

SUELY APARECIDA PIMENTA FRACALANZZA

**IDENTIFICAÇÃO, RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS
E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
ENTEROCOCCUS ISOLADOS DE ALIMENTOS**

PGVS/INCQS
FIOCRUZ
2007

**IDENTIFICAÇÃO, RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DE *ENTEROCOCCUS* ISOLADOS DE ALIMENTOS**

SUELY APARECIDA PIMENTA FRACALANZZA

Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Fundação Oswaldo Cruz

Orientadoras: Prof^a Dra. Lúcia Martins Teixeira
Dra. Paola Cardarelli Leite

Rio de Janeiro
2007

IDENTIFICAÇÃO, RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DE *ENTEROCOCCUS* ISOLADOS DE ALIMENTOS

Suely Aparecida Pimenta Fracalanza

Tese submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor.

Aprovado:

_____ (UFF)

Prof. Dra. Silvia Susana Bona de Mondino

_____ (UERJ)

Prof. Dr. João Ramos Costa Andrade

_____ (INCQS/FIOCRUZ)

Prof. Dra. Paola Cardarelli Leite

Orientadoras _____

Prof. Dra. Lúcia Martins Teixeira

Dra. Paola Cardarelli Leite

Rio de Janeiro

2007

Fracalanza, Suely Aparecida Pimenta

Identificação, resistência a antimicrobianos e caracterização molecular de *Enterococcus* isolados de alimentos./ Suely Aparecida Pimenta Fracalanza. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2007.

xviii, 158p.; fig., tab.

Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2007. Orientadoras: Lúcia Martins Teixeira e Paola Cardarelli Leite.

1. *Enterococcus*
2. Alimentos
3. Resistência aos antimicrobianos
4. Caracterização molecular de genes de resistência. I. Título

Identification, antimicrobial resistance and molecular characterization of *Enterococcus* isolated from food

**Aos meus pais Lauro (onde voce estiver)
Maria (minha amada) e meus irmãos
Lauro, Sonia e Celma sem os quais
nada teria sentido.**

**Ao meu marido Sergio e meus filhos
Daniel, Juliana e Flávia, razões absolutas
deste coração.**

**“Se não houver frutos,
Valeu a beleza das flores,
Se não houver flores,
Valeu a sombra das folhas,
Se não houver folhas,
Valeu a intenção da semente”**

Henfil

AGRADECIMENTOS

Ao concluir mais esta etapa de minha formação profissional desejo expressar meu reconhecimento às pessoas e instituições que participaram e contribuíram para a realização deste projeto.

Nesta oportunidade, agradeço sinceramente a Deus que em sua infinita bondade e presença constante proporcionou mais esta realização em minha vida.

Aos meus pais, Lauro e Maria, agradeço pela vida e por tudo o que sou.

Aos meus irmãos Lauro, Sonia e Celma por me completarem. Pelo carinho, incentivo e confiança na realização deste trabalho.

Ao Sergio, e aos nossos filhotes Daniel, Juliana e Flávia, pelo carinho, paciência e incentivo inestimáveis durante todo o tempo, que deles roubei para realizar este meu sonho.

A professora Lúcia Martins Teixeira, orientadora deste projeto pela dedicação, paciência e amizade de longa data, sempre com a preocupação em manter todas as condições para a realização deste trabalho. Meu agradecimento especial.

A Dra. Paola Cardarelli Leite, cuja presença, amizade, incentivo e orientação inestimáveis e constantes em todos os momentos deste trabalho e em todos os dias de nossa convivência, agradeço especialmente.

As meninas super poderosas do Laboratório de Biologia Molecular do Depto. de Microbiologia Renata, Érica, Regina e Patricia agradeço pelo agradável convívio, paciência, incentivo e apoio principalmente, nos momentos de cansaço e dificuldades.

A Marise Sacramento de Magalhães pela amizade sincera, incentivo e agradável convívio durante todos estes anos de confiança, torcida e apoio.

Aos amigos Rita, Christina, Marília, Mara, Maria Adelaide, Leonardo e Miguel pelo carinho, incentivo, paciência e presença de todos os dias.

Aos meninos do Laboratório de Apoio do Depto. de Microbiologia Sineide, Monica, Kátia, Eliete, Francisco, Jorge, Edson, Marcos, Will e Leonardo, por todo o apoio na infra-estrutura para a realização da parte prática deste trabalho.

A professora e amiga Vania Lucia Carreira Merquior pela atenção, dedicação, apoio e amizade de longa data.

Ao Felipe Piedade, agradeço por tudo que, pacientemente, me ensinou e ajudou, sempre incansável atencioso.

As meninas do laboratório da Profa. Lúcia Teixeira, Filomena, Gisele, Jaqueline e Camille pelo carinho, apoio e agradável convívio durante minha permanência no Instituto de Microbiologia Pro. Paulo de Góis da Universidade Federal do Rio de Janeiro Ao Dr. Andre Gemal Diretor do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, pelo grande incentivo à Pós Graduação e ao desenvolvimento dos Recursos Humanos desta instituição a qual com muito orgulho pertencço.

A Dra. Celia Romão chefe do Depto. de Microbiologia, pela compreensão e apoio durante todo o período de realização deste trabalho.

RESUMO

Os enterococos são patógenos com considerável capacidade de expressar resistência a vários antimicrobianos. Sua natureza ubiqüitária e resistência às condições ambientais adversas explicam sua habilidade para colonizar diferentes habitats e seu potencial para se disseminar com facilidade através da cadeia alimentar.

No presente estudo avaliamos a distribuição das espécies e a susceptibilidade aos antimicrobianos entre enterococos isolados a partir de alimentos de origem animal (carne de frango e leite pasteurizado) obtidos de supermercados e feiras livres no Rio de Janeiro / RJ, Brasil. As seguintes espécies foram identificadas, entre 167 amostras isoladas obtidos de carne de frango e 127 obtidas de leite pasteurizado: *E. faecalis* (184 – 62,6%), *E. casseliflavus* (51 – 17,3%), *E. durans* (19 – 6,5%), *E. gallinarum* (9 – 3%), *E. gilvus* (7 – 2,4%), *E. faecium* 6 – 2%), *E. hirae* (4 – 1,4%) e *E. sulfureus* (3 – 1%). Os percentuais de resistência aos antimicrobianos entre os isolados foram: 32,1% à tetraciclina; 23,3% à eritromicina; 11,3% à estreptomicina; 0,7% ao cloranfenicol; 3,9% à gentamicina, 2,1% ao imipenem; 1,1% à norfloxacin; 0,7% à ciprofloxacina, nitrofurantoína e penicilina e 0,4% /à ampicilina. Resistência intermediária foi detectada em percentuais que variaram de 0,5% para a linezolida até 62% para a eritromicina. Nenhuma das amostras bacterianas apresentou resistência aos glicopeptídeos testados, vancomicina e teicoplanina. Resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos foi observada em 13,1% dos isolados. Multirresistencia aos antimicrobianos foi observada nas espécies *E. faecalis*, *E. casseliflavus*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. durans* e *E. gilvus*.

Entre os enterococos isolados de carne de frango e leite pasteurizado foi possível detectar a presença do gene *ermB*, responsável pela resistência à eritromicina entre *E. faecalis*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* e *E. durans*. Os genes *tetL*, *tetM* e *tetO*, foram detectados nas espécies *E. faecalis*, *E. casseliflavus* e *E. gallinarum* isoladas a partir carne de frango.

A diversidade genética de *E. faecalis* (54 isolados) apresentando características de multirresistencia aos antimicrobianos, procedentes de carne de frango e de leite pasteurizado foi avaliada através da análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico utilizando a endonuclease de restrição *SmaI* e eletroforese em campo pulsado (PFGE). Foi detectado um número elevado (39) de diferentes perfis de fragmentação do DNA cromossômico. Deste total, a maioria (30) foi constituída por apenas um isolado, revelando um elevada diversidade genética.

ABSTRACT

The enterococci are important nosocomial pathogens with a remarkable capacity of expressing resistance to several antimicrobial agents. Their ubiquitous nature and resistance to adverse environmental conditions take account for their ability to colonize different habitats and for their potential for easy spreading through the food chain. In the present study we evaluated the distribution of species and antimicrobial susceptibility among enterococcal isolates recovered from food obtained in retail stores in Rio de Janeiro, Brazil. The following species were identified among 167 isolates obtained from poultry meat and 127 from pasteurized milk: *Enterococcus faecalis* (62.6%), *Enterococcus casseliflavus* (17.3%), *Enterococcus durans* (6.5%), *Enterococcus gallinarum* (3.0%), *Enterococcus gilvus* (2.4%), *Enterococcus faecium* (2.0%), *Enterococcus hirae* (1.4%), and *Enterococcus sulfureus* (1.0%). The overall percentages of antimicrobial resistant isolates were: 31.2 % to tetracycline, 23.8% to erythromycin, 11.3% to streptomycin, 4.3% to chloramphenicol, 3.9% to gentamicin, 1.4% to norfloxacin, 1.1% to imipenem, 0.7% to ciprofloxacin, nitrofurantoin, and penicillin and 0.4% to ampicillin. Intermediate resistance was detected in frequencies varying from 0.5% for linezolid to 58.2% for erythromycin. None of the isolates showed resistance to glycopeptides. High-level resistance to aminoglycosides was observed in 13.1% of the isolates. Multiresistance was observed in *E. faecalis*, *E. casseliflavus*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. durans* and *E. gilvus*. The presence of the gene *ermB*, coding for the resistance to erythromycin, was detected by PCR in *E. faecalis*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* and *E. durans*. The presence of the genes *tetL*, *tetM* and *tetO*, associated with resistance to tetracycline, were detected by PCR, among *E. faecalis*, *E. casseliflavus*, and *E. gallinarum* isolatede from poultry meat. The genetic diversity among multiresistant *E. faecalis* (54 isolates) from poultry meat and pasteurized milk, was evaluated by the analysis of the cromossomic DNA fragmentation profile by PFGE after cleavage with *SmaI* by PFGE. A variety (39) of different cromossomic DNA fragmentation profile or clonal complexes was found among multiresistant *E. faecalis* from poultry meat and milk, indicating a high level of genetic diversity.

LISTA DE ABREVIATURAS

RNA – Ácido ribonucleico
DNA – Ácido desoxiribonucleico
BAL – Bactérias ácido lácticas
PYR – L-pirrolidonil- β -naftilamida
LAP – L-leucina- β -naftilamida
UFC – Unidade formadora de colônia
IPAs – Ilhas de patogenicidade
VREs – “Vancomycin-Resistant Enterococcus”
CMI – Concentração mínima inibitória
EMAs – Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos
HLSR – “High-level streptomycin resistance”
HLGR – “High-level gentamicin resistance”
GRE – “Gentamicin-Resistant Enterococcus”
HICPAC – Hospital Infection Control Practices Advisory Committee
PFGE – Eletroforese em gel submetido a campo pulsado (PFGE)
PCR – Reação da polimerase em cadeia (PCR)
FDA – “Food and Drug Administration”
BHI – Caldo BHI (Brain Heart Infusion)
PYRase – Pirrolidoniarilamidase
THB – “Caldo Todd Hewitt”
MGP – Metil- α -glicopiranosídeo
MMA – “Motility Medium Agar”
HIB – Caldo infusão de coração
SDS – Dodecil sulfato de sódio
PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida
TSA – Ágar tripticaseína soja
CLSI – “Clinical and Laboratory Standard Institute”
MHA – Ágar Müeller Hinton
CQ – Controle de Qualidade
HLR-A – Resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos
HLR-GE – Resistência a níveis elevados de gentamicina
HLR-ST – Resistência a níveis elevados de estreptomicina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Dendrograma representando os índices de similaridade entre os perfis de proteínas de amostras de <i>Enterococcus</i> spp isoladas de carne de frango e de leite pasteurizado.....	83
Figura 2: Gel ilustrativo dos perfis de proteínas totais de amostras caracterizadas como <i>E. casseliflavus</i> que apresentaram atipias fisiológicas.....	84
Figura 3: Gel ilustrativo dos perfis de proteínas totais de amostras caracterizadas como <i>E. gallinarum</i> e <i>E. faecium</i>	85
Figura 4: Gel ilustrativo dos perfis de proteínas totais de amostras caracterizadas como <i>E. gilvus</i>	86
Figura 5: Gel ilustrativo dos perfis de proteínas totais de amostras caracterizadas como <i>E. faecalis</i> , que apresentaram atipias fisiológicas.....	87
Figura 6: Gel ilustrativo dos perfis de proteínas totais de amostras caracterizadas como <i>E. durans</i>	88
Figura 7: Gel ilustrativo dos perfis de proteínas totais de amostras caracterizadas como <i>E. hirae</i>	89
Figura 8: Gel ilustrativo da amplificação pela PCR de regiões conservadas do 16S rRNA, específicas para o gênero <i>Enterococcus</i> spp.....	90
Figura 9: Gel ilustrativo da amplificação pela PCR do gene <i>ddl</i> _{<i>E. faecalis</i>} específico para a identificação de <i>E. faecalis</i>	91
Figura 10: Gel ilustrativo da amplificação pela PCR do gene <i>ddl</i> _{<i>E. faecium</i>} específico para a identificação de <i>E. faecium</i>	91

Figura 11: Gel ilustrativo da amplificação pela PCR do gene espécie-específico dos genes de <i>E. gallinarum</i> (<i>vanC1</i>) e <i>E. casseliflavus</i> (<i>vanC2-vanC3</i>).....	92
Figura 12: Gel ilustrativo da amplificação pela PCR dos genes que codificam para a resistência a aminoglicosídeos (<i>aac(6')-Ie-aph(2'')</i> - <i>Ia</i> / 348 pb e (<i>aac(6')-Ie-aph(2'')</i> - <i>Ia</i> / 523 pb) em amostras de <i>Enterococcus</i> spp.....	94
Figura 13: Gel ilustrativo da amplificação pela PCR do gene <i>ermB</i> (633pb) que codifica para a expressão da resistência à eritromicina entre <i>Enterococcus</i> spp.....	97
Figura 14: Gel ilustrativo da amplificação pela PCR do gene <i>tetL</i> (267 pb), que codifica para a expressão da resistência à tetraciclina entre <i>Enterococcus</i> spp.....	98
Figura 15: Gel ilustrativo da amplificação pela PCR dos genes <i>tetK</i> (169 pb), <i>tetL</i> (267 pb) e <i>tetM</i> (406 pb) e <i>tetO</i> (515 pb), que codificam para a expressão da resistência à tetraciclina entre os <i>Enterococcus</i> spp.....	101
Figura 16: Gel ilustrativo da amplificação pela PCR dos genes <i>asa1</i> (213 pb) e <i>gelE</i> (375 pb) que codificam para a produção da substância de agregação e a gelatinase respectivamente.....	103
Figura 17: Gel ilustrativo da amplificação pela PCR do gene <i>esp</i> (510 pb), que codifica para a expressão das proteínas de superfície entre <i>Enterococcus</i> spp.....	104
Figura 18: Gel ilustrativo da amplificação pela PCR do gene <i>cyl</i> (688 pb) que codifica para a produção de citolisina entre <i>Enterococcus</i> spp..	105

Figura 19: Dendrograma representativo dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico obtidos por eletroforese em campo pulsado (PFGE) após digestão pela enzima *Sma*I de *E. faecalis* multirresistentes obtidos de carne de frango e de leite pasteurizado..... 106

Figura 20: Gel ilustrativo dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico obtidos por eletroforese em campo pulsado (PFGE), após digestão com *Sma*I das amostras caracterizadas como *E. faecalis* multirresistentes. Estão indicadas as amostras dos complexos clonais **A, G, I e E**..... 107

Figura 21: Gel ilustrativo dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico obtidos por eletroforese em campo pulsado (PFGE), após digestão com *Sma*I das amostras caracterizadas como *E. faecalis* multirresistentes. Estão indicadas as amostras dos complexos clonais **B, C, F e H**..... 108

Figura 22: Gel ilustrativo dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico obtidos por eletroforese em campo pulsado (PFGE), após digestão com *Sma*I das amostras caracterizadas como *E. faecalis* multirresistentes. Estão indicadas as amostras dos complexos clonais **A, E e G**..... 111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características fenotípicas utilizadas para a identificação das espécies de <i>Enterococcus</i> e algumas espécies fisiologicamente relacionadas.....	39
Tabela 2: Descrição das amostras de carne crua de frango analisadas e resultados das culturas quantitativos para <i>Enterococcus</i> spp.....	56
Tabela 3: Descrição das amostras de leite pasteurizado analisadas e resultados das culturas quantitativas para <i>Enterococcus</i> spp.....	58
Tabela 4: Distribuição das espécies e fontes de isolamento entre <i>Enterococcus</i> isolados a partir de carne de frango e de leite pasteurizado.....	61
Tabela 5: Perfis fenotípicos típicos e atípicos entre as amostras bacterianas pertencentes às espécies de <i>Enterococcus</i> predominantes em carne de frango.....	62
Tabela 6: Perfis fenotípicos típicos e atípicos entre espécies de <i>Enterococcus</i> de baixa frequência de isolamento a partir de carne de frango.....	65
Tabela 7: Perfis fenotípicos típicos e atípicos entre espécies de <i>Enterococcus</i> isolados a partir de leite pasteurizado.....	66
Tabela 8: Susceptibilidade aos antimicrobianos de amostras das diferentes espécies de <i>Enterococcus</i> spp isoladas de carne de frango e leite pasteurizado.....	69
Tabela 9: Susceptibilidade aos antimicrobianos das amostras das diferentes espécies de <i>Enterococcus</i> spp isoladas de carne de frango.....	72

Tabela 10: Perfis de resistência aos antimicrobianos entre as espécies de <i>Enterococcus</i> spp isoladas de carne de frango.....	74
Tabela 11: Susceptibilidade aos antimicrobianos de amostras das diferentes espécies de <i>Enterococcus</i> spp isoladas de leite pasteurizado.....	75
Tabela 12: Perfis de resistência aos antimicrobianos entre as espécies de <i>Enterococcus</i> spp isoladas de leite pasteurizado.....	77
Tabela 13: Ocorrência de resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos entre <i>Enterococcus</i> spp isolados a partir de carne de frango e leite pasteurizado.....	78
Tabela 14: Distribuição dos perfis de multirresistência entre as diferentes espécies de <i>Enterococcus</i> spp isolados de carne de frango e de leite pasteurizado.....	80
Tabela 15: Distribuição dos genes de resistência à eritromicina detectados pela PCR, em amostras de <i>Enterococcus</i> spp isoladas de carne de frango e de leite pasteurizado.....	96
Tabela 16: Distribuição dos genes de resistência à tetraciclina detectados pela PCR entre amostras de <i>Enterococcus</i> spp isoladas de carne de frango.....	99
Tabela 17: Distribuição dos genes de resistência à tetraciclina, detectados pela PCR entre <i>E. faecalis</i> e <i>E. durans</i> procedentes de leite pasteurizado.....	102
Tabela 18: Perfil de fragmentação do DNA cromossômico, genes detectados pela PCR, perfil de resistência aos antimicrobianos e atipias fisiológicas de <i>E. faecalis</i> isolados de carne de frango (A) e leite pasteurizado (LP).....	113

SUMÁRIO

1 Introdução	1
2 Objetivos	31
3 Materiais e métodos	32
3.1 Amostras de alimentos.....	32
3.1.1 Amostras de carne de frango.....	32
3.1.2 Amostras de leite pasteurizado.....	33
3.1.3 Semeadura de amostras de alimentos.....	34
3.2 Caracterização morfo-fisiológica.....	34
3.2.1 Caracterização fenotípica do gênero.....	34
3.2.1.1 Características morfo-tintoriais.....	35
3.2.1.2 Produção da enzima catalase.....	35
3.2.1.3 Hidrólise da esculina em presença de bile.....	35
3.2.1.4 Hidrólise da L-pirrolidonil- β -naftilamida (PYR) e da L-leucina- β -naftilamida (LAP).....	36
3.3 Preservação das amostras bacterianas.....	36
3.4 Caracterização fenotípica da espécie.....	37
3.4.1 Produção de pigmento.....	37
3.4.2 Motilidade.....	37
3.4.3 Hidrólise da arginina.....	38
3.4.4 Utilização do piruvato de sódio.....	38
3.4.5 Tolerância ao telurito de potássio.....	38
3.4.6 Utilização de carboidratos.....	40
3.5 Análise do perfil de proteínas totais através da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	40
3.5.1 Preparação dos extratos contendo as proteínas celulares totais.....	40
3.5.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).....	41
3.6 Determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos.....	42
3.6.1 Teste da difusão em agar.....	42

3.7 Caracterização molecular através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR).....	43
3.7.1 Obtenção, extração do DNA e reação em cadeia da polimerase.....	43
3.7.1.1 Lise das células.....	44
3.7.1.2 Tratamento com RNase.....	44
3.7.1.3 Precipitação de proteínas.....	44
3.7.2 Detecção do gênero <i>Enterococcus</i> segundo a metodologia preconizada por Deasy et al., 2000.....	44
3.7.3 Detecção de <i>E. faecalis</i> e <i>E. faecium</i> segundo metodologia preconizada por Dutka-Malen et al., 1995.....	45
3.7.4 Detecção dos genes codificadores de resistência à vancomicina.....	46
3.7.5 Detecção dos genes codificadores de resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos.....	48
3.7.6 Detecção de genes responsáveis pelos diferentes fenótipos de resistência à eritromicina.....	49
3.7.7 Detecção dos genes codificadores de resistência à tetraciclina.....	50
3.7.8 Detecção dos genes de virulência.....	51
3.8 Análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico através da eletroforese em campo pulsado (PFGE).....	52
4 Resultados	55
4.1 Isolamento de <i>Enterococcus</i> a partir dos alimentos analisados...	55
4.2 Caracterização fisiológica das amostras bacterianas.....	59
4.3 Susceptibilidade aos antimicrobianos.....	68
4.4 Análise dos perfis de proteínas totais (SDS-PAGE).....	82
4.5 Caracterização molecular.....	90
4.5.1 Caracterização de gênero e espécie através de técnicas de PCR.....	90
4.5.2 Detecção dos genes que codificam a resistência à vancomicina.....	93
4.5.3 Detecção dos genes codificadores de resistência aos aminoglicosídeos.....	93

4.5.4 Detecção dos genes responsáveis pelos diferentes fenótipos de resistência à eritromicina.....	95
4.5.5 Detecção dos genes codificadores de resistência à tetraciclina.....	97
4.5.6 Detecção dos genes de virulência.....	103
4.5.7 Análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico através da eletroforese em campo pulsado (PFGE).....	105
5 Discussão.....	116
6 Conclusões.....	131
7 Referências bibliográficas.....	133

1 INTRODUÇÃO

Durante muitos anos o grupo de microrganismos hoje denominados enterococos fizeram parte do gênero *Streptococcus*, onde eram considerados como uma categoria entre os estreptococos do grupo D, segundo esquema sorológico de identificação de Lancefield (1933) e representados por duas espécies denominadas de *Streptococcus faecalis* e *Streptococcus faecium*. O gênero *Enterococcus* foi oficialmente estabelecido quando Farrow et al. (1983) e Shleifer & Kilpper-Bälz (1984), através de estudos envolvendo hibridização DNA-DNA e DNA-RNA, propuseram a transferência definitiva dessas duas espécies para um novo gênero, sob as denominações de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*. Os avanços dos estudos filogenéticos e moleculares baseados em estudos de reassociação DNA-DNA, sequenciamento do gene que codifica a subunidade 16S RNA ribossômico (rRNA) e de análise dos perfis de proteínas totais têm possibilitado a inclusão neste novo gênero de um grande número de novas espécies (Facklam et al., 2002), sendo, atualmente, reconhecidas cerca de 30 espécies de *Enterococcus* (Teixeira et al., 2007).

O gênero *Enterococcus* compreende um grupo bastante complexo e importante de microrganismos, principalmente, no que se refere ao seu relacionamento com os seres humanos (Facklam et al., 2002). Constituem uma grande proporção das bactérias 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, na água, em plantas e alimentos (Giraffa, 2003; Klein, 2003). Este gênero é o mais controverso dentro do grupo das bactérias ácido-láticas (BAL) e o fato tem proporcionado um aumento significativo dos estudos, com o objetivo de avaliar não somente as peculiaridades, como também as principais características e significado destes microrganismos, que tem a sua robustez como principal razão para o sucesso de sua sobrevivência e persistência em ambientes microbiologicamente tão diversos (Foulquié-Moreno et al., 2006). São resistentes à dessecação, ao aquecimento, aos agentes sanitizantes e ainda muitas vezes capazes de competir eficientemente por nutrientes e espaço físico nas mais diferentes situações (Stiles, 2002). São formalmente classificados como microrganismos fecais, o que significa que, a despeito de sua ampla disseminação, seu habitat predominante é o trato intestinal. Uma perfeita adaptação às rigorosas condições intestinais proporciona aos

enterococos excelentes oportunidades para sobrevivência e desenvolvimento de suas atividades, tanto em condições benéficas como naquelas extremamente adversas. A contaminação fecal parece ser uma das principais rotas para sua disseminação, especialmente entre os vários tipos de alimentos, com ênfase para os de origem animal.

Até bem pouco tempo, sua presença em alimentos era considerada somente como indicadora de contaminação fecal e, portanto, como consequência de precárias condições higiênico-sanitárias. Atualmente, estes conceitos são observados com cautela em função das importantes aplicações que algumas espécies representantes deste gênero de microrganismos passaram a ter em tecnologia de alimentos. Nestes casos, passaram a ser considerados não como contaminantes, mas como parte da microbiota destes produtos onde são utilizados intencionalmente (Franz et al., 1999).

Descrição e caracterização do gênero

Os microrganismos 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 et al., 1999). São capazes de hidrolisar a esculina na presença de sais biliares, geralmente toleram altas concentrações de NaCl (6,5%) e possuem o antígeno D de Lancefield, com algumas exceções (Facklam et al., 1989; Devriese et al., 1990; Collins et al., 1991).

Uma característica importante deste gênero é a produção das enzimas pirrolidonilarilamidase (PYRase) e leucina aminopeptidase (LAPase), embora ocorram exceções em algumas espécies. Possuem metabolismo homofermentativo, pois produzem ácido lático como produto final do metabolismo da glicose, sem produção de gás, e o conteúdo G + C do DNA varia de 37 a 45 mol% (Teixeira et al., 2003).

Habitat

Os enterococos são microrganismos amplamente distribuídos no meio ambiente em habitats bastante diversificados. Fazem parte natural do grupo de bactérias autóctones associadas à microbiota do trato gastro-intestinal de seres humanos e outros mamíferos. Uma vez liberados no meio ambiente oriundos de dejetos ou de águas de esgotos não tratadas, os enterococos colonizam diferentes “nichos” com excepcional habilidade para sobreviver e se desenvolver nos ambientes hostis extra-enterícos (Murray,1990; Jett, et al., 1994 Morrison et al., 1997).

De modo geral, nos mamíferos, o habitat natural dos enterococos é a parte baixa do trato gastrointestinal (aproximadamente $10^5 - 10^7$ UFC/g de fezes - Unidades Formadoras de Colônias/grama) de fezes mas, com sua eficiência em adaptação, a possibilidade de colonização se estende para a parte alta do trato gastrointestinal, assim como o trato genito-urinário e cavidade oral, sendo encontrados colonizando 100% dos indivíduos adultos (Morrison et al., 1997; Kaizer, 2003). A ecologia e quais os fatores que promovem a colonização intestinal pelos enterococos ainda são obscuros. A espécie *E. faecalis* é isolada em aproximadamente 80% das infecções enquanto *E. faecium* na maioria das 20% restantes. As demais espécies são mais raras ou não foram, ainda relatadas como causa de infecções em seres humanos (Huycke et al., 1998)

A colonização de mamíferos pelas diferentes espécies de enterococos está sujeita a variações que podem ser associadas a diferentes fatores como a localização geográfica, dieta, idade, espécie de animal e também efeitos e variações sazonais. Considerando-se este potencial, diferenças significantes na distribuição dos enterococos têm sido observadas entre hospedeiros animais, assim como espécies predominantes têm sido observadas entre hospedeiros comuns (Knudtson et al., 1993).

Nenhuma das espécies de enterococos pode ser considerada absolutamente “espécie-específica”, mas algumas delas apresentam certo grau de especificidade em relação ao seu hospedeiro. Desta maneira, algumas espécies conhecidas são tipicamente associadas a determinados nichos no meio ambiente ou a determinadas espécies animais (*E. columbae* é específico de pombos, *E. asini* de asnos, *E. villorum* de suínos), enquanto *E. faecalis* e *E. faecium* são as mais amplamente distribuídas (Devriese et al.,1992).

Estudos realizados por Stern e colaboradores (1994) demonstraram que a distribuição das espécies de enterococos encontradas no meio ambiente é diferente da distribuição destes microrganismos em seres humanos. Fatores como a localização geográfica e a dieta claramente influenciam a distribuição das espécies de enterococos, que fazem parte da microbiota do trato gastrointestinal. Em estudos comparativos sobre a frequência das diferentes espécies de enterococos nas fezes de indivíduos residentes em países como a Inglaterra, Escócia, Estados Unidos, Índia, Japão e Uganda, com suas respectivas e diferentes dietas, foi constatado que *E. faecium*, por exemplo, é a espécie mais frequente em países onde a dieta é predominantemente vegetariana, como é o caso da Índia, Japão e Uganda (Hill et al., 1971). Por outro lado, de modo geral, a espécie *E. faecalis* é encontrada sempre em proporções bem maiores que as demais nas avaliações epidemiológicas onde são comuns outros tipos de dietas (Chenowett et al., 1990; Kayser et al., 2003).

Os enterococos são considerados entre as bactérias mais comuns no meio ambiente (Kühn et al., 2000). Um panorama geral de sua ecologia, incluindo a presença em materiais fecais e sua capacidade de sobrevivência em condições hostis no meio extra-entérico, pode explicar sua ampla distribuição no meio ambiente e, naturalmente, sua presença em quase tudo o que cerca os seres humanos, inclusive água, alimentos, e medicamentos de origem vegetal (Iversen et al., 2000).

Muito embora pouco se saiba sobre a associação direta destes microrganismos com plantas, sabe-se que as espécies *Enterococcus casseliflavus* e *Enterococcus mundtii* podem estar relacionadas com plantas, tanto comestíveis como medicinais (Ulrich et al., 1998). Entretanto, a interpretação da presença destes microrganismos em alimentos de origem vegetal é difícil, uma vez que as espécies associadas às plantas podem ocorrer juntamente com espécies de enterococos sabidamente de origem fecal e ambiental, que contaminam estes alimentos (Devriese et al., 1995).

A contaminação pelos enterococos em alimentos de origem animal (carnes e produtos cárneos, leite e derivados) pode ser endógena ou exógena dependendo se a origem das bactérias for do próprio animal ou do meio ambiente, incluindo-se água, solo, equipamentos e operadores, que têm contato com os alimentos em alguma fase de sua preparação, distribuição e

consumo, sendo, portanto, esta relação bastante controversa e discutível. A contaminação dos alimentos de origem animal (aves, bovinos, ovinos e suínos) pode ocorrer tanto durante o processo de abate como também durante qualquer das outras fases do processamento destes tipos de produtos, envolvendo toda a manipulação, a estocagem e comercialização (Tiecco, 1992).

O processamento dos produtos cárneos tem início com os procedimentos de abate dos animais, iniciando-se nesta fase, portanto, a contaminação bacteriana inerente ao processo e que mesmo quando moderada deve ser considerada como prejudicial, uma vez que a composição deste tipo de alimento proporciona um meio de cultivo ideal para o crescimento de microrganismos.

Estudos realizados com aves demonstraram que a contaminação detectada nos animais sacrificados, nas condições conhecidas nos abatedouros, se origina, principalmente, da flora endógena e que este tipo de contaminação pode ocorrer durante o processo de evisceração que muitas vezes, em precárias condições higiênico-sanitárias, enquanto que a contaminação exógena é sempre quantitativamente menor (Turtura et al., 1994).

Os enterococos são freqüentemente isolados de carne de gado, aves e carcaças de suínos procedentes de abatedouros (Aarestrup et al., 2002b; Klein et al., 2003). Nas contaminações, em grandes proporções, de produtos cárneos frescos oriundos de abatedouros de aves, as espécies *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* e *E. hirae*, que são associadas com a flora intestinal microbiana destas aves, são as espécies que contaminam mais frequentemente os alimentos ainda nos abatedouros (Devriese et al., 1991; Turtura et al., 1994).

Uma vez presentes nos alimentos crus, esses microrganismos são capazes de sobreviver e de se multiplicar também durante alguns processos de conservação de alimentos como, por exemplo, a pasteurização, a fermentação e a refrigeração (Giraffa et al., 2002). Especialmente nos produtos fermentados, quando os enterococos são utilizados como culturas iniciadoras, e a flora normal do alimento não for suficientemente competitiva, estes microrganismos representam sérios problemas para a conservação dos alimentos.

Entretanto, a contaminação pelos enterococos ocorre não apenas em produtos cárneos crus, sendo freqüentemente associados também com produtos cárneos processados. Os processos de conservação dos alimentos que utilizam o calor conferem uma grande vantagem aos enterococos, uma vez que estes microrganismos estão entre as bactérias não esporuladas mais termo-tolerantes conhecidas. Com estas características, eles são capazes de permanecer como contaminantes até o produto final, inclusive entre os produtos fermentados e pasteurizados.

As espécies *E. faecalis* e *E. faecium* são as mais freqüentemente associadas com a deterioração de produtos cárneos cozidos ou processados pelo calor, fato este facilitado pela capacidade que esses microrganismos possuem de sobreviver às temperaturas utilizadas nos processos de preparação e conservação destes alimentos (Franz et al., 1999). A espécie *E. faecium* sobrevive ao aquecimento de 65°, 71° e 80° C durante 30, 10 e 3 minutos, respectivamente (Kearns et al., 1995). Existem ainda outras estratégias tecnológicas utilizadas na conservação dos alimentos, como a utilização de pHs extremos e alta salinidade, que também não são seguras diante de algumas espécies de enterococos, pois estas sobrevivem e se desenvolvem nestas condições extremas, utilizadas na tecnologia de produção de alimentos (Gordon et al., 1991).

A identificação completa destes microrganismos, quando recuperados de alimentos, constitui uma situação bastante complexa e o significado dos isolados variará de acordo com a origem do isolamento (Knudtson et al., 1993). A identificação quanto à espécie é importante, para ajudar a traçar esquemas adequados para definir se a origem da contaminação se é humana, animal ou ambiental. Apesar disto, sabe-se que os estudos sobre a identificação das diferentes espécies em diferentes tipos de alimentos são bastante fragmentados e não permitem uma idéia clara sobre a associação direta dos enterococos com as origens das contaminações.

De modo geral, a presença e prevalência dos enterococos entre as bactérias ácido-lácticas encontradas em leites e produtos de laticínios também pode ser considerada como sendo resultado de precárias ou deficientes condições higiênico-sanitárias na produção e processamento deste tipo de alimento. A presença destes microrganismos no leite cru pode estar relacionada a uma contaminação direta com material fecal ou indireta, quando

tem acesso ao alimento provenientes de fontes como águas contaminadas do ambiente que cerca os animais, ou ainda através dos equipamentos de ordenha, estocagem, transporte dos alimentos ou mesmo dos manipuladores desta matéria-prima (Devriese et al., 1995).

Os microrganismos deste grupo algumas vezes podem sobreviver ao processo de pasteurização e, como conseqüência deste fato, os enterococos acabam por fazer parte da microbiota tanto do leite cru como do pasteurizado (Giraffa, 2003).

A natureza psicotrófica e a facilidade de adaptação aos diferentes tipos de substratos e condições de crescimento permitem também a sobrevivência e desenvolvimento deste microrganismo durante os processos de refrigeração dos alimentos.

Um número limitado de espécies de enterococos é importante na ecologia da microbiota do leite e seus derivados, e entre eles as duas espécies de maior significado são *E. faecalis* e *E. faecium* (Franz et al., 1999; Gelsomino et al., 2001; Klein, 2003).

Entretanto, os enterococos nem sempre estão presentes em leite e seus derivados como contaminantes ou como microbiota natural, pois podem ser adicionados também intencionalmente para a obtenção de produtos específicos. São amplamente utilizados como culturas iniciadoras na produção de uma grande variedade de leites fermentados e, principalmente, queijos, em sua maioria, artesanais, produzidos principalmente nos países do norte e do sul da Europa, tanto a partir de leite cru como pasteurizado. Os enterococos são bactérias ácido-lácticas (BAL) (Holzapfel et al., 1999) e por conta das características das bactérias deste grupo são utilizados com sucesso na tecnologia de produção de alimentos. Para que estas aplicações sejam possíveis, é necessário que as cepas utilizadas com estes objetivos sejam corretamente identificadas (Eaton et al., 2001). É necessário principalmente a observação das características fisiológicas e comportamentais das cepas que serão utilizadas, como, por exemplo, o perfil de resistência aos antimicrobianos e a ausência de marcadores de virulência quando da seleção e caracterização das cepas de enterococos que podem ser comercialmente utilizadas em alimentos ou medicamentos (Klein et al., 2003). Algumas cepas definidas de enterococos com características taxonômicas, ecológicas e de resistência aos antimicrobianos perfeitamente estabelecidas são desejáveis com base em sua

contribuição positiva no desenvolvimento de componentes flavorizantes que são utilizadas intencionalmente para definir alguns produtos de laticínios específicos.

Os níveis de recuperação destes microrganismos determinam a segurança dos processos de produção e dependem da extensão da contaminação intencional inicial, do tipo de queijo, da amostra iniciadora utilizada e da tecnologia aplicada, isto é, das condições que serão fornecidas para a sobrevivência e crescimento dos enterococos nas condições particulares da produção e amadurecimento dos diferentes tipos de laticínios.

Quando se observam altos níveis de contaminação em alguns tipos de queijos, especialmente os frescos, que são elaborados com leite pasteurizado ou cru e com culturas iniciadoras selecionadas em quantidades definidas, geralmente, considera-se o fato como sendo resultado de práticas higiênicas insatisfatórias durante o processo de produção e conservação destes alimentos. Isto resulta em deterioração das propriedades organolépticas e sensoriais do produto final. Nestes casos, a presença dos enterococos passa a ser indesejável pela contagem do número de células viáveis no produto (Giraffa et al., 1997; Franz et al., 1999).

Levando-se, então, em conta o lado positivo e benéfico da utilização intencional de algumas cepas de enterococos, vários estudos revelam que já estão bem identificados alguns representantes deste gênero, algumas vezes isolados da microbiota essencial, que uma vez possuidoras de requisitos favoráveis são utilizadas com sucesso na produção e qualificação de alguns tipos especiais de queijos, como por exemplo, Manchego, Cebreiro, Feta e Muzzarella (Villani et al., 1994). Seus efeitos benéficos nestes alimentos estão relacionados principalmente com sua atividade altamente proteolítica que atua sobre as gorduras do leite facilitando a produção de componentes flavorizantes (diacetil, acetoínas e acetaldeídos) importantes para o amadurecimento do produto final com características especiais na flavorização destes alimentos (Franz et al., 1999). Nestes produtos, os enterococos compreendem a maior parte da microbiota do coalho de iniciação e em alguns casos são os microrganismos predominantes, quando do amadurecimento completo do produto (Suzzi et al., 2000; Sarantinopoulos et al., 2001; Sarantinopoulos et al., 2002; Giraffa, 2003).

As espécies *E. faecalis* e *E. faecium* podem ser adicionadas intencionalmente também como culturas iniciadoras e representarem importante papel na produção e/ou no desenvolvimento de características organolépticas especiais durante o preparo de alguns tipos de produtos fermentados como salsichas, lingüiças (Franz et al., 1999; Giraffa, 2002; Franz et al., 2003; Hugas et al., 2003) e azeitonas (Ben Omar et al., 2004), aos quais são adicionados e passam a fazer parte da microbiota presente naquele produto.

Os enterococos podem ser utilizados ainda em tecnologia de produção de alimentos sob a forma de culturas iniciadoras adjuvantes, que são aquelas adicionadas a alguns tipos de queijos com o propósito de promover a formação de ácido para auxiliar a ação das culturas iniciadoras propriamente ditas. Com este objetivo são utilizadas cepas conhecidas de *E. faecium*, *E. faecalis* e *E. durans* promovendo uma combinação mesofílica e termofílica entre as BAL em alguns tipos de queijos europeus (Sarantinopoulos et al., 2002).

Este grupo de microrganismos abriga ainda alguns traços ou peculiaridades biotecnológicas importantes, tais como, a habilidade em produzir bacteriocinas. Pertencentes à classe das culturas iniciadoras adjuntas, as enterocinas são pequenos peptídeos que possuem atividade antimicrobiana e atuam inibindo o desenvolvimento de importantes patógenos, como *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, microrganismos que representam sérios problemas para a Vigilância Sanitária (De Vuyst et al., 1994; Giraffa et al., 1997; Hugas, 1998; Laukova et al., 1999). Estas enterocinas são naturalmente produzidas pelos enterococos exatamente no espectro, modo de ação, na estrutura e massa molecular, termo-estabilidade e faixa ideal de pH para atuação como substâncias bioprotetoras em leites e produtos de laticínios (Cleveland et al., 2001; Riley et al., 2002).

Algumas espécies de enterococos de origem alimentar podem também compartilhar certo número de utilidades bromatológicas retornando com aplicação na forma de alimentos por possuírem características especiais de proteção para a microbiota intestinal. Entre as aplicações intencionais dos enterococos, baseadas em suas propriedades benéficas, apesar de discutíveis do ponto de vista de segurança, podemos citar sua utilização como probióticos.

Probióticos são definidos como sendo culturas mono ou mistas de microrganismos vivos, que podem ser utilizadas tanto em seres humanos como

em animais, com efeitos benéficos sobre o hospedeiro, melhorando as propriedades e o balanço da microbiota intestinal. Como efeito primário de sua influência benéfica no ecossistema intestinal promove proteção contra infecções gastrointestinais e doenças inflamatórias do intestino. Os efeitos benéficos defendidos para este tipo de aplicação incluem: restauração e manutenção da microbiota intestinal, e assim prevenir ou reduzir a desordem intestinal, aliviar a intolerância à lactose, estimular o sistema imune e melhorar o valor nutritivo dos alimentos (O`Sullivan et al., 1992; Franz et al., 1999). Esta definição de probióticos vem evoluindo a partir dos estudos sobre o esclarecimento e entendimento dos mecanismos pelos quais eles realmente podem influenciar a saúde humana (De Vuyst et al., 2004). Atualmente, estes tipos de suplementos para consumo humano são divididos em quatro categorias: alimentos infantis, iogurtes, leites fermentados ou não, fórmulas e preparações farmacêuticas.

Para que o microrganismo seja considerado como um probiótico efetivo, alguns requerimentos são necessários: que possa aderir às células do hospedeiro, excluir ou reduzir a aderência dos patógenos, que possa persistir e se multiplicar, produzindo ácidos e peróxido de hidrogênio, produzir bacteriocinas, que atuem como antagonistas de patógenos e seja seguro, não invasivo e não carcinogênico (Salminen et al., 1996).

As principais espécies de enterococos utilizadas como probióticos são *E. faecalis* e *E. faecium*, entre outras do grupo das bactérias ácido-láticas, aparentemente com sucesso (Holzapfel et al., 1998).

Entretanto, enquanto os benefícios de algumas cepas já estão bem estudados e estabelecidos, observa-se a emergência e o aumento dos registros da associação dos enterococos com doenças graves em seres humanos, principalmente, relacionados com múltipla resistência aos antimicrobianos colocando em alerta sua utilização para consumo humano. O evidente receio baseia-se, principalmente, no fato de que os genes que codificam para a resistência aos antimicrobianos e os fatores de virulência são transferidos dos enterococos para outras bactérias do trato gastro-intestinal (Franz et al., 2003) e isto se contrapõe à segurança da utilização destes microrganismos como probióticos e a situação permanece pouco clara e

Patogenicidade

Os enterococos, que há duas décadas eram considerados microrganismos de baixa virulência e reduzido impacto clínico, emergiram como importantes microrganismos oportunistas. Atualmente, são reconhecidos como um dos principais microrganismos envolvidos, tanto em infecções adquiridas nos ambientes nosocomiais (sobretudo infecções urinárias, de feridas cirúrgicas e bacteremias), como nas adquiridas na comunidade (Moellering, 1992; Morrisson et al., 1997; Edwards, 2000; Kayser, 2003).

Os microrganismos pertencentes a este gênero não possuem os potentes fatores de virulência encontrados em outras bactérias Gram positivas patogênicas, como *S. aureus* e *L. monocytogenes*. Entretanto, possuem um arsenal de importantes características diferenciais, que contribuem para sua virulência e os tornam efetivos patógenos oportunistas com grande expressão e representatividade tanto em microbiologia médica, veterinária, ambiental como de alimentos (Moellering, 1992; Gilmore et al., 2002; Giraffa, 2002). Estas características colocam os enterococos em posição de destaque entre as bactérias de maior versatilidade no cenário atual de resistência às drogas e são responsáveis pela atual expressão desses microrganismos entre os principais agentes das infecções nosocomiais.

Dentre as espécies do gênero a espécie *E. faecalis* é a mais freqüentemente envolvida com as infecções enterocócicas em seres humanos (80% a 90%), enquanto *E. faecium* (5% a 10%) está associada à maioria das infecções provocadas por amostras resistentes aos antimicrobianos, inclusive à vancomicina (Mundy et al., 2000; Moellering, 1992; Murray, 1990). Outras espécies de menor freqüência como *E. casseliflavus*, *E. raffinosus*, *E. gallinarum*, *E. durans*, *E. hirae* e *E. mundtii* são mais raramente identificadas em infecções humanas e geralmente estão envolvidas em surtos específicos (Chirurgi et al., 1992; Nauchertz et al., 1993; Jett et al., 1994; Patterson et al., 1995).

Como componentes naturais da microbiota gastrointestinal de seres humanos e animais, os enterococos coexistem de maneira estável com seus hospedeiros, em condições de equilíbrio. Entretanto, existem situações que levam à ruptura deste comensalismo e, então, eles têm acesso a novos sítios que não são adequadamente atendidos pelos mecanismos específicos de defesa, certamente em prejuízo do hospedeiro.

A patogênese da maioria das infecções bacterianas deriva de uma seqüência de eventos, que desafiam tanto os mecanismos específicos como os não específicos de defesa, que são mobilizados pelo hospedeiro (Johnson, 1994). Para iniciar e desenvolver um processo infeccioso o patógeno precisa, primeiramente, colonizar os tecidos do hospedeiro, resistir aos mecanismos específicos e inespecíficos de defesa, e produzir alterações patológicas diretamente através da produção de toxinas ou indiretamente através da promoção de respostas (Johnson, 1994; Franz, 2003). A colonização pode não constituir um fator de virulência propriamente dito, mas amplifica o potencial de patogenicidade do microrganismo em combinação com os demais fatores, propiciando o desenvolvimento da doença.

Os enterococos são microorganismos de baixa virulência, mas que conseguem atravessar o trato gastrointestinal intacto e, posteriormente, disseminar-se para outros órgãos. De acordo com o modelo de translocação as células epiteliais, ou os leucócitos intra-epiteliais fagocitam as bactérias aderidas ao lúmen intestinal. Posteriormente as bactérias deixam o lado apical das células epiteliais ou migram para dentro dos fagócitos e para os linfócitos mesentéricos, onde proliferam e disseminam-se pela via hematogênica para outros órgãos e tecidos (Jett et al., 1994).

Fatores de virulência

Durante muitos anos os enterococos foram considerados como comensais, com baixo potencial patogênico. Entretanto, este panorama vem se modificando e assumindo representatividade na medida em que aumentou o envolvimento deste grupo de microorganismos com as infecções nosocomiais graves (Chenoweth et al., 1990; Leclercq et al., 1993; Kayser, 2003)

A utilização indiscriminada dos antimicrobianos de amplo espectro de ação, bem como o tempo de permanência dos pacientes em estado grave internados nas unidades de tratamento intensivo, estão relacionados, diretamente, ao reconhecimento dos graves problemas com as infecções enterocócicas e conduzem ao aumento das taxas de mortalidade envolvendo estes microrganismos.

As dificuldades que envolvem a terapia das infecções enterocócicas explicam os esforços que têm sido empreendidos para o entendimento dos fatores que podem alterar o relacionamento comensal estabelecido entre o

microrganismo e seu hospedeiro e, então, direcionar os novos avanços terapêuticos. Entretanto, os alvos terapêuticos incluem não só fatores de virulência, mas também todos aqueles que contribuem de alguma maneira para que os enterococos tenham acesso aos sítios das infecções (Hacker et al., 2000; Gilmore et al., 2002;).

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 (Jett et al., 1994). Vários potenciais atributos de virulência têm sido identificados entre os enterococos, principalmente entre os isolados a partir de materiais clínicos, que envolvem um ou mais estágios da patogenia nas enterococcias.

Os genes de virulência dos patógenos bacterianos podem estar presentes no cromossomo ou em elementos extra-cromossomiais como os plasmídeos e transposons. A virulência nos microrganismos é multi-fatorial e coordenadamente regulada por genes freqüentemente aglomerados no genoma em regiões distintas chamadas Ilhas de Patogenicidade (IPAs).

As IPAs são associadas com linhagens virulentas e estão freqüentemente ausentes ou modificadas em cepas não patogênicas ou menos virulentas da mesma espécie, e estas regiões contêm grandes blocos de genes de virulência (Tendolkar et al., 2004).

As IPAs foram descritas pela primeira vez por Shankar e colaboradores (2002) em bactérias Gram positivas, quando descreveram e analisaram o genoma de uma linhagem de *E. faecalis*. Estes pesquisadores descobriram que os determinantes de virulência encontravam-se agrupados nestas regiões do genoma. Este elemento varia sutilmente entre as linhagens e estas variações ocorrem com alta freqüência, podendo conferir à linhagem a capacidade de modular a virulência. Podem também ser um marcador bastante útil para detectar linhagens de enterococos que normalmente não são patogênicas, alertando para os procedimentos de controle das infecções nosocomiais (Shankar et al., 2002). Em 2004, Leavis e colaboradores descreveram uma nova IPA ligada ao gene *esp* em *E. faecium*. Enquanto a espécie *E. faecalis* é representante do gênero mais freqüentemente isolada a partir de espécimens clínicos, amostras de *E. faecium*, principalmente aquelas resistentes a ampicilina e vancomicina, são mais freqüentemente associados à disseminação epidêmica nos hospitais. É possível, que diferenças nas

sequências das IPAs entre *E. faecium* e *E. faecalis* somadas às diferenças na susceptibilidade aos antimicrobianos possam contribuir para as diferenças epidemiológicas entre as espécies. Uma vez que as IPAs podem fornecer um significado rápido e flexível de evolução da virulência gerando novas variantes patogênicas, é provável que a aquisição de uma IPA pelo *E. faecium* tenha tido um importante papel na rápida emergência desta espécie como patógeno nosocomial (Leavis et al., 2004).

Um fator de virulência é uma molécula efetora que aumenta a habilidade de um microrganismo de causar doença (Mundy et al., 2000). Algumas moléculas associadas à virulência foram descritas em enterococos, particularmente, em cepas de *E. faecalis* derivadas de infecções em seres humanos (Nallapareddy et al., 2000; Toledo-Arana et al., 2001). Dentre os fatores de virulência dos enterococos reconhecidos é importante destacar: a citolisina, a substância de agregação, a gelatinase, a proteína de superfície Esp e a hialuronidase.

A citolisina é uma toxina hemolítica expressa por aproximadamente 60% das cepas de *E. faecalis*, (Hancock et al., 2000). Esta toxina é codificada pelo elemento genético denominado *cyl* localizado em um plasmídeo feromônio-responsivo (Ike et al., 1990), ou no cromossomo (Ike et al., 1992; Jett et al., 1994) e é capaz de lisar uma gama de células eucarióticas e procarióticas aumentando a virulência dos *E. faecalis* em modelo animal. Em 2001, Furumura e colaboradores descreveram o isolamento e identificação desta hemolisina em *E. faecalis* isolado no Brasil, também possuidora de efeito citotóxico em cultura de células. Estas características atribuídas à citolisina são de grande importância e devem ser consideradas, pois além de lisar células humanas, facilitam a permanência dos enterococos no local da infecção. Em 2003, Semedo e colaboradores estudaram amostras isoladas de espécimens clínicos e de alimentos, quanto à atividade hemolítica, incluindo outras espécies além do *E. faecalis* tais como *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. durans* e *E. faecium*, que embora não possuíssem atividade hemolítica, apresentavam genes não expressos (Semedo et al., 2003b). A presença destes genes em isolados bacterianos de outras espécies associada com a habilidade dos enterococos em adquirir, acumular e compartilhar elementos extra cromossômicos entre bactérias do mesmo gênero e de diferentes espécies, indicam a necessidade de incluir outras espécies que não os *E. faecalis* para

avaliar corretamente a evolução da patogenicidade neste gênero (Semedo et al., 2003a).

A substância de agregação Agg é constituída por proteínas da superfície bacteriana codificadas pelo gene *asa1* em um plasmídeo feromônio- induzível, que intermedia a ligação da célula bacteriana doadora com recipientes livres de plasmídeos, possibilitando eficiente transferência conjugativa (Gilmore et al., 2002; Foulquié-Moreno et al., 2006). A espécie *E. faecalis* produz substância de agregação e a incidência entre os isolados de alimentos parece ser bastante alta (Eaton et al., 2001; Franz et al., 2001). Tal substância pode contribuir para a patogênese através de vários mecanismos, além da promoção do contato com as células do hospedeiro, aumentando a hidrofobicidade da superfície celular e promovendo o aumento da vegetação em endocardite experimental (Foulquié-Moreno et al., 2006).

A gelatinase é uma protease que tem como função principal prover os microrganismos com nutrientes peptídicos. O gene *gelE* codifica uma metalopeptidase extracelular, que pode atuar direta ou indiretamente causando danos aos tecidos dos hospedeiros. Estes danos podem incluir: degradação do tecido conectivo, desajustes do sistema imune através da degradação das imunoglobulinas, hidrólise da gelatina, colágeno, caseína e outros compostos bioativos em células eucarióticas (Okamoto et al., 1997; Tendolkar et al., 2004). Eaton e colaboradores (2001) pesquisaram os fatores de virulência entre os enterococos isolados a partir de espécimens clínicos humanos, e também os utilizados como iniciadores e probióticos em alimentos. O gene *gelE* foi encontrado em alguns enterococos isolados que não apresentavam atividade de gelatinase, ou seja, os genes estavam presentes, mas não eram expressos. Estes genes foram denominados de genes silenciosos e foram detectados tanto em amostras de origem clínica como de alimentos. Entretanto, estes genes podem ser ativados por fatores ambientais como por exemplo, as condições físicas do trato gastrointestinal ou os efeitos do sinergismo da microbiota bacteriana.

Os enterococos expressam uma proteína de superfície de alto peso molecular denominada Esp (“Enterococcal surface protein”) codificada pelo gene *esp*, descoberta a partir de uma linhagem de *E. faecalis* envolvida em múltiplas infecções nos Estados Unidos. Está localizada na superfície da parede celular e algumas variações em sua estrutura podem contribuir para a

capacidade de células de *E. faecalis* em não serem detectadas pelo sistema imunológico do hospedeiro e persistirem nos sítios de infecção (Shankar et al., 1999).

Toledo-Arana e colaboradores (2001) associaram a presença dos genes que codificam para a Esp com a formação de biofilme. 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, sendo a prevalência de *esp* muito maior em *E. faecium* (51,6%) que em *E. faecalis* (37,5%) (Tendolkar et al., 2004; Harrington et al., 2003).

A Esp pode ter papel representativo na promoção da adesão bacteriana principalmente às células epiteliais da bexiga através de componentes específicos das paredes deste órgão. Observações sobre o papel da Esp na formação de biofilmes em superfícies abióticas e no trato urinário suportam o papel multi-funcional desta proteína (Tendolkar et al., 2004; Gilmore et al., 2002). Um gene variante *esp* recentemente identificado foi apontado como marcador de prevalência de resistência à vancomicina em *E. faecium*, entretanto, este gene pode também ser detectado em *E. faecium* susceptíveis a vancomicina (Shankar et al., 1999).

A hialuronidase é uma enzima extra-celular codificada pelo gene *hyl* localizado no cromossomo, e tem papel importante na doença invasiva facilitando a propagação do microrganismo.

A maior parte do conhecimento existente sobre fatores de virulência de enterococos é relativo a isolados clínicos onde são utilizadas técnicas moleculares e experimentos em modelo animal para sua perfeita identificação.

Eaton e Gasson (2001) demonstraram que os fatores de virulência enterocócicos estão presentes tanto em amostras de origem clínica, como naquelas isoladas de alimentos, inclusive entre aquelas cepas utilizadas em tecnologia de produção. Entretanto, a incidência dos fatores de virulência é considerada mais alta entre as amostras de origem clínica, seguida pelos isolados a partir de alimentos e com uma incidência bem menor entre as cepas de enterococos utilizados intencionalmente na produção de alimentos.

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 microrganismos. Em isolados multirresistentes (resistência a dois ou mais antimicrobianos diferentes), Murray (1998) descreveu três

diferentes sistemas de conjugação, que podem ocorrer entre os microrganismos deste gênero: no primeiro, a transferência do plasmídeo conjugativo é altamente eficiente e envolve a presença de feromônios. Feromônios são oligopeptídeos secretados pelas células receptoras e doadoras contendo plasmídeos, que geralmente contém genes de virulência e/ou de resistência aos antimicrobianos, que promovem a transferência conjugativa de DNA plasmidial entre cepas do mesmo gênero. Este sistema é denominado sistema feromônio sexual. Cepas de *E. faecalis* secretam um número variável de pequenos peptídeos sexuais diferentes, específicos para diferentes tipos de plasmídeos. Quando uma cepa possui um plasmídeo responsivo a um feromônio correspondente específico, inicia-se a transcrição de um gene plasmidial específico, resultando na síntese de uma substância de superfície. Esta substância é transportada para o ambiente extra-celular, e quando encontra a bactéria receptora correspondente, promove a agregação de ambas ou ainda com mais bactérias (formação de agregados). Após a passagem do material genético para a célula receptora, a síntese do feromônio correspondente é interrompida pela mesma. Esta proteína de superfície promove o contato íntimo entre as células doadoras e receptoras aumentando muitas vezes a frequência de transferência conjugativa entre as células (Clewell, 1990). Desta maneira, a presença de feromônios está diretamente relacionada à elevada capacidade dos enterococos em adquirir genes de resistência (Clewell, 1990).

Um outro sistema de conjugação envolve transferência de plasmídeos entre espécies diferentes de enterococos ou outros microrganismos Gram positivos. E finalmente um terceiro tipo de troca genética pode ocorrer através de transposons conjugativos entre enterococos e microrganismos de diferentes espécies bacterianas inclusive as Gram negativas (Jett et al., 1994).

Epidemiologia

Os enterococos constituem um gênero muito peculiar de microrganismos, tanto por suas características de resistência intrínseca aos principais grupos de antimicrobianos, como também por sua notável capacidade de manifestar novos modelos e mecanismos de resistência adquirida (Clewell, 1990; Murray, 1990). Além disto, são reconhecidos pela capacidade intrínseca que possuem em adquirir e transferir, via conjugação,

elementos extra-cromossômicos, que albergam genes de virulência e/ou de resistência aos antimicrobianos facilmente dissemináveis. Isto lhes confere vantagens seletivas para sua virulência, pois permitem sua sobrevivência e disseminação, principalmente nos ambientes nosocomiais (Straut et al., 1996; Kühun et al., 2000).

Muito embora isoladamente a resistência aos antimicrobianos não explique a patogênese deste microrganismo, a relação com este parâmetro é bastante clara, pois a virulência dos enterococos aumenta expressivamente diante do comportamento destes microrganismos frente aos antimicrobianos habitualmente utilizados no tratamento de quadros clínicos envolvendo bactérias Gram positivas (Murray, 1990; Moellering et al., 1992; Leclercq, 1997).

Durante muito tempo, considerou-se como fonte das infecções enterocócicas a microbiota endógena dos hospedeiros. Entretanto, na década de 80, tanto a aquisição exógena como a transmissão nosocomial passaram a ser melhor documentadas (Zervos et al., 1986), e nos anos seguintes, estudos confirmaram a disseminação de cepas resistentes aos β -lactâmicos, aminoglicosídeos e aos glicopeptídeos, com o surgimento dos VREs, principalmente entre pacientes internados em unidades de terapia intensiva (Boyce et al., 1995).

Nos ambientes nosocomiais, a transmissão e a disseminação podem ocorrer tanto diretamente através da equipe médico-hospitalar, o que parece ser a forma mais importante e eficiente de transmissão (Bonilla et al., 1997), como indiretamente através de equipamentos e superfícies contaminadas, com os quais os pacientes têm contato (Antalek et al., 1995).

Muito embora a aquisição nosocomial e a subsequente colonização pelos enterococos, especialmente os VREs, sejam enfatizadas entre os indivíduos hospitalizados, esta também ocorre nas comunidades, onde diferentes animais, alimentos e todo o meio ambiente são considerados como importantes reservatórios atuando como fontes fora dos ambientes hospitalares. A disseminação seletiva de amostras de enterococos parece ser, então, bastante provável, pois os isolados albergam importantes marcadores de virulência e resistência a antimicrobianos. Particularmente, a espécie *E. faecium* tem sido encontrada com frequência, procedente de carnes de bovinos, suínos e aves.

Em estudos sobre a emergência de enterococos apresentando resistência aos glicopeptídeos (especialmente *E. faecium*) fora dos ambientes hospitalares, observou-se a existência de um grande reservatório de resistência transferível (cluster do gene *van A*) entre animais utilizados para o consumo humano. Entretanto, a correlação entre a ocorrência de VREs em alimentos e as infecções hospitalares não foi ainda claramente estabelecida, mas dados epidemiológicos sugerem, que tanto a disseminação clonal, através da cadeia alimentar, como a transferência horizontal de genes entre diferentes cepas de microrganismos, estão envolvidos com VREs e espalhando-se fora dos ambientes extra nosocomiais (Gambarotto et al., 2001).

Resistência aos antimicrobianos

A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno genético relacionado à existência de genes contidos nos microrganismos, que codificam diferentes mecanismos bioquímicos os quais de alguma maneira impedem a ação das drogas. A resistência pode ser originada por mutações, que ocorrem nos microrganismos durante seu processo reprodutivo e resultam em erros de cópias na sequência de bases, que formam o DNA cromossômico responsável pelo código genético. A resistência pode ser também produto da importação de genes causadores do fenômeno (resistência transferível). Este tipo de resistência envolve mecanismos de tradução, transformação e conjugação e, freqüentemente, envolvem genes situados em plasmídeos e transposons (Tavares, 2000).

A resistência microbiana representa um problema mundial em medicina humana e veterinária. De modo geral, o principal fator de risco para o aumento da resistência aos antibióticos é, sem dúvida o uso intensivo dos mesmos. Este fato proporciona a emergência e disseminação de bactérias resistentes e também de genes de resistência entre microrganismos que circulam entre seres humanos e animais. Em ambas as populações, os antibióticos são utilizados tanto para terapia como para a profilaxia das doenças infecciosas. Os níveis de resistência aos antimicrobianos têm aumentado e, com eles, os problemas para a terapia convencional, não somente entre as bactérias patogênicas como também entre as comensais, que constituem importantes reservatórios de genes de resistência potencialmente transferíveis para bactérias patogênicas (van den Bogaard et al., 2000).

A resistência aos antimicrobianos entre os enterococos pode ser natural ou adquirida (transferível) e através destes dois mecanismos estes microrganismos ampliam cada vez mais seu espectro de resistência aos antimicrobianos (Klare et al., 2003). O termo resistência intrínseca é utilizado para designar fenótipos de resistência, que são propriedades inerentes a determinadas espécies bacterianas. Este tipo de resistência é mediada por genes localizados no cromossomo e inclui resistência aos β -lactâmicos, às cefalosporinas, sulfonamidas e baixos níveis de resistência à clindamicina e aminoglicosídeos (Morrisson et al., 1997). Por outro lado, os mecanismos de resistência adquirida são decorrentes de mutações no DNA cromossômico ou da aquisição de uma nova molécula de DNA, como os plasmídeos e os transposons (Murray, 1990). Esta resistência é mediada por genes codificados em elementos extra cromossômicos e inclui resistência à eritromicina, cloranfenicol, tetraciclina e fluoroquinolonas, além de resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos e β -lactâmicos e, mais recentemente, também aos glicopeptídeos (Murray, 1990; Leclercq, 1997; Franz et al., 2003).

A resistência intrínseca dos enterococos a baixos níveis de aminoglicosídeos (CMI – Concentração Mínima Inibitória para a estreptomicina em torno de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e para a gentamicina de 8 – 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$) é decorrente da diminuição da permeabilidade resultando em transporte ativo ineficiente. Estes antimicrobianos atuam, primariamente, por interferência na síntese proteica e quando esta é a única resistência expressa, é interessante a associação do aminoglicosídeo com um antimicrobiano que atue interferindo na formação da parede celular, fato que resulta em efeito sinérgico bactericida útil nas infecções enterocócicas sistêmicas graves, principalmente em pacientes comprometidos imunologicamente, que exigem a utilização de um esquema terapêutico antimicrobiano com ação efetivamente bactericida.

De qualquer modo, combinações de antibióticos ativos contra a parede celular com os aminoglicosídeos (gentamicina, estreptomicina) atuando sinérgicamente são utilizadas com sucesso (Simjee et al., 1997). Mas a resistência intrínseca associada ao panorama da resistência adquirida a muitos antimicrobianos sugere que o tratamento das infecções enterocócicas graves se apresentará em um futuro próximo com um prognóstico bastante difícil.

A resistência intrínseca dos enterococos aos antimicrobianos pertencentes à classe dos β -lactâmicos é devida à baixa afinidade de suas

proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) aos agentes representantes do grupo (Fontana et al., 1983). Quando ocorre a relativa resistência dos enterococos aos β -lactâmicos, esta é evidenciada *in vitro* inibitórias CMI frente à penicilina G, à ampicilina, à amoxicilina e à piperacilina, cujos valores são 10 a 100 vezes maiores, quando comparadas às apresentadas pelos estreptococos. Além disto, os enterococos exibem resistência ainda mais acentuada às penicilinas semi-sintéticas e nenhuma das cefalosporinas disponíveis tem atividade clinicamente útil sobre estes microrganismos.

A resistência adquirida aos aminoglicosídeos é decorrente de dois mecanismos diferentes: alteração no alvo ribossomal, devido a mutações cromossômicas e inativação enzimática através da produção de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs) codificadas por genes localizados em plasmídeos transferíveis ou transposons (Zervos et al., 1986; Leclercq, 1997). A resistência mediada por alterações nas proteínas-alvo presentes no ribossomo foi observada, inicialmente, na espécie *E. faecalis* e posteriormente em *E. faecium* (Leclercq, 1997). Entretanto, resistência a níveis elevados de estreptomicina (HLSR – “High-level Streptomycin Resistance”), também pode ocorrer devido à produção de EMAs.

O aumento da frequência do isolamento de cepas portadoras do fenótipo HLSR (CMI >2000 μ g/mL) levou ao uso indiscriminado de gentamicina em associação com uma penicilina para o tratamento da endocardite enterocócica. Conseqüentemente, observou-se a emergência de amostras resistentes a níveis elevados de gentamicina (HLR-GE – “High-level Gentamycin Resistant”) CMI > 500 μ g/mL, levando a falhas terapêuticas quando do emprego desta associação (Murray, 1998).

A resistência a concentrações elevadas de gentamicina, decorrente da expressão de EMAs, pode ser codificada principalmente por quatro genes: *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic* e *aph(2'')-Id*. O fenótipo mais comum desta resistência é o codificado pelo gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* e deve-se à expressão de uma proteína bifuncional, a AAC(6')-I/APH(2'')-I, que possui atividade de 6''- acetiltransferase e de 2''- fosfotransferase. A combinação destas duas atividades, além de eliminar o efeito sinérgico conhecido, promove resistência a concentrações elevadas de praticamente todos os aminoglicosídeos comercialmente disponíveis, exceto estreptomicina. Apesar da estreptomicina não ser modificada por esta enzima, a resistência a

concentrações elevadas deste antimicrobiano pode coexistir com a resistência a altos níveis de outros antimicrobianos (Murray, 1998; Kao et al., 2000).

Enterococos demonstrando altos níveis de resistência aos aminoglicosídeos foram detectados tanto na microbiota de seres humanos saudáveis (Coque et al., 1995) como também em uma grande variedade de fontes ambientais, tais como águas de rios, enseadas, esgotos e poços artesianos (Rice et al., 1995), indicando que eles não estão mais restritos aos ambientes nosocomiais. Este tipo de resistência é codificada por plasmídeos transferíveis ou transposons (Patterson et al., 1990), e este fato é um bom indicador da facilidade destas cepas para se disseminar. Entretanto, o surgimento de cepas de enterococos exibindo resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos e/ou β -lactâmicos resulta em dificuldades nas opções terapêuticas, sendo necessária a associação com os glicopeptídeos. Estudos conduzidos em Portugal e na Polônia detectaram importantes percentuais de amostras clínicas resistentes a níveis elevados de aminoglicosídeos, particularmente à gentamicina, entre 15% e 54,6% (Lopes et al., 2003). No Brasil, Stern e colaboradores (1994) observaram a presença deste fenótipo de resistência em 33% das amostras de enterococos.

Portanto, a resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos (gentamicina e estreptomicina), bem como aos β -lactâmicos (ampicilina) e glicopeptídeos (vancomicina) constituem um importante marcador para cepas de enterococos associadas a infecções de difícil tratamento e vêm sendo detectadas em percentuais crescentes entre amostras de origem humana circulantes em nosso meio (Stern et al., 1994; Teixeira et al., 1994; Carvalho et al., 1995; Merquior et al., 1997; d'Azevedo et al., 1999; Albuquerque et al., 2000; Teixeira et al., 2001; Mondino et al., 2003).

Entre os enterococos pode ocorrer também ocorrer a resistência adquirida entre os antibióticos pertencentes à classe dos macrolídeos (particularmente à eritromicina), à lincomicina e à estreptogramina, frequentemente referida pela sigla – MLS. Estes são antibióticos quimicamente distintos, que atuam por inibição da síntese proteica nos microorganismos e constituem terapias alternativas para o tratamento das infecções enterocócicas tanto em seres humanos como em animais (Butaye et al., 2001). Neste caso, três diferentes mecanismos de resistência entre as bactérias Gram positivas são conhecidos: modificação no sítio alvo da droga (alteração da fração 23S ribossômica),

conferindo resistência cruzada aos MLS; inativação enzimática da droga, envolvendo os genes *ermA*, *ermB* e *ermC*, conferindo resistência somente aos antibióticos estruturalmente relacionados aos MLS; mecanismo de efluxo ativo da droga (envolvendo os genes *mfA*, *mfE*, *mrsA* e *mreA*) (Leclercq et al., 1993).

Em estudos nos quais os padrões de resistência a uma ampla gama de agentes terapêuticos foram avaliados, o fenótipo de resistência à tetraciclina parece ser um dos mais comuns, não somente entre os enterococos isolados a partir de materiais clínicos, como também de alimentos. Entre os microrganismos deste gênero são reconhecidos dois grandes grupos de genes associados a resistência à tetraciclina (genes *tet*) (Chopra et al., 2001). O primeiro grupo inclui os genes *tetM*, *tetO* e *tetS*, e confere resistência através da proteção ribossômica detectada no gênero *Enterococcus*. Um segundo grupo que atua por um mecanismo de efluxo da tetraciclina das células, dependente de energia, é representado nos enterococos pelos genes *tetK* e *tetL*. Um sexto gene *teU*, que codifica para baixos níveis de resistência em *E. faecium* através de mecanismo de ação desconhecido, foi identificado por Ridenhour e colaboradores (1996).

Somando-se a já complicada situação terapêutica estabelecida pela resistência dos enterococos aos antimicrobianos, observou-se o surgimento de cepas resistentes aos glicopeptídeos (Courvalin, 1990), que são os principais fármacos de escolha para o tratamento das infecções enterocócicas graves. A vancomicina é a droga indicada nos casos onde falha o sinergismo dos β -lactâmicos e aminoglicosídeos ou quando não se pode, por algum motivo inerente ao paciente, utilizar a penicilina como alternativa terapêutica (Moellering, 1992). A resistência aos glicopeptídeos é induzível e transferível, situando-se os genes de resistência no cromossomo, em plasmídeos e transposons, e o mecanismo bioquímico desta resistência consiste em modificações na estrutura da parede celular.

Atualmente a emergência e disseminação de resistência aos glicopeptídeos é um dos mais dramáticos exemplos de resistência aos antimicrobianos. Desde o final dos anos 80 vem sendo relatada a emergência dos enterococos resistentes à vancomicina (VRE), com sérias conseqüências em relação aos principais esquemas terapêuticos convencionais para as infecções enterocócicas graves (Kowaleck et al., 2001). As principais inquietações a respeito da resistência à vancomicina são: i) o

comprometimento do sinergismo vancomicina-aminoglicosídeos; ii) o aumento na frequência de resistência simultânea a vários outros antibióticos; iii) os riscos de disseminação da resistência para bactérias virulentas como os *S. aureus* e *S. pneumoniae*.

Um dos primeiros relatos do isolamento de cepas de enterococos apresentando resistência à vancomicina ocorreu na Inglaterra, em 1986 (Uttley et al., 1988). Em 1989, a resistência à vancomicina foi detectada em 0,3% dos enterococos em hospitais norte-americanos; em 1994, a resistência havia aumentado cerca de 35 vezes, atingindo índices de 10,4% em enfermarias e 13,9% em UTIs, e chegando a 25% nos hospitais universitários em 1997 (Tavares, 2000). Em países da Europa a resistência à vancomicina no mesmo período foi, de modo geral, inferior a 10%. A partir de então, relatos de várias partes do mundo notificaram o isolamento destas cepas (Clark et al., 1993; Bates, et al., 1994; Edmond et al., 1995; Dembry et al., 1996; Zanella et al., 1999; d'Azevedo et al., 2001)

Dados sobre a ocorrência no Brasil demonstraram o seu relato inicial em Curitiba / PR (Dalla Costa et al., 1998), seguido por relatos de 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).

Os antimicrobianos da classe dos glicopeptídeos interagem com os resíduos C- terminais D-Alanil-D-Alanina dos precursores do peptídeoglicano, bloqueando a síntese da parede celular por inibição das reações de transglicosilação e transpeptidação (Arthur et al., 1993). Nos isolados sensíveis à vancomicina, o dipeptídeo D-Alanil-D-Alanina, formado pela enzima D-Ala-D-Ala ligase, é unido a um tripeptídeo para formar um precursor pentapeptídico do peptidoglicano, fundamental à síntese da parede celular bacteriana. O terminal D-Ala-D-Ala é o sítio alvo da vancomicina e esta, uma vez ligada, impede a utilização do precursor pentapeptídico na síntese da parede celular. A resistência aos glicopeptídeos, nos enterococos, deve-se à síntese de precursores de peptidoglicano modificados, que apresentam uma afinidade reduzida pela vancomicina e teicoplanina e está associada a diversos fenótipos intrínsecos ou adquiridos. Atualmente, são conhecidos seis diferentes grupos de genes mediando resistência aos glicopeptídeos entre os enterococos: o cluster *vanA*, o *vanB* (*vanA* e *vanB* são normalmente adquiridos através do

transposon *Tn 1546*), o cluster *vanC* (propriedade intrínseca das amostras móveis), *vanD*, *vanE* e *vanG* (Ambúr et al., 2002; Kak et al., 2002).

Amostras expressando o fenótipo VanA caracterizam-se por apresentar resistência induzível a níveis elevados de vancomicina (CMI $\geq 64\mu\text{g/mL}$) e variáveis de teicoplanina (CMI $\geq 8\text{-}32\mu\text{g/mL}$). Este fenótipo é codificado por um conjunto de sete genes, o operon *vanA*, presentes no transposon *Tn1546*, geralmente localizado em um plasmídeo com alta frequência de transferência. Quando há exposição do microrganismo à vancomicina, ocorre a indução da produção de diversas proteínas que, em conjunto, conferem resistência ao antimicrobiano (Derlot et al., 1991). Neste fenótipo, uma das proteínas envolvidas, denominada também de VanA, é uma ligase, semelhante à D-alanil-D-alanina-ligase de outros microrganismos, incluindo aquelas sensíveis à vancomicina, que tem sua síntese induzida pela exposição da bactéria à vancomicina. VanA dá origem a uma D-alanil-D-X, onde X geralmente é um lactato. O peptídeo desidrogenado D-ala-D-Lac se une ao tripeptídeo, resultando num precursor pentapeptídeo alterado. A vancomicina não se une ao terminal D-Ala-D-Lac, logo, este pentapeptídeo modificado não pode ser utilizado nas etapas seguintes da síntese da parede celular. Contudo, quando o precursor pentapeptídico normal (terminal D-Ala-D-Ala) também está presente, as bactérias não são completamente resistentes à vancomicina, apesar da ocorrência de precursores D-Ala-D-Lac. O fenótipo VanA está associado às espécies *E. faecalis* e *E. faecium* e, em menor frequência, a *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. avium*, *E. durans* e *E. raffinosus* (Cercenado et al., 1995).

O fenótipo VanB também expressa resistência induzida e transferível à vancomicina, porém as amostras permanecem sensíveis à teicoplanina. A maioria das proteínas codificadas pelo operon *vanA* possui homólogos codificados pelo gene *vanB*. Este conjunto pode estar localizado nos transposons *Tn1547*, *Tn1549* ou *Tn5382* (Quintiliani et al., 1996; Carias et al., 1998; Garnier et al., 2000). O transposon *Tn 5382* também carrega genes de resistência à ampicilina e tetraciclina e é responsável pela disseminação de *vanB* entre cepas de *E. faecium* envolvidas em surtos comprometendo vários estados norte americanos (Hanrahan et al., 2000). O gene *vanB* apresenta regiões variáveis e é classificado em três subtipos denominados *vanB1*, *vanB2* e *vanB3* (Dahl et al., 1999).

O fenótipo VanC confere resistência intrínseca a baixos níveis de vancomicina, característica das espécies móveis dos enterococos *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*. As enzimas VanC1, VanC2 e VanC2-VanC3 ligase são específicas dessas espécies, respectivamente, e estas enzimas participam da síntese do pentapeptídeo da parede celular, terminando em D-Alanil-D-serina, que apresenta menor afinidade pela vancomicina. Estas espécies apresentam D-ala-D-ala ligases, resultando em precursores com terminação D-Ala-D-Ala. A presença de ambos precursores explica a resistência a baixos níveis de vancomicina. No entanto, microrganismos com fenótipo VanC continuam susceptíveis à teicoplanina.

O fenótipo VanD foi demonstrado em *E. faecium* por Perichon e colaboradores (1997) nos USA. Os isolados caracterizam-se pela resistência constitutiva à vancomicina (CMI = 64 µg/mL) e à baixas concentrações de teicoplanina (CIM = 4µg/mL). Os autores demonstraram que o gene *vanD* apresenta uma homologia de 69% com *vanA* e *vanB* e de 43% com *vanC*. O gene *vanD* codifica uma D-Ala-D-Lac ligase, semelhante às sintetizadas por *vanA* e *vanB*, mas não é transferível.

O fenótipo VanE, descrito por Fines e colaboradores (1999) em *E. faecalis*, aparentemente não é transferível e caracteriza-se pela expressão de resistência induzida a baixos níveis de vancomicina (CMI = 16µg/mL) e susceptibilidade à teicoplanina (CMI = 0,5µg/mL).

O fenótipo VanG foi descrito por McKessar e colaboradores (2000) em *E. faecalis*, na Austrália, e caracteriza-se pela expressão de resistência a baixas concentrações de vancomicina (CMI = 12-16µg/mL) e susceptibilidade a teicoplanina.

A crescente importância do gênero *Enterococcus* no cenário das infecções humanas e animais traduz o imenso interesse sobre as possíveis fontes de VRE e a diversidade genética deste grupo de microrganismos, principalmente, entre os enterococos isolados na Europa e nos USA (Bouten et al., 2001). Na Europa os reservatórios suspeitos, principalmente de *vanA* são os animais comercializados para consumo humano e estudos epidemiológicos fornecem evidências de que os VRE na Europa são encontrados principalmente nos animais que receberam a avoparcina.

A utilização de avoparcina, glicopeptídeo prescrito como promotor de crescimento administrado em rações de uso animal parece contribuir para a

existência de resistência cruzada com a vancomicina. Além disto, a Europa tem documentado a colonização entérica por VREs em indivíduos saudáveis bem como a presença em vários tipos de alimentos, principalmente entre os tradicionais queijos europeus e estes fatos alertam para a importância da cadeia alimentar no processo de disseminação destes microrganismos (Klare et al., 1995; Franz et al., 1999). Entretanto, os VREs também foram recuperados de uma grande variedade de animais não tratados com avoparcina. Apesar disto, os índices de infecções por enterococos vancomicina resistentes em ambientes nosocomiais continuam abaixo de 3% na Europa (Schouten et al., 2000).

Por outro lado, nos EUA, onde é proibido o uso de avoparcina em animais para o consumo humano, a colonização de pacientes hospitalizados por VRE é endêmica, principalmente nas unidades de terapia intensiva e vem aumentando consideravelmente o número de infecções graves causadas por estes microrganismos (Bouten et al., 2001). Somando-se à complicada situação existem informações sobre o isolamento de VREs em indivíduos saudáveis na comunidade sem história de hospitalização prévia ou tratamento com antimicrobianos. Como consequência do aumento da incidência de resistência à vancomicina entre os enterococos, observou-se um aumento na necessidade do desenvolvimento de novas metodologias, que privilegiem a detecção destes microrganismos, pois sua identificação precoce é importante para o controle de sua disseminação. Riscos importantes a serem considerados para infecção ou colonização por VRE incluem antibioticoterapia prévia, (principalmente a administração anterior de vancomicina), período de hospitalização prolongada, doenças de base e ainda exposição a fontes contaminadas (Perl, 1999). Entre as recomendações para uma efetiva prevenção da colonização e disseminação de enterococos apresentando resistência aos glicopeptídeos estão incluídas vigilância constante, principalmente sobre as espécies *E. faecalis* e *E. faecium*, visando a detecção da resistência aos antimicrobianos, e também o estabelecimento de um programa de triagem da colonização intestinal por enterococos resistentes aos glicopeptídeos (GRE). Os profissionais de saúde devem reforçar o controle, imediatamente após a detecção da presença de GRE em ambientes nosocomiais, particularmente em áreas de alto risco, como unidades de transplantes, oncologia e de tratamento intensivo (HICPAC, 1995).

Os resultados das pesquisas direcionam as observações epidemiológicas para a existência de uma forte correlação entre o uso de antibióticos em medicina humana e animal e entrada dos enterococos resistentes aos antimicrobianos na cadeia alimentar e, através dela, serem disseminados (Manu et al., 2003). Portanto, tornam-se de grande importância os estudos que revelam a frequência no isolamento de enterococos, exibindo resistência aos antimicrobianos, a partir de alimentos (Davies et al., 1999; Franz et al., 2001; Aarestrup et al., 2004). Apesar da grande frequência no isolamento de cepas de enterococos de alimentos apresentando resistência a um ou mais antimicrobianos a maioria apresenta-se sensível às drogas clinicamente importantes (Baungartner et al., 2001; Franz et al., 2001). Os alimentos mais frequentemente associados com amostras bacterianas que apresentam genótipos de resistência aos antimicrobianos são os produtos cárneos, leites pasteurizados, produtos de laticínios, alimentos prontos para o consumo e probióticos. Esta ocorrência em uma ampla e variada gama de alimentos pode representar sérios riscos na disseminação da resistência aos antimicrobianos através da cadeia alimentar.

Rastreamento epidemiológico

A importância crescente do gênero *Enterococcus* no cenário das infecções humanas, particularmente as de origem nosocomial, explica o grande interesse nos estudos sobre a diversidade genética destes microrganismos.

A diversidade ilustrada pelos vários determinantes genéticos envolvidos e fenótipos expressos e, em algumas situações, a especificidade dos padrões emergentes de resistência aos antimicrobianos entre estes microrganismos, que favorecem a patogenicidade, apontam para a necessidade do rastreamento de sua disseminação a partir das diferentes fontes potenciais e da utilização de métodos precisos para seu reconhecimento e caracterização.

Medidas de controle da transmissão destes microrganismos são fundamentais e, por vezes, as únicas efetivas para o controle epidemiológico. Surtos hospitalares envolvendo enterococos multirresistentes podem ser causados por transmissão clonal, a partir de um único isolado ou por transmissão horizontal, entre isolados diferentes de plasmídeos ou transposons que codificam resistência.

Os sistemas de tipagem fenotípicas como biotipagem, resistotipagem, sorotipagem e fagotipagem são de valor limitado para o estudo dos enterococos devido ao baixo poder discriminatório, pois não detectam diferenças significativas entre isolados da mesma espécie (Murray, 1990). Além disto, estas técnicas requerem um grande número de testes e isto as torna muito laboriosas.

O desenvolvimento de sistemas de tipagem genética tem contribuído de maneira importante para o rastreamento e compreensão da disseminação dos enterococos. Tais sistemas têm como base as observações de que isolados da mesma espécie podem apresentar ampla variabilidade no DNA, decorrente de eventos genéticos como mutações pontuais, inserções, deleções e recombinações (Tenover, 1995). Existem diferentes sistemas para auxiliar os estudos epidemiológicos, sendo que a utilização combinada de vários deles parece ser o ideal (Willey et al., 1994).

Métodos baseados na análise da estrutura genética da bactéria (tipagem molecular) apresentam diferentes graus de reprodutibilidade e poder de discriminação. Várias destas metodologias podem ser utilizadas para o esclarecimento dos diversos aspectos da epidemiologia dos enterococos como a análise do polimorfismo eletroforético das enzimas; análise dos padrões plasmidiais; análise do DNA cromossômico após clivagem com endonucleases de elevada frequência de corte com posterior análise através da eletroforese convencional; análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico através de diferentes variantes da técnica da eletroforese em campo pulsado (PFGE - Pulsed Field Gel Electrophoresis); técnicas de amplificação do DNA baseados na metodologia da reação da polimerase em cadeia (PCR). Os enterococos, de maneira semelhante a outros gêneros bacterianos, adquirem e perdem plasmídeos com facilidade, de tal forma que diferentes isolados podem apresentar idêntico conteúdo plasmidial, enquanto isolados com o mesmo DNA cromossômico podem ter diferentes plasmídeos (Boyce et al., 1992). Os resultados obtidos com endonucleases de alta frequência de corte são consideradas de difícil interpretação devido ao elevado número de bandas que compõe os perfis a serem analisados (Murray, 1990). Em contrapartida, os resultados obtidos com endonucleases de baixa frequência empregando PFGE, apresentam resultados com elevado poder discriminatório, sendo considerada a metodologia padrão para os estudos

epidemiológicos (Tenover et al., 1997; d'Azevedo et al., 2001). Atualmente, a análise do DNA cromossômico utilizando enzimas de restrição, principalmente *Sma*I, através da eletroforese em campo pulsado é considerado o método genotípico “padrão ouro” referendado para a análise epidemiológica das infecções enterocócicas (Clark et al., 1993; Carvalho et al., 1997; Reinhert et al., 1999). A aplicação de técnicas moleculares tem contribuído significativamente para a definição da distribuição clonal, tornando possível a demonstração da transmissão destes microrganismos por contato direto e indireto entre pacientes e o rastreamento da transmissão inter e intra-hospitalar de cepas de enterococos resistentes a antimicrobianos (Pegues et al., 1997).

2 OBJETIVOS

Nas duas últimas décadas, os enterococos vêm adquirindo destacada relevância entre os microrganismos mais comumente envolvidos em infecções hospitalares de difícil tratamento, devido a aquisição e disseminação de resistência a uma ampla gama de antimicrobianos.

A possibilidade de que os enterococos apresentando resistência adquirida aos antimicrobianos sejam veiculados através da cadeia alimentar os coloca como objeto de grande atenção da Saúde Pública.

Considerando os aspectos mencionados e a escassez de informações sobre enterococos isolados de alimentos comercializados no Brasil, este estudo teve os seguintes objetivos:

- Avaliar a ocorrência das diferentes espécies de enterococos em dois tipos de alimentos, representados por um alimento cárneo cru (frango) e por leite pasteurizado, comercializados para fins de consumo humano, no estado do Rio de Janeiro.
- Determinar a ocorrência de resistência a antimicrobianos, sobretudo a resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos, β -lactâmicos, quinolonas e vancomicina, em amostras de enterococos isoladas a partir de alimentos.
- Avaliar a diversidade de determinantes genéticos associados à resistência a antimicrobianos e a diversidade de determinantes genéticos associados à virulência, detectados através de PCR, em enterococos isolados a partir de alimentos.
- Investigar aspectos da epidemiologia molecular e disseminação de amostras multirresistentes de enterococos avaliando a sua diversidade genética através da análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico por PFGE.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras de alimentos

Foram analisadas 50 amostras de alimentos (matrizes), sendo 25 de carne crua de frango e 25 de leite pasteurizado dos tipos B, C e desnatado, comercializados e coletados aleatoriamente na cidade do Rio de Janeiro/RJ, no período de outubro de 2002 a outubro de 2005.

Para a análise microbiológica, visando o isolamento de enterococos, as matrizes foram processadas utilizando a metodologia preconizada por Andrews & June (1998).

Tanto as amostras de frango como as de leite pasteurizado foram transportadas para o laboratório nas condições normais de aquisição pelo consumidor (transporte sem refrigeração), quando então foram refrigeradas até serem submetidas à análise, respeitando-se os prazos para consumo dos produtos. Apenas uma amostra de frango e uma de leite foram coletadas com os prazos de validade vencidos, e foram analisadas como as demais. Todas as amostras, quando nas embalagens originais, traziam o carimbo de ciência, responsabilidade e fiscalização do Ministério da Agricultura, órgão governamental responsável pelo controle destes tipos de produtos.

3.1.1 Amostras de carne crua de frango

As 25 amostras de carne crua de frango estudadas denominadas de A1 a A25, de diferentes marcas, distribuidoras e lotes (data de abate das aves). Estes produtos foram obtidos em supermercados, distribuidoras de aves e feiras livres conforme sua distribuição para venda apresentadas a seguir:

Frangos congelados (amostras, A1, A3, A4, A5, A7, A11, A12, A13, A15, A16 e A22), representados por peças inteiras ou cortes especiais (coxas, sobrecoxas e peitos) dispostos à venda em balcões frigoríficos nas embalagens originais das cooperativas distribuidoras;

Frangos resfriados (amostras A2, A18, A19, A20 e A21) representados por peças inteiras ou cortes especiais (coxas, sobrecoxas e peitos), dispostos à venda em balcões refrigerados coletados em suas embalagens originais de distribuição, constituídas por bandejas de poliestireno expandido;

Cortes especiais de frangos congelados ou resfriados (amostras A6, A8, A10, A14 e A23), dispostos em balcões refrigerados comercializados a granel e coletados em sacos plásticos (PVC) flexíveis;

Frangos inteiros e cortes especiais frescos recém abatidos (amostras A9, A17, A24 e A25), comercializados em balcões sem refrigeração em feiras livres e coletados em sacos plásticos (PVC) flexíveis.

Após a limpeza e desinfecção com álcool 70° de toda a superfície externa das embalagens, a retirada das peças ocorreu observando-se os cuidados de assepsia necessários para a manipulação destes tipos de produtos em análises microbiológicas.

Frações de 25 g da amostra, incluindo lâminas de superfície dos músculos e fragmentos de pele foram retirados de vários pontos da carcaça, tanto da parte externa como interna, de maneira aleatória.

Os fragmentos foram, então, lavados, sob agitação em agitador mecânico do tipo "Stomacher" (Seward Limited; Londres, Reino Unido), durante dois minutos a 230/ rpm em sacos plásticos flexíveis, estéreis contendo 225 mL de água peptonada (Oxoid Limited, Hampshire, Reino Unido) a 0,1% (diluição 10⁻¹).

3.1.2 Amostras de leite pasteurizado

As amostras de leite que foram objeto deste estudo incluíram leite pasteurizado dos tipos B (LPB) – LPB/2, LPB/3, LPB/4, LPB/5, LPB/13, LPB/14, LPB/15, LPB22 e LPB24; tipo C (LPC) – LPC/1, LPC/6, LPC/7, LPC/8, LPC/9, LPC/10, LPC/11, LPC/16, LPV/17, LPC/18, LPC/19, LPC/20, LPC/21, LPC/23, LPC/25; e desnatado (LPD) – LPD/12. Foram coletadas em supermercados e padarias e transportadas ao laboratório para análise nas condições de aquisição do produto para consumo, sem acondicionamento frio, no laboratório foram refrigeradas até o momento da análise. Estas matrizes foram adquiridas embaladas em sacos de polietileno (PE de baixa densidade), procedentes de várias usinas de beneficiamento de leite pertencentes a cooperativas agropecuárias do estado do Rio de Janeiro.

Após limpeza e desinfecção com álcool 70° da superfície externa da embalagem de polietileno com álcool 70°, alíquotas de 25 mL de leite foram

retiradas e homogenizadas, em recipientes estéreis, com 225 mL de água peptonada (Oxoid) a 0,1% (diluição 10^{-1}).

3.1.3 Semeadura das amostras de alimentos

Tanto as amostras de frango como as de leite foram processadas nas mesmas condições operacionais exigidas para o ensaio microbiológico.

Alíquotas de 1,0 mL da diluição foram distribuídas em 10 placas de Petri (0,1 mL) e, sobre o inóculo, foram colocados 20 mL de ágar Enterococcosel (Enterococcosel agar – Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, USA), e com movimentos circulares o inóculo foi homogenizado com o meio de cultura (pour plate) e estas foram incubadas a 37° C durante 24 h.

Após o período de incubação, as colônias sugestivas de enterococos foram contadas obtendo-se o número de UFC (unidades formadoras de colônias) por grama/mL do produto. Foram então removidas, com auxílio de alça bacteriológica, até 10 colônias negras sugestivas de enterococos (de preferência da superfície). Estas colônias foram transferidas para tubos de ensaio contendo 3,0 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion Broth; Becton Dickinson Microbiology Systems), em duplicata, com o objetivo de permitir o crescimento do microrganismo em um meio de cultura sem os inibidores presentes na cultura primária.

Após um período de incubação de 24h a 37°C, as culturas foram submetidos aos testes preliminares de caracterização fenotípica para a identificação quanto ao gênero.

3.2 Caracterização morfo-fisiológica

3.2.1 Caracterização fenotípica do gênero

As amostras bacterianas 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

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).

3.2.1.1 Características morfotintoriais

A partir do crescimento em ágar BHI (Brain Heart Infusion agar; Becton Dickinson Microbiology Systems), incubado a 37° C durante 24h, foram preparadas suspensões em salina fisiológica (NaCl 0,85%, Merck, Microbiology, Darmstadt, Alemanha) com as quais foram preparados esfregaços em lâminas de vidro. Após coloração pelo método de Gram, foram observadas as características morfo-tintoriais das células ao microscópio óptico com auxílio de objetiva de 100X (imersão). As amostras bacterianas caracterizadas como cocos Gram positivos, aos pares, isolados ou em pequenas cadeias foram, então, submetidos aos demais testes objetivando a caracterização presuntiva do gênero *Enterococcus*.

3.2.1.2 Produção da enzima catalase

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

3.2.1.3 Hidrólise da esculina em presença de bile

Os isolados foram inoculados em ágar Enterococosele, e incubados a 37° C durante 24h. O teste foi considerado positivo, quando houve crescimento acompanhado de enegrecimento do meio resultante da hidrólise da esculina formando esculina.

3.2.1.4 Hidrólise da L-pirrolidonil- β -naftilamida (PYR) e da L-leucina- β -naftilamida (LAP)

Para a observação da produção da enzima pirrolidonilarilamidase (PYRase) foi utilizada a metodologia preconizada por Bosley e colaboradores (1983) com algumas modificações. A partir do crescimento do microrganismo isolado em agar BHI, durante 24h a 37°C, preparou-se uma suspensão espessa do microrganismo em tubo 13x100 contendo 2,0 mL de caldo THB (Todd-Hewitt Broth – Difco), acrescido de 0,01% de PYR (Sigma Chemical Company, ST Louis, MD, EUA). Após um período de incubação de 4h a 37°C, adicionou-se uma gota da solução reveladora contendo dimetilaminocinamaldeído (Sigma), em HCl a 10% (v/v). Após suave agitação do tubo, foi realizada a leitura do teste, em até 10 minutos, sendo o teste considerado positivo, quando do aparecimento de coloração rosa forte ou púrpura.

Para detecção da produção da leucina aminopeptidase (LAPase) foi utilizada metodologia descrita por Facklam e colaboradores (1991). A partir do crescimento de cada amostra bacteriana em agar BHI, durante 24h a 37°C, foi preparada uma suspensão espessa em tubo 13X100 mm contendo 0,2 mL de caldo THB, acrescido de L-leucina- β -naftilamida (Sigma). A incubação, revelação e interpretação dos resultados foram semelhantes às aquelas observadas para o teste da PYRase.

3.3 Preservação das amostras bacterianas

Após a caracterização quanto ao gênero *Enterococcus*, as amostras bacterianas foram inoculadas em placas de Petri contendo ágar BHI incubadas a 37°C durante 24h. A partir do crescimento assim obtido foram preparadas suspensões espessas do microrganismo em criotubos, contendo 2,0 mL da solução de Skim Milk (Difco) a 10% e glicerol (Merck) a 10% (v/v) e conservadas em freezer a -20°C.

3.4 Caracterização fenotípica da espécie

Quando as amostras bacterianas apresentaram-se como cocos Gram positivos, catalase negativos, com crescimento positivo em caldo NaCl 6,5%, PYRase e LAPase positivos foram, então, considerados como pertencentes, presuntivamente, ao gênero *Enterococcus* e foram submetidos ao esquema para identificação dos microrganismos quanto à espécie, segundo recomendações de Carvalho e colaboradores (1998) e Teixeira e colaboradores (2003).

Os testes fisiológicos incluíram produção de pigmento, motilidade, hidrólise da arginina, tolerância ao telurito de potássio, utilização do piruvato de sódio e verificação da produção de ácidos a partir de açúcares – L-arabinose, manitol, D-rafinose, sacarose, D-sorbose, D-sorbitol e metil- α -glicopiranosídeo (MGP).

Cepas padrão de *E. faecalis* SS 1273, *E. faecium* SS 1274, *E. casseliflavus* SS 1229 e *E. gallinarum* SS 1228 foram utilizadas como controles para os testes.

As informações sobre as características fenotípicas empregadas para a identificação das espécies de *Enterococcus* estão na **Tabela 1**.

3.4.1 Produção de pigmento

A produção de pigmento (amarelo) foi observado diretamente em cultivos obtidos na superfície do meio ágar BHI após incubação durante 24h a 37° C.

3.4.2 Motilidade

O teste para a verificação da motilidade foi realizado inoculando-se as amostras bacterianas com auxílio de agulha bacteriológica, em tubos 13x100 mm contendo o meio de cultura “Motility Medium” (Difco), seguido de incubação a 25° – 30° C por até sete dias.

3.4.3 Hidrólise da arginina

Para a verificação da hidrólise da arginina foi utilizado o meio de cultura Decarboxylase Base Moeller (Becton Dickinson Microbiology Systems), acrescido de 1% de L-arginina (Sigma), distribuído em alíquotas de 3,0 mL em tubos 13x100 mm. Inoculou-se duas gotas de uma suspensão densa do microrganismo preparada a partir de uma cultura recente em caldo BHI e, sobre o meio de cultura acrescentou-se uma coluna de 10 mm de óleo mineral estéril (Nujol, Indústria Química e Farmacêutica Schering Plough S.A, RJ). Os tubos foram incubados a 37° C e observados por até sete dias. A coloração púrpura indicando reação alcalina pela hidrólise da arginina com liberação do grupo NH₂ (com conseqüente alcalinização do meio de cultura) foi considerada como reação positiva.

3.4.4 Utilização do piruvato de sódio

A utilização do piruvato de sódio foi observada inoculando-se o microrganismo a ser testado em tubos 13x100 mm contendo 1% de triptona (Difco), 0,5% de extrato de levedura (Merck), 0,5% de K₂HPO₄ (Merck), 0,5% de NaCl (Merck), 0,01% de azul de bromotimol (Sigma) e 1% de piruvato de sódio (Sigma). O aparecimento de coloração amarela, no meio de cultura após a incubação a 37° C por até sete dias, foi considerado como indicativo de reação positiva.

3.4.5 Tolerância ao telurito de potássio

A tolerância ao telurito de potássio foi observada inoculando-se o isolado a ser testado em tubos de ensaio 13x100 mm, contendo 3,0 mL da Base Agar Nutriente (Merck) acrescida de 0,04% de telurito de potássio. Após incubação durante 24h a 37° C por até 07 dias, o aparecimento de colônias negras na superfície do meio indicou reação positiva para o teste.

Tabela 1 Características fenotípicas utilizadas para a identificação das espécies de *Enterococcus* e algumas espécies fisiologicamente relacionadas (Teixeira et al., 2007).

Especies	Características Fenotípicas (a)												
	MAN	SOR	ARG	ARA	SBL	RAF	TEL	MOT	PIG	SUC	PYR	MGP	
Grupo I													
<i>E. avium</i>	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	V	
<i>E. gilvus</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	
<i>E. hawaiiensis</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	
<i>E. malodoratus</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	V	
<i>E. pallens</i>	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	
<i>E. pseudoavium</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	
<i>E. raffinosus</i>	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	V	
<i>E. saccharolyticus</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	
Grupo II													
<i>E. faecalis</i>	+	(d)	-	+	(d)	-	+	-	-	+	(d)	+	-
<i>E. faecium</i>	+	(d)	-	+	+	V	V	-	-	-	+	(d)	-
<i>E. casseliflavus</i>	+	-	+	(d)	+	+	V	+	(d)	+	(d)	+	V
<i>E. gallinarum</i>	+	-	+	(d)	+	-	+	-	+	(d)	-	+	-
<i>E. haemoperoxidus</i>	+	(c)	-	+	(c)	-	-	-	-	-	+	-	+
<i>E. mundtii</i>	+	-	+	+	+	V	+	-	-	+	+	-	-
<i>E. sanguinicola</i>	+	-	+	-	-	-	-	+	(e)	-	+	-	-
<i>Lactococcus sp.</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-
Grupo III													
<i>E. dispar</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	
<i>E. durans</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>E. hirae</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	
<i>E. ratti</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>E. villorum</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Grupo IV													
<i>E. asini</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
<i>E. caccae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	
<i>E. cecorum</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	
<i>E. phoeniculicola</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	
<i>E. sulfureus</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	
Grupo V													
<i>E. canis</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	
<i>E. columbae</i>	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	
<i>E. hermannienseis</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>E. italicus</i>	+	-	-	-	V	-	-	-	-	+	+	+	
<i>E. moravienseis</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	
<i>Vagococcus fluvialis</i>	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	

(a) Abreviaturas e símbolos: MAN, manitol; SOR, Sorbose; ARG, Arginina; ARA, Arabinose; SBL, Sorbitol; RAF, Rafinose; TEL, 0,04% de Telurito; MOT, Motilidade; PIG, Pigmento; SAC, Sacarose; PYU: Piruvato, MGP:Metil-glicopiranosídeo,

(+) 90 % das amostras ou mais são positivas; (-) 90% das amostras ou mais são negativas;(V)

Variáveis

(c) Resultados tardios(3 ou mais dias de incubação)

(d) Exceções ocasionais (menor de 3 % de amostras)

(e) reação em uma semana

3.4.6 Utilização de carboidratos

Os testes para a verificação da produção de ácidos pela utilização de carboidratos foram realizados em caldo HIB (Heart Infusion Broth; Becton Dickinson Microbiology Systems). Aos tubos 13x100 mm contendo 3,0 mL do caldo HIB foi acrescentado 1,0% do carboidrato a ser testado e 0,1% do indicador púrpura de bromocresol (Sigma) em solução alcoólica a 1,6%. Os carboidratos testados foram: L-arabinose, manitol, D-rafinose, sacarose, D-sorbitol, D-sorbose e metil- α -D-glicopiranosídeo (MGP).

Após inoculação, os meios foram incubados a 37° C e observados por até sete dias. A mudança da coloração púrpura para amarelo, indicando a acidificação do meio pela fermentação do carboidrato, foi considerada como reação positiva.

3.5 Análise do perfil de proteínas totais através da eletroforese em gel de poliacrilamida

Foram submetidos à análise dos perfis de proteínas totais através de eletroforese em gel de acrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), segundo recomendações de Merquior e colaboradores (1994) com algumas modificações as amostras bacterianas que necessitaram de caracterização da espécie, aquelas espécies obtidas com menor frequência em nossa amostragem e também os isolados apresentando atipias fisiológicas.

3.5.1 Preparação dos extratos contendo proteínas celulares totais

As amostras foram cultivadas em placas de Petri contendo ágar TSA-Sg (Trypticase Soy Agar; Difco), acrescido de 5% de sangue de carneiro. As células bacterianas foram removidas da superfície do meio com auxílio de alça bacteriológica, e ressuspensas em 5mL de solução salina fisiológica estéril, de maneira a se obter uma turvação equivalente ao padrão 8,0 da escala de McFarland.

Após centrifugação (1300Xg) da suspensão bacteriana durante 20 min., as células contidas no sedimento foram ressuspensas em 250 µL de solução aquosa de lisozima (Sigma), a 10 mg/mL contendo 40U de mutanolisina (Sigma). Os tubos do tipo Eppendorf contendo as suspensões foram incubados em banho-maria a 37° C durante 2h. Após este período de incubação, foi adicionado igual volume de tampão de tratamento da amostra [Tris-HCl 0,5M (Bio-Rad Laboratories Inc., California, EUA), pH 6,8], contendo dodecil sulfato de sódio (BioRad) a 4% (p/v), glicerol (Merck), a 20% (v/v), 2-mercaptoetanol (Bio-Rad) a 10% (v/v) e azul de bromofenol (Sigma) a 0,001% (p/v)], e a mistura foi aquecida a 100° C durante 5 min. As preparações foram submetidas à centrifugação (1000 X g / 05 min.) sendo, então, o sobrenadante utilizado para a análise eletroforética das proteínas.

3.5.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

O procedimento para realização da eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio, em sistema descontínuo foi realizado segundo protocolo descrito por Laemmli (1970) com modificações propostas por Merquior e colaboradores (1994).

Das preparações solúveis (extratos protéicos) 15µl foram aplicados em reservatórios do gel superior (de empilhamento) contendo 4% de acrilamida (BioRad), preparado com Tris-HCl (Sigma), 0,125M (pH 6,8). O gel inferior (de separação) contendo acrilamida a 10% (p/v) foi preparado com Tris-HCl 0,375M (pH 8,8). O tampão de corrida utilizado foi composto de Tris-HCl 0,025M e glicina (Sigma) 0,192M (pH 8,3). A concentração final do dodecil sulfato de sódio (BioRad), tanto nos géis como no tampão utilizado na cuba foi de 0,1% (p/v). Para efeitos comparativos foram incluídos nos géis em estudo extratos de amostras-tipo das diferentes espécies de enterococos, assim como padrões de peso molecular conhecidos.

A eletroforese foi realizada em um sistema Mini-Protean II (Bio-Rad), com aplicação de corrente constante de 20mA, sob agitação.

Os géis foram corados em uma solução contendo Comassie Blue R-250 (Sigma) a 0,125% (p/v) em metanol:ácido acético:água na proporção 5:1:4

(v/v/v), e descorados com a mesma solução solvente em concentrações diferentes em duas etapas.

Padrões de pesos moleculares 20 – 250 KD (Prestained Protein Molecular Weight Standards, BioRad) foram incluídos em cada uma das corridas para permitir a estimativa dos pesos moleculares.

Os géis foram desidratados em solução de metanol a 50% (v/v), e glicerol (Merck) a 0,5% (v/v) durante 20 min., envolvidos em papel celofane e deixados à temperatura ambiente durante 24h.

A análise inicial dos perfis de proteínas foi realizada através da inspeção visual dos géis com auxílio de um transiluminador. A análise automatizada dos perfis de proteínas foi realizada com auxílio do sistema “Image Analysis System” utilizando o programa “Molecular Analyst Fingerprinting Plus” versão 1.6 (Bio-Rad). Foi utilizado o coeficiente de similaridade de Dice e os dendrogramas foram construídos pelo método de UPGMA (Unweighted Pair Method Using Arithmetic Averages) atribuindo-se uma tolerância de 1,0%.

3.6 Determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos

3.6.1 Testes de difusão em ágar

A avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizada 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 ensaios foram realizados a partir de cultivos recentes dos isolados em ágar BHI, obtidos após incubação a 37° C durante 24h, com os quais foram preparadas suspensões bacterianas em solução salina a 0,85% esterilizada, com turbidez semelhante à da solução padrão 0,5 de McFarland (aproximadamente 1 a 2×10^8 UFC/mL).

As suspensões foram semeadas, com ajuda de “swabs” esterilizados sobre a superfície seca de placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton (MHA; Oxoid, Limited, Hampshire, Reino Unido), de maneira a se obter um crescimento uniforme e confluyente. Sobre a superfície dos meios inoculados foram colocados discos de papel de filtro impregnados com os seguintes antimicrobianos a serem testados: Ampicilina-AM (10µg), Ciprofloxacina-CI

(5µg), Cloranfenicol-CO (30µg), Eritromicina-ER (15µg), Estreptomicina-ES (300µg), Gentamicina-GE (120µg), Imipenem-IM (10µg), Linezolida-LN (30µg), Nitrofurantoina-NI (30µg), Norfloxacin-NO (10µg), Penicilina-PE (10µg), Tetraciclina-TT (30µg), Teicoplanina-TE (30µg) e Vancomicina-VA (30µg). Tais discos foram obtidos dos seguintes fabricantes: (CEFAR – Diagnóstica Ltda (São Paulo, Brasil), CECON – Centro de Controle e Produtos para Diagnóstico Ltda. (São Paulo – Brasil) e Oxoid Limited (Hampshire, Reino Unido).

Após incubação durante 24h a 37° C, as leituras e as interpretações dos diâmetros dos halos de inibição foram realizados segundo recomendações do CLSI (2006a). A interpretação do diâmetro dos halos de inibição do crescimento do microrganismo frente ao Imipenem foi realizada segundo recomendações de Weinsten e colaboradores (2004).

Para detecção de níveis elevados de resistência aos aminoglicosídeos (HLR-A) foram utilizados discos de Gentamicina-GE (120µg), e Estreptomicina-ES (300µg), segundo recomendações do CLSI (2006b) e Facklam e colaboradores (2002).

Para o controle de qualidade (CQ) dos testes de susceptibilidade foram utilizadas as seguintes amostras padrão: *E. faecalis* CL-445 (com HLRA – altos níveis de resistência a aminoglicosídeos - para gentamicina), *E. faecium* CI-240 (com HLR para estreptomicina), *E. faecalis* SS-1332 (com HLR para gentamicina, estreptomicina), além de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *E. faecalis* ATCC 29212.

3.7 Caracterização molecular através de técnicas da reação em cadeia da polimerase (PCR)

3.7.1 Obtenção, extração do DNA e Reação em Cadeia da Polimerase

As amostras bacterianas foram semeadas em ágar BHI e incubadas a 37° C durante 24h. A partir deste crescimento foram preparadas suspensões bacterianas adicionando-se de 15 a 20 colônias a 1,0 ml de água Milli-Q. A partir desta suspensão foi realizada a extração do DNA, seguindo-se as recomendações do fabricante do kit Puregene (Gentra System) conforme resumido a seguir:

3.7.1.1 Lise das células

As amostras bacterianas foram cultivadas em ágar BHI, durante 24 h a 37°C, removidas da superfície do ágar com auxílio de alça bacteriológica e transportadas para tubo do tipo Eppendorf contendo 300µl da solução para suspensão (tampão TE; Bio Rad), pH 8,0. Após homogenização, adicionou-se 1,5µl de solução de enzima lítica, e os tubos foram incubados a 37° C durante 30 min em banho seco. Depois da incubação, os tubos foram centrifugados durante 1 min (13000Xg), o sobrenadante foi desprezado e ao sedimento foi adicionado de 300µl de solução de lise, e os tubos foram então aquecidos durante cinco min a 80° C.

3.7.1.2 Tratamento com RNase

Foram adicionados 1,5µl de solução de RNase, e os tubos colocados em banho seco a 37° C durante 1h. Após a incubação os tubos foram retirados do banho e deixados em repouso até atingir a temperatura ambiente.

3.7.1.3 Precipitação de proteínas

Em cada tubo já na temperatura ambiente foram adicionados 100µl de solução para precipitação de proteínas, seguido de agitação em vortex, durante 20 seg. Em seguida os tubos foram incubados em banho de gelo durante 1h. Após este período foram, então, centrifugados durante 3 min (13000Xg) e o sobrenadante transferido para novo tubo do tipo Eppendorf. Ao sobrenadante adicionou-se, então, 300µl de isopropanol (Merck), e a mistura foi centrifugada durante 2 min (14000Xg), e o sedimento ressuspenso com 50µl de água purificada.

3.7.2 Detecção do gênero *Enterococcus* segundo metodologia preconizada por Deasy et al., (2000)

A obtenção das células e a extração do DNA molde foram realizadas conforme descrito no item 3.7.1.

Os iniciadores utilizados foram desenhados a partir de regiões conservadas do 16S rRNA:

	Seqüência Iniciadora (5'- 3')	Produto (pb)
<i>Enterococcus</i> spp.	EntE1 = 5' TCA ACC GGG GAG GGT3' EntE2 = 5' ATT ACT AGC GAT TCC GG 3'	733

A mistura de amplificação foi preparada com 2,5µL de tampão da enzima (Gibco – BRL; Gaithersburg, EUA) (1X); 3µL de MgCl₂, 25 mM (3mM); 2µL de cada iniciador (240nM) 0,5µL de desoxinucleotídeos (Gibco) 10nM (200µM), 0,25µL de Taq DNA Polimerase (Gibco) 5U/µL (1,25U) e 12,75µL de H₂O Milli-Q. O volume utilizado no teste foi de 2µL do DNA bacteriano para 23µL da mistura de amplificação.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (GeneAmp PCR System 2400, Applied Biosystems), onde a mistura foi submetida ao seguinte programa: um ciclo inicial de desnaturação a 95°C (4 min), 95°C (30 seg), 60° C (1 min), 72°C (1 min), num total de 30 ciclos e uma temperatura final de extensão de 72° C por 7 min.

Os amplicons foram visualizados em transiluminador (UVP- Dual-Intensity Transilluminator), sob luz UV, após eletroforese em gel de agarose (Type I-A: low EEO / Sigma) a 1,5% durante 2 h sob corrente constante de 90V, esperando-se encontrar um amplicom de 733 pb. 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 etídeo (Sigma) 0,5µg/mL durante 30 min, e descorados em água Milli-Q (2 vezes/30 min), e posteriormente, fotografados utilizando o sistema digital EDAS-120 (Eastman Kodak, New Haven, CT, EUA).

3.7.3 Detecção de *E. faecalis* e *E. faecium* segundo metodologia preconizada por Dutka-Malen et al. (1995)

A obtenção das células e extração dos DNAs moldes foram realizadas conforme descrito no item 3.7.1. Os iniciadores utilizados foram desenhados a partir dos gene codificadores da D-alanina:D-alanina (D-Ala:D-Ala) ligase (*ddl_{E. faecalis}* e *ddl_{E. faecium}*):

Gene	Seqüência Iniciadora (5'- 3')	Produto (pb)
<i>ddl</i> <i>E.faecalis</i>	DDE1 = 5' ATC AAG TAC AGT TAG TCT 3'	941
	DDE2 = 5' ACG ATT CAA AGC TAA CTG 3'	
<i>ddl</i> <i>E.faecium</i>	DDF1 = 5'GCA AGