety aspects of enterococci isolated from different Spanish foods. **Systematic Applied Microbiology**, 27, 118 -130, 2004.
- BHARDWAJ, A.; MALIK, R.K.; CHAUHAN, P. Functional and safety aspects of enterococci in dairy foods. **Indian Journal of Microbiology**, 48, 3, 317-325, 2008.
- BIAVASCO, F. *et al.* VanA type enterococci from humans, animals and food: species distribution, population structure, Tn1546 typing and location, and virulence determinants. **Applied Environmental Microbiology**, 73: 3307–3319, 2007.
- BIEDENBACH, D.J.; MOET, G.J.; JONES, R.N. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2002). **Diagnose of Microbiological Infection Disease**, 50, 59– 69, 2004.
- BILLSTRÖM, H. *et al.* Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*. **International Journal Antimicrobial Agents**, 32: 374-377, 2008.
- BIRRI, D.J. *et al.* Molecular and genetic characterization of a novel bacteriocin locus in *Enterococcus avium* isolates from infants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 2, p. 483–492, 2010.
- BOVER-CID, S.; HOLZAPFEL W. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**; 53:33–41, 1999.
- BOVER-CID, S. *et al.* Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. **International Journal of Food Microbiology**, 66:185–189, 2001.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira, volume 1 / Brasília: Anvisa, 2010 b. p. 59-73, 1v/il. Disponível em: <http://anfarmag.campaignsender.com.br/registra_clique.php?id=TH|teste|57227|27417&url=http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm>. Acesso 01 dezembro 2012.
- BRASIL. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC 275, de 21 de outubro de 2002. Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos e

Lista de Verificação de Boas Práticas de Fabricação para estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 de out. 2003. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br>>. Acesso 01 dezembro 2012.

- BRASIL. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 de jan. 2001. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br>>. Acesso 03 dezembro 2012.
- BRASIL. Congresso Nacional. Lei nº 8080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 de set. 1990. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br>>. Acesso 01 dezembro 2012.
- BRASIL. Congresso Nacional. Lei nº 9782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 27 de jan. 1999. Disponível em: <<http://www.senado.gov.br>>. Acesso 01 dezembro 2012.
- BRASIL. Constituição da República Federativa do Brasil. Título VIII. Seção II. Brasília, DF: Senado, 1988.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento MAPA. Portaria nº185, de 13 de maio de 1997 do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, aprovado pelo Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952 e Considerando a Resolução Mercosul GMC nº 40/94, que aprovou o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Fresco (Inteiro e Eviscerado). Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em 24 de Novembro de 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria MS nº 1428, de 26 de novembro de 1993. Aprova o Regulamento Técnico para Inspeção Sanitária de Alimentos, Diretrizes para o estabelecimento de Boas Práticas de Produção e de Prestação de Serviços na Área de Alimentos, e o Regulamento Técnico para Estabelecimento de Padrão de Identidade e Qualidade (PIQs) para Produtos na Área de Alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 de dez. 1993. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br>>. Acesso 01 dezembro 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária Portaria SVS/MS nº 326, de 30 de julho de 1997. Aprova o Regulamento Técnico sobre condições higiênico-sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa

do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 01 de ago. 1997b. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br>>. Acesso 01 dezembro 2012.

- BRINK, B. *et al.* Occurrence and formation of biologically active amines in foods. **International Journal of Food Microbiology**, 11: 73-84, 1990.
- CARIOLATO, D.; ANDRIGHETTO, C.; LOMBARDI, A. Occurrence of virulence factors and antibiotic resistances in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* collected from dairy and human samples in North Italy. **Food Control**, 19, 886–892, 2008.
- CARVALHO, M.G.S.; TEIXEIRA, L.M.; FACKLAM, R.R. Use of tests for acidification of methyl- α -D-glucopiranoside and susceptibility to efrotomycin for differentiation of strains of *Enterococcus* and some related genera. **Journal Clinical Microbiology**, 36,1584 – 1587, 1998.
- CDC. 2010. Get smart: know when antibiotics work. Centers for Disease Control, Atlanta, GA. www.cdc.gov/Features/GetSmart. Acesso 01 dezembro 2012.
- CHAMBERLAIN, J.S. *et al.* Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. **Nucleic Acids Research**, 16, 11141–11156, 1988.
- CHAMPAGNE, J. *et al.* Development of a DNA Microarray for Enterococcal Species, Virulence, and Antibiotic Resistance Gene Determinations among Isolates from Poultry. **Applied and Environmental Microbiology**, 77, 8, 2625–2633, Apr. 2011.
- CHANDLER, J.R.; DUNNY, G.M. Enterococcal peptide sex pheromones: synthesis and control of biological activity. **Peptides**, 25:1377-1388, 2004.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE – CLSI / NCCLS Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved Standard M2 – A9 vol. 20 n° 1, 2006a. **Clinical and Laboratory Standard Institute**. Wayne, Pa, USA.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE 2006b. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Sixteenth Informational Supplement. CLSI document M100-S16, 2006b. **Clinical and Laboratory Standard Institute**, Wayne, Pa, USA.
- COBURN, P.S. *et al.* Horizontal transfer of virulence genes encoded on the *Enterococcus faecalis* pathogenicity island. **Molecular Microbiology**, 63, 530–544, 2007.
- Commission Regulation (EC) 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. **Official Journal European Union**, L338, 1–26, 2005.

- CONDE-ESTEVEZ, D. *et al.* Clinical characteristics and outcomes of patients with vancomycin-susceptible *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* bacteraemia in cancer patients. **Eur. Journal of Clinical Microbiology Infection Disease**. 30, 103e108, 2011.
- COTON M, COTON E, LUCAS P, LONVAUD A. Identification of the gene encoding a putative tyrosine decarboxylase of *Carnobacterium divergens* 508. Development of molecular tools for the detection of tyramine-producing bacteria. **Food Microbiology**, 21:125–130, 2004.
- COTON E, COTON M. Multiplex PCR for colony direct detection of Gram-positive histamine- and tyramine-producing bacteria. **Journal Microbiology Methods** 63:296–304, 2005.
- COTON, E.; COTON, M. Evidence of horizontal transfer as origin of strain to strain variation of the tyramine production trait in *Lactobacillus brevis*. **Food Microbiology**, 26, 52–57, 2009.
- COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, R.P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Microbiology Review**, 3: 777–788, 2005.
- CRETI, R. *et al.* Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. **Journal of Medical Microbiology**, 53, 13–20, 2004.
- CURIEL, J.A. *et al.* Production of biogenic amines by lactic acid bacteria and enterobacteria isolated from fresh pork sausages packaged in different atmospheres and kept under refrigeration. **Meat Science**; 88, 368–373, 2011.
- DALLA COSTA, L.M. *et al.* Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: first case in Brazil. **Brazilian Journal Infection Disease**, 2: 160 – 163, 1998.
- DE VUYST, L.; VAN DAMME, E.J. In: De Vuyst, L., Van Damme, E. J. (eds.), **Antimicrobial potential of lactic acid bacteria**. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetic and Applications, Blackie Academic & Professional, London, United Kingdom, 91 – 142, 1994.
- DESAI, P.J. *et al.* The prevalence, identification and the distribution of various species of enterococci which were isolated from clinical samples, with special reference to the urinary tract infections in catheterized patients. **Indian Journal of Medical Microbiology**, 19, 132–37, 2001.
- DEVRIESE, L.A. *et al.* Presence of vancomycin resistant enterococci in farm and pet animals. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, 40: 2285–2287, 1996.
- DOMIG, K.J.; MAYER, H.K.; KNEIFEL, W. Methods used for the isolation, enumeration, characterization and identification of *Enterococcus* sp.: Media for

Public Health Service, Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition. Office of Seafood, Washington, DC 2001; 73.

- FDA. 2000. FDA Task Force on Antimicrobial Resistance: key recommendations and report, Washington, DC. FDA, Washington, DC. <http://www.fda.gov/downloads/ForConsumers/ConsumerUpdates/UCM143458.pdf> Acesso 10 de dezembro de 2012.
- FERNÁNDEZ, M. *et al.* Factors affecting tyramine production in *Enterococcus durans* IPLA 655. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 73, 1400– 1406, 2007.
- FISHER, K., PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, 155, 1749-1757, 2009.
- FOULQUIÉ-MORENO, M. R. *et al.* The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, 106: 1 – 24, 2006.
- FRACALANZZA, S. A. P. *et al.* Antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from poultry meat and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 102, 7, 853-859, 2007.
- FRACALANZZA, S.A.P. **Identificação, resistência a antimicrobianos e caracterização molecular de *Enterococcus* isolados de alimentos**. Rio de Janeiro: INCQS. 158p. Tese (Doutorado) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária. Rio de Janeiro, Brasil, 2007.
- FRANZ, C. M. A. P.; HOLZAPFEL, W. H.; STILES, M. E. Enterococci at the crossroads of food safety? **International Journal Food Microbiology**, 47: 1 – 24, 1999.
- FRANZ, C.M.A.P. *et al.* Incidence of Virulence Factors and Antibiotic Resistance among Enterococci Isolated from Food. **Applied and Environmental Microbiology**, 67, 9, 4385–4389, 2001.
- FRANZ, C.M.A.P. *et al.* Enterococci in foods – a conundrum for food safety. **International Journal Food Microbiology**, 88: 105 – 122, 2003.
- FRANZ, C.M.A.P. *et al.* Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. **FEMS Microbiology Review**, 31: 293–310, 2007.
- FREEMAN J. **Modern quantitative epidemiology in the hospital**. Philadelphia, PA: Lippincott-Williams &Wilkins; p. 19–48, 2004.
- GÁLVEZ, A. *et al.* Purification and amino acid composition of peptide antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus (Enterococcus) faecalis* subsp. *liquefaciens* S-48. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, 33: 437–441, 1989.

- GARAI, G. *et al.* Biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from cider. Letters in **Applied Microbiology**; 45, 473–478, 2007.
- GELSOMINO, R. *et al.* Effect of Raw-Milk Cheese Consumption on Enterococcal flora of Human Feces. **Applied Environmental Microbiology**, 68: 3560 – 3565, 2003.
- GELSOMINO, R. *et al.* Source of enterococci in a farmhouse raw milk cheese. **Applied Environmental Microbiology**, 68: 3560 – 3565, 2002.
- GELSOMINO, R. *et al.* Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar-type cheesemaking factory. **International Journal of Food Microbiology** 71, 177– 188, 2001.
- GILMORE, M. S. *et al.* In: Michael S. Gilmore *et al.* (eds.). **The Enterococci Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance**. ASM Press, Washington, DC, 2002.
- GILMORE, M.S.; FERRETTI, J.J. The thin line between gut commensal and pathogen. **Science**, 209: 1999 – 2002, 2003.
- GIRAFFA, G. Enterococci from foods. **FEMS Microbiology**, 26: 163–171, 2002.
- GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, 88: 215 – 222, 2003.
- GIRAFFA, G.; CARMINATI, D.; NEVINE, F. Enterococci isolated from dairy products: a review of risk and potential technological use. **Journal Food Protection**, 60: 732– 738, 1997.
- GOMAA, M.N. *et al.* Simultaneous occurrence of saxitoxins and biogenic amines in mackerel fish. **African Journal of Microbiology Research**, 5, 29, 5178-5187, 2011.
- GOMES, B. C. *et al.* Prevalence and characterization of *Enterococcus* sp. Isolated from Brazilian foods. **Food Microbiology**, 25: 668–675, 2008.
- GORDON, C.L.A. & AHMAD, M.H. Thermal susceptibility of *Streptococcus faecium* strains isolated from frankfurters. **Canadian Journal Microbiology**, 37: 609 – 612, 1991.
- GREGERSEN, R.H. *et al.* Multilocus sequence typing of *Enterococcus faecalis* isolates demonstrating different lesion types in broiler breeders. **Avian Pathology** 39, 435–440, 2010.
- GREIF, G.; GREIFOVA, M.; DRDAK, M. Determination of biogenic amines in foods of animal origin method HPLC. **Food Science**, 15, 119–129, 1997.

- HAAS, W.; SHEPARD, B.D.; GILMORE, M.S. Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction. **Nature**, 3, 415(6867), 84-87, 2002.
- HALÁSZ, A. *et al.* Biogenic amines and their production by microorganisms in food. **Trends Food Science Technology**, 5: 42-49, 1994.
- HÄLLGREN, A. *et al.* Molecular detection of aggregation substance, enterococcal surface protein, and cytolysin genes and in vitro adhesion to urinary catheters of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* of clinical origin. **International Journal Medical Microbiology**, 299: 323-332, 2009.
- HAMMAMI, R. *et al.* BACTIBASE second release: a database and tool platform for bacteriocin characterization. **BMC Microbiology**, 2010.
- HAMMERUM, A.M.; LESTER, C.H.; HEUER, O.E. Antimicrobial-Resistant Enterococci in Animals and Meat: A Human Health Hazard? **Foodborne Pathogens and Disease**, 7, 10, 2010.
- HARRINGTON, S. M.; ROSS, T. L.; MERZ, W. G. Prevalence of *esp* in enterococcal bacteremia isolates. 103rd Genetic Meet ASM. Abstract C – 414 - 194, 2003.
- HAYES, J.R. *et al.* Prevalence, and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from retail meat. **Applied Environmental Microbiology**, 69, 12, 7153 – 7160, 2003.
- HERNANDEZ-JOVER, T. *et al.* Biogenic amine and polyamine contents in meat and meat products. **Journal of Agriculture Food Chemical**; 45(6):2098–102, 1997.
- HOEBEN, J. H. The potential of vancomycin-resistant enterococci to persist in fermented and pasteurized meat products. **International Journal Food Microbiology**, v. 88, p. 11-18, 2003.
- HUGAS, M. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of a meat and meat products. **Meat Science**, 49: 139 – 150, 1998.
- HUGAS, M.; GARRIGA, M.; AYMERICH, M. T. Functionality of enterococci in meat products. **International Journal Food Microbiology**, 88, 223 – 233, 2003.
- HWANG, C.C. *et al.* Bacteriological quality and histamine-forming bacteria associated with fish meats and environments in HACCP and non-HACCP fish processing factories. **Tsai Food Control**, 22, 1657-1662, 2011.
- IVERSEN, A. *et al.* High prevalence of vancomycin resistant enterococci in Swedish sewage. **Applied and Environmental Microbiology**, 68, 2838 – 2842, 2002.

- JETT, B.D., HUYCKE, M.M. & GILMORE, M.S. Virulence of enterococci. **Clinical Microbiology Review**, 7: 462 – 478, 1994.
- JOHNSON, A.P. The pathogenicity of enterococci. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, 33: 1083 – 1089, 1994.
- JUNIOR, F.B.R. *et al* . **Uso de ferramentas moleculares em estudos de diversidades de micro-organismos do solo**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Planaltina, DF: Documento 51, Embrapa: Cerrados, 2002.
- JURKOVIC, D. *et al*. Identification and characterization of enterococci from bryndza cheese. **Letters in Applied Microbiology**, 42, 553–559, 2006.
- KAYSER, F.H. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. **International Journal Food Microbiology**, 88: 255 – 262, 2003.
- KEARNS, A.M.; FREEMAN, R.; LIGHTFOOT, N.F. Nosocomial enterococci: resistance to heat and sodium hypochlorite. **Journal of Hospital Infection**, 30, 3, 193-9, 1995.
- KJEMS, E. Studies on streptococcal bacteriophages: I techniques for isolating phage producing strains. *Pathology and Microbiology Scandinavia*, 36: 433–440, 1955.
- KLAENHAMMER, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, 12: 39–86, 1993.
- KLEIN, G. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro- intestinal tract. **International Journal of Food Microbiology**, 88: 123 – 131, 2003.
- KLIBI, N. *et al*. Species distribution, antibiotic resistance and virulence traits in enterococci from meat in Tunisia. **Meat Science**, 93, 675–680, 2013.
- KNUDTSON, L.M., HARTMAN, P.A. Enterococci in pork processing. **Journal of Food Protection** 56, 6– 9, 1993.
- KOCH, S. *et al*. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. **Vaccine**, 22, 822–830, 2004.
- KOLA, A. *et al*. Is there an association between nosocomial infection rates and bacterial cross transmissions? **Critical Care Medicine**, 38, 46–50, 2010.
- KOMPRDA, T. *et al*. Tyramine production in Dutch-type semi-hard cheese from two different producers. **Food Microbiology**, 25, 219 – 227, 2008.

- KONEMAN, E. W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C. Diagnóstico Microbiológico - Texto e Atlas Colorido. Sexta edição, p. 694-698. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- KÜHN, I. *et al.* Epidemiology and ecology of enterococci, with special reference to antibiotic resistant strains, in animals, humans and the environment. Example of an ongoing project within the European research programme. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 14, 337–342, 2000.
- KULEY, E.; ÖZOGUL, F. Synergistic and antagonistic effect of lactic acid bacteria on tyramine production by food-borne pathogenic bacteria in tyrosine decarboxylase broth. **Food Chemistry**, 127, 1163–1168, 2011.
- LADERO, VM. *et al.* Real time quantitative PCR detection of histamine-producing lactic acid bacteria in cheese: relation with histamine content. **Food Research International**; 41, 1015–1019, 2008.
- LANTHIER, M. *et al.* Distribution of selected virulence genes and antibiotic resistance in *Enterococcus* species isolated from the South Nation River drainage basin, Ontario, Canada. **Journal of Applied Microbiology** 110, 407–421, 2010.
- LATASA, C. *et al.* Biofilm-associated proteins. **Comptes Rendus Biologies**, 329, 11, 849-857, 2006.
- LAUKOVA, A. *et al.* Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by enterocin CCM 4231 in milk products. **Food Microbiology**, 16: 93 – 99, 1999.
- LEUSCHNER, R. G. K.; KURIHARA, R.; HAMMES, W. P. Formation of biogenic amines by proteolytic enterococci during cheese ripening. **Journal Science Food Agriculture**, 79: 1141–1144, 1999.
- LEVY, S. B. 2002. **The antibiotic paradox: how the misuse of antibiotics destroys their curative powers**. 2nd ed. Perseus Publishing, Cambridge, MA.
- LOPES, M. F.S. *et al.* Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci. **International Journal of Food Microbiology**, 103: 191 – 198, 2005.
- LOW, Y.L. *et al.* Manganese-dependent regulation of the endocarditis associated virulence factor EfaA of *Enterococcus faecalis*. **Journal of Medical Microbiology**, 52:113-119, 2003.
- LOWE, A.M.; LAMBERT, P.A.; SMITH, A.W. Cloning of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen: homology with adhesins from some oral streptococci. **Infectious Immunology**, 63, 703-706, 1995.

- LU, S. *et al.* Characterization of Biogenic Amines and Factors Influencing Their Formation in Traditional Chinese Sausages. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 6, 366 – 372, 2010.
- LUCAS, P.M. *et al.* Histamine-producing pathway encoded on an unstable plasmid in *Lactobacillus hilgardii* 0006. **Applied Environmental Microbiology**, 71: 1417-1424, 2005.
- MAIJALA, R.L. Formation of histamine and tyramine by some lactic acid bacteria in MRS broth and modified decarboxylation agar. **Letters in Applied Microbiology**; 17, 40–43, 1993.
- MANNU, L. *et al.* 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.
- MARCOBAL, A. *et al.* The tyrosine decarboxylation test does not differentiate *Enterococcus faecalis* from *Enterococcus faecium*. **Systematic Applied Microbiology**, 27: 423–426, 2004.
- MARCOBAL, A.; DE LAS RIVAS, B.; MUÑOZ, R. Methods for the detection of bacteria producing biogenic amines on foods: a survey. **Journal of Consumer Protection and Food Safety**, 1, 187–196, 2006b.
- MARCOBAL, A. *et al.* Formation of biogenic amines throughout the industrial manufacture of red wine. **Journal Food Protection**, 69, 397 - 404, 2006a.
- MARRA, A.R. *et al.* Nosocomial Bloodstream Infections in Brazilian Hospitals: Analysis of 2,563 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. **Journal of Clinical Microbiology**, 49, 5, 1866 – 1871, 2011.
- MARTÍNEZ-BUENO, M. *et al.* Determination of the gene sequence and molecular structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. **Journal Bacteriology**, 176, 6334–6339, 1994.
- MARTÍN-PLATERO, A.M. *et al.* Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, 132, 24–32, 2009.
- McAULEY, C.M. *et al.* Heat resistance of thermotolerant enterococci isolated from milk. **International Journal of Food Microbiology**, 154, 3, 162-168, 2012.
- MOHAMED, J.A.; HUANG, D.B. Biofilm formation by enterococci. **Journal Medical Microbiology**, 56: 1581–1588, 2007.

- MORENO-ARRIBAS, V. *et al.* Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. **International Journal of Food Microbiology**; 84:117–123, 2003.
- MUNDY, L.M.; SAHM, D.F.; GILMORE, M.S. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance in enterococci. **European Journal Clinical Microbiology Infection Disease**, 9, 90 – 102, 2000.
- MURRAY, B. E. Diversity among multidrug-resistant enterococci. **Emerging Infectious Disease**, 4, 37 – 47, 1998.
- MUTNICK, A.H.; BIEDENBACH, D.J.; JONES, R.N. Geographic variations and trends in antimicrobial resistance among *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2000). **Diagnostic in Microbiological Infections Disease**, 46, 63–68, 2003.
- NAGHMOUCHIA, K.; KHEADRA, E.; LACROIX, C.; FLISS, I. Class I/Class IIa bacteriocin cross-resistance phenomenon in *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology**, 24, 7–8, 718–727, 2007.
- NAILA, A. *et al.* Control of Biogenic Amines in Food—Existing and Emerging Approaches. **Journal of Food Science**, 75, 7, 2010.
- NAKAYAMA, J. *et al.* Isolation and structure of the of *Enterococcus faecalis* sex pheromone, cOB1, that induces conjugal transfer of the Hemolysin/Bacteriocin plasmid, pOB1 and pYI1. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, 59, 4, 703–705, 1995.
- NERO, L.A. *Listeria monocytogenes e Salmonella sp. em leite cru produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e fatores que interferem na sua detecção.* São Paulo: USP, 2005. 141p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br>>. Acesso 08 junho 2012.
- NES, I.F. *et al.* Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology**, 70, 113–128, 1996.
- NILSEN, T.; NES, I.F.; HOLO, H. Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. **Applied Environmental Microbiology**, 69, 2975–2984, 2003.
- PEEL, T. *et al.* Differing risk factors for vancomycin-resistant and vancomycin-sensitive enterococcal bacteraemia. **Clinical Microbiology Infection**, 18, 388–394, 2011.

- PEREIRA, C.I. *et al.* Dual Role for the Tyrosine Decarboxylation Pathway in *Enterococcus faecium* E17: Response to an Acid Challenge and Generation of a Proton Motive Force. **Applied and Environmental Microbiology**, 75: 345–352, 2009.
- POETA, P. *et al.* Antimicrobial resistance and the mechanisms implicate in fecal enterococci from healthy humans, poultry and pets in Portugal. **International Journal Antimicrobial Agents**, 27, 131 – 13, 2006.
- REVIRIEGO, C. *et al.* Screening of Virulence Determinants in *Enterococcus faecium* Strains Isolated From Breast Milk. **Journal of Humam Lactation**, 21, 2, 131-137, 2005.
- RIBOLDI, G.P. *et al.* Antimicrobial resistance profile of *Enterococcus* spp. isolated from food in southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 40, 125-128, 2009.
- ROBREDO, B. *et al.* Molecular analysis of Tn1546 in vanA-containing *Enterococcus* spp. isolated from humans and poultry. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, 44, 2588–2589, 2000.
- RUIZ-MOYANO, S. *et al.* Safety and Functional Aspects of Preselected Enterococci for Probiotic Use in Iberian Dry-Fermented Sausages. **Journal Food Science**, 74: M398-M404, 2010.
- SAHL, H.G.; BIERBAUM, G. Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from gram-positive bacteria. **Annual Review Microbiology**, 52, 41–79, 1998.
- SÁNCHEZ VALENZUELA, A. *et al.* Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in enterococci from artisan foods of animal origin. **Food Control**, 20, 381–385, 2009.
- SÁNCHEZ, J. *et al.* Amino acid and nucleotide sequence, adjacent genes, and heterologous expression of HiracinJM79, a sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, isolated from Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). **FEMS Microbiological Letter**, 270: 227–236, 2007.
- SARANTINOPOULOUS, P.; KALANTZOPOULOUS, G.; TSAKALIDOUS, E. Effects of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek feta Cheese. **International Journal Food Microbiology**, 76, 93 – 105, 2002.
- SATOMI, M. *et al.* Analysis of a 30 kbp plasmid encoding histidine decarboxylase gene in *Tetragenococcus halophilus* isolated from fish sauce. **International Journal Food Microbiology**, 126, 202–209, 2008.

- SCHLEIFER, R. H.; KILPPER-BÄLZ, R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nominate review as *Enterococcus faecalis*. **International Journal Systematic Bacteriology**, 34: 31 -34, 1984.
- SEMEDO, T. *et al.* Virulence factors in food, clinical and reference enterococci: a common trait in the genus? **Systematic Applied Microbiology**, 26, 13–22, 2003.
- SETTANNI, L. *et al.* Rapid differentiation and in situ detection of 16 sourdough Lactobacillus species by multiplex PCR. **Applied Environmental Microbiology**, 71, 3049–3059, 2005.
- SHALABY, A.R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. **Food Research International**, 29, 675-690, 1996.
- SHANKAR, V. *et al.* Infection derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. **Infection Immunology**, 67, 193 – 200, 1999.
- SHEPARD, B.D.; GILMORE, M.S. Differential expression of virulence-related genes in *Enterococcus faecalis* response to biological cues in serum and urine. **Infection Immunology**, 70, 4344–4352, 2002.
- SILLA SANTOS, M.H. Biogenic amines: their importance in foods. **International Journal of Food Microbiology**, 29, 213–231, 1996.
- SILVA, C.M.G.; GLÓRIA, M.B.A. Bioactive amines in chicken breast and thigh after slaughter and during storage at 4±1 °C and in chicken-based meat products. **Food Chemistry Volume** 78, 2, 241–248, 2002.
- SINGH, K.V. *et al.* In vivo testing of an *Enterococcus faecalis* *efaA* mutant and use of *efaA* homologs for species identification. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, 21, 323–331, 1998.
- STILES, M.E., RAMJI, N.W., PARADIS, D.C., Incidence and relationship of group D streptococci with other indicator organisms in meats. **Canadian Journal of Microbiology** 24, 1502– 1508, 1978.
- STILES, M.E.; HOLZAPFEL, W.H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal Food Microbiology**, 36: 1–29, 1997.
- SUZZI, G. *et al.* A survey of enterococci isolated from an artisanal goat's cheese (semicotto caprino). **Journal of applied microbiology**, 89, 2, 267 – 74, 2000.
- TAN, C.K. *et al.* Bacteremia caused by non-*faecalis* and non-*faecium* *Enterococcus* species at a Medical center in Taiwan, 2000 to 2008. **Journal of Infection**, 61: 34 – 43, 2010.

- TEIXEIRA, L.M.; FACKLAM, R.R. In: Murray, B. E. , Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Tenover, M. C., Tenover, R. H. (eds.). **Enterococcus**. Manual of Clinical Microbiology 8th ed., American Society for Microbiology Press. Washington, DC, EUA, 2003.
- TENDOLKAR, P. M. *et al.* Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. **Infection Immunology**, 72: 6032 – 6039, 2004.
- TIL, H.P. *et al.* Acute and subacute toxicity of tyramine, spermidine, spermine, putrescine and cadaverine in rats. **Food Chemical Toxicology**; 35, 3–4, 337–48, 1997.
- TORRES, C. *et al.* VanA-mediated vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. in sewage. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, 33: 553–561, 1994.
- VALENZUELA, A. S. *et al.* Risk factors in enterococci isolated from foods in Morocco: Determination of antimicrobial resistance and incidence of virulence traits. **Food and Chemical Toxicology**, 46: 2648–2652, 2008.
- VALENZUELA, A.S. *et al.* Isolation and identification of *Enterococcus faecium* from seafoods: Antimicrobial resistance and production of bacteriocin-like substances. **Food Microbiology**, 27: 955-961, 2010.
- VANCANNEYT, M. *et al.* Intraspecies genomic group in *Enterococcus faecium* in their correlation with origin and pathogenicity. **Applied and Environmental Microbiology**, 68: 1381-1391, 2002.
- VANKERCKHOVEN, V. *et al.* Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA* and *hyl* genes in Enterococci and survey for virulence determinants among European Hospital isolates of *Enterococcus faecium*. **Journal Clinical Microbiology**, 42 (10): 4473 – 4479, 2004.
- VIGNAROLI, C. *et al.* Multidrug-Resistant Enterococci in Animal Meat and Faeces and Co-Transfer of Resistance from an *Enterococcus durans* to a Human *Enterococcus faecium*. **Current Microbiology**, 62, 5, 1438-1447, 2011.
- WERNER, G. *et al.* Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Eurosurveillance*, 13, 1-11, 2008. Disponível em: <http://www.eurosurveillance.org> Acesso 05 Maio 2012.
- YONGMEI, L. *et al.* Biogenic amines in Chinese soy sauce. **Food Control**, 20, 6, 593–7, 2009.
- YOUSIF, N.M.K. *et al.* Molecular characterization, technological properties and safety aspects of enterococci from Husswa, an African fermented sorghum product. **Journal of applied microbiology**, 98, 216 – 228, 2005.

- ZANELLA, R.C. *et al.* First confirmed case of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* with vanA phenotype from Brazil: isolation from a meningitis case in São Paulo. **Microbial Drug Resistance**, 2, 159 -162, 1999.

APÊNDICE A – TABELA GERAL DA DISSERTAÇÃO

| AMOSTRAS | IDENTIFICAÇÃO | ORIGEM | RESISTÊNCIA | VIRULÊNCIA | | | | | | | | | BACTERIOCINA | | | AMINAS BIOGÊNICAS | |
|----------|-------------------------|--------|-----------------------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------------|-------------------------|-------------------|-------------------|----------|
| | | | | <i>agg</i> | <i>gelE</i> | <i>cylM</i> | <i>cylB</i> | <i>cylA</i> | <i>cpd</i> | <i>cob</i> | <i>cad</i> | <i>ccf</i> | <i>S. aureus</i> | <i>L. monocytogenes</i> | <i>Salmonella</i> | Histidina | Tiramina |
| A1/9 | <i>E. faecalis</i> | Frango | Eri, tet | POS | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | POS | POS | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG |
| A2/7 | <i>E. faecalis</i> | Frango | Eri, tet, Clin | POS | POS | NEG | NEG | POS | POS | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG |
| A3/4 | <i>E. faecalis</i> | Frango | Eri, tet, Clin, estrep | POS | NEG | POS | POS | POS | POS | POS | POS | POS | NEG | POS | NEG | NEG | POS |
| A3/8 | <i>E. faecalis</i> | Frango | Eri, tet, Clin, estrep | POS | POS | NEG | NEG | NEG | POS | POS | POS | POS | POS | NEG | NEG | NEG | NEG |
| A4/3 | <i>E. faecalis</i> | Frango | Eri, tet, Clin, estrep | POS | POS | NEG | POS | NEG | POS | POS | POS | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG |
| A4/6 | <i>E. casseliflavus</i> | Frango | Eri, tet, clin | POS | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | POS | POS | POS | NEG | POS | NEG | NEG | NEG |
| A4/7 | <i>E. faecium</i> | Frango | Pen, eri, tet, imp, clin | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | POS | POS | POS | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG |
| A4/8 | <i>E. faecalis</i> | Frango | Eri, tet, Clin, estrep | NEG | POS | NEG | POS | NEG | POS | POS | NEG | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG |
| A5/3 | <i>E. casseliflavus</i> | Frango | Tet, gen, clin | POS | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | POS | POS | POS | NEG | POS | NEG | NEG | NEG |
| A5/4 | <i>E. casseliflavus</i> | Frango | Tet, gen, clin, estrep | POS | NEG | NEG | NEG | POS | NEG | NEG | POS | POS | POS | NEG | NEG | NEG | NEG |
| A5/7 | <i>E. gallinarum</i> | Frango | Gen, clin, estrep | POS | NEG | NEG | NEG | POS | NEG | NEG | POS | NEG | POS | NEG | NEG | NEG | NEG |
| A7/5 | <i>E. gilvus</i> | Frango | Eri, tet | POS | POS | NEG | NEG | NEG | POS | NEG | POS | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG |
| A11/3 | <i>E. faecalis</i> | Frango | Eri, tet, clo, clin, estrep | POS | POS | NEG | NEG | NEG | POS | POS | POS | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG |
| A11/7 | <i>E. faecalis</i> | Frango | Eri, tet, clo, clin, estrep | POS | POS | NEG | NEG | NEG | POS | POS | NEG | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | POS |
| A12/4 | <i>E. faecalis</i> | Frango | Eri, clin, estrep | POS | POS | NEG | NEG | NEG | POS | POS | POS | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG |
| A13/1 | <i>E. casseliflavus</i> | Frango | Tet, cipro, novob | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | POS | NEG | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG |
| A13/4 | <i>E. casseliflavus</i> | Frango | Tet, cipro, novob, clin | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | POS |
| A15/1 | <i>E. faecalis</i> | Frango | Eri, tet, clin | NEG | POS | NEG | NEG | NEG | POS | POS | NEG | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG |
| A15/4 | <i>E. faecalis</i> | Frango | Eri, tet, clo, clin | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | POS | NEG | NEG | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG |
| A17/5 | <i>E. faecium</i> | Frango | Pen, eri, tet, pm, clin | NEG | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | POS | NEG | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG |
| A18/2 | <i>E. faecalis</i> | Frango | Eri, tet, clin | POS | POS | NEG | NEG | NEG | POS | POS | POS | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG |
| A19/4 | <i>E. faecalis</i> | Frango | Eri, tet, clin | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | POS | NEG | POS | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | POS |
| A20/2G | <i>E. casseliflavus</i> | Frango | Eri, tet, clin | NEG | NEG | NEG | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG |
| A21/2 | <i>E. faecalis</i> | Frango | Eri, tet, clin | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | POS | NEG | POS | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | POS |
| A21/3 | <i>E. casseliflavus</i> | Frango | Eri, tet, clin | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | POS | POS | NEG | NEG | NEG | NEG |
| A22/1 | <i>E. faecalis</i> | Frango | Eri, tet, clin | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | POS | POS | POS | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | POS |

| AMOSTRAS | IDENTIFICAÇÃO | ORIGEM | RESISTÊNCIA | VIRULÊNCIA | | | | | | | | | BACTERIOCINA | | | AMINAS BIOGÊNICAS | |
|----------|-------------------------|--------|---------------------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------------|-------------------------|-------------------|-------------------|----------|
| | | | | <i>agg</i> | <i>gelE</i> | <i>cylM</i> | <i>cylB</i> | <i>cylA</i> | <i>cpd</i> | <i>cob</i> | <i>cad</i> | <i>ccf</i> | <i>S. aureus</i> | <i>L. monocytogenes</i> | <i>Salmonella</i> | Histidina | Tiramina |
| A22/2G | <i>E. durans</i> | Frango | Eri, tet, Imp, clin | POS | POS | NEG | NEG | NEG | POS | POS | NEG | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG |
| A24/4 | <i>E. faecalis</i> | Frango | Eri, tet, clin | POS | NEG | NEG | POS | NEG | POS | NEG | POS | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | POS |
| LPB2/1 | <i>E. faecalis</i> | Leite | Eri, tet, clin | POS | POS | POS | POS | POS | POS | POS | POS | POS | NEG | POS | NEG | NEG | POS |
| LPC7/6 | <i>E. faecalis</i> | Leite | Eri, tet, clo, clin | POS | POS | POS | POS | NEG | POS | POS | POS | POS | NEG | POS | NEG | NEG | POS |
| A2/2 | <i>E. faecalis</i> | Frango | Resistência intermediária | POS | POS | NEG | NEG | NEG | POS | NEG | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG |
| A2/5 | <i>E. faecalis</i> | Frango | Resistência intermediária | POS | POS | NEG | NEG | NEG | POS | NEG | POS | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | POS |
| A2/10 | <i>E. faecium</i> | Frango | Resistência intermediária | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG |
| A4/1 | <i>E. faecalis</i> | Frango | Resistência intermediária | POS | POS | NEG | POS | NEG | POS | NEG | POS | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG |
| A9/1 | <i>E. casseliflavus</i> | Frango | Resistência intermediária | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | POS | POS | POS | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | POS |
| A9/7 | <i>E. faecalis</i> | Frango | Resistência intermediária | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | POS | NEG | POS | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | POS |
| A11/8 | <i>E. faecalis</i> | Frango | Resistência intermediária | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | POS | NEG | POS | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG |
| A17/1 | <i>E. faecalis</i> | Frango | Resistência intermediária | POS | POS | NEG | NEG | NEG | POS | NEG | POS | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | POS |
| A17/3 | <i>E. faecalis</i> | Frango | Resistência intermediária | POS | POS | NEG | NEG | NEG | POS | NEG | POS | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG |
| LPC1/5 | <i>E. faecalis</i> | Leite | Resistência intermediária | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | POS | NEG | POS | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG |
| LPC1/9 | <i>E. faecalis</i> | Leite | Resistência intermediária | POS | NEG | NEG | POS | NEG | POS | POS | POS | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | POS |
| LPB2/6 | <i>E. faecalis</i> | Leite | Resistência intermediária | NEG | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | POS | NEG | NEG | NEG | NEG |
| LPB2/9 | <i>E. faecalis</i> | Leite | Resistência intermediária | NEG | NEG | NEG | POS | NEG | POS | POS | NEG | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | POS |
| LPB2/2 | <i>E. durans</i> | Leite | Resistência intermediária | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | POS | POS | POS | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | POS |

| AMOSTRAS | IDENTIFICAÇÃO | ORIGEM | RESISTÊNCIA | VIRULÊNCIA | | | | | | | | | BACTERIOCINA | | | AMINAS BIOGÊNICAS | |
|----------|-------------------------|--------|---------------------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------------|-------------------------|-------------------|-------------------|----------|
| | | | | <i>agg</i> | <i>gelE</i> | <i>cylM</i> | <i>cylB</i> | <i>cylA</i> | <i>cpd</i> | <i>cob</i> | <i>cad</i> | <i>ccf</i> | <i>S. aureus</i> | <i>L. monocytogenes</i> | <i>Salmonella</i> | Histidina | Tiramina |
| LPB4/2 | <i>E. faecalis</i> | Leite | Resistência intermediária | POS | NEG | NEG | POS | NEG | POS | NEG | POS | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | POS |
| LPB4/8 | <i>E. faecalis</i> | Leite | Resistência intermediária | POS | POS | NEG | NEG | NEG | POS | POS | POS | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | POS |
| LPC8/9 | <i>E. durans</i> | Leite | Resistência intermediária | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | POS | NEG | POS | NEG | NEG | NEG |
| LPC10/10 | <i>E. casseliflavus</i> | Leite | Resistência intermediária | NEG | NEG | POS | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | POS | NEG | POS | NEG | NEG | NEG |
| A10/1 | <i>E. gilvus</i> | Frango | Sensíveis a todos | POS | POS | NEG | NEG | NEG | POS | POS | POS | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG |
| A3/7 | <i>E. hirae</i> | Frango | Sensíveis a todos | POS | POS | NEG | NEG | NEG | POS | POS | POS | POS | POS | NEG | NEG | NEG | POS |
| A7/2 | <i>E. faecalis</i> | Frango | Sensíveis a todos | NEG | POS | NEG | NEG | NEG | POS | POS | POS | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | POS |
| A7/4 | <i>E. faecalis</i> | Frango | Sensíveis a todos | POS | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | POS | POS | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | POS |
| A7/6 | <i>E. gilvus</i> | Frango | Sensíveis a todos | POS | POS | NEG | NEG | NEG | POS | POS | POS | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG |
| A8/4 | <i>E. casseliflavus</i> | Frango | Sensíveis a todos | NEG | POS | NEG | NEG | NEG | POS | POS | NEG | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | POS |
| A8/6B | <i>E. casseliflavus</i> | Frango | Sensíveis a todos | POS | POS | NEG | NEG | POS | NEG | POS | NEG | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | POS |
| A8/9 | <i>E. casseliflavus</i> | Frango | Sensíveis a todos | POS | POS | NEG | NEG | POS | POS | POS | NEG | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG |
| A12/1 | <i>E. casseliflavus</i> | Frango | Sensíveis a todos | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | POS | NEG | NEG | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG |
| A12/7 | <i>E. casseliflavus</i> | Frango | Sensíveis a todos | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | POS | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG |
| A13/2 | <i>E. gilvus</i> | Frango | Sensíveis a todos | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | POS | POS | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG |
| A14/2 | <i>E. faecium</i> | Frango | Sensíveis a todos | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | NEG | POS | NEG | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | POS |
| A16/4 | <i>E. faecalis</i> | Frango | Sensíveis a todos | POS | POS | NEG | NEG | NEG | POS | POS | NEG | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | POS |
| A17/2 | <i>E. faecalis</i> | Frango | Sensíveis a todos | POS | POS | NEG | POS | NEG | NEG | POS | POS | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | POS |
| A23/4 | <i>E. faecalis</i> | Frango | Sensíveis a todos | NEG | POS | NEG | NEG | NEG | POS | POS | POS | POS | NEG | NEG | NEG | NEG | POS |

ERI – eritromicina, TET – tetraciclina, CLIN – clindamicina, ESTREP – estreptomicina, GEN – gentamicina, CLO – clorafenicol, POS – positivo, NEG – Negativo.
 Detecção dos genes de virulência, *E. faecalis* ATCC 29212 e *E. faecium* ATCC 19434 como controle positivo e negativo respectivamente. Detecção dos genes da descarboxilase *E. faecalis* ATCC 29212 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 como controle positivo e negativo respectivamente. Testes da atividade antimicrobiana *Lactococcus lactis* ATCC 11454 como controle positivo e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ATCC 14365 como controle negativo.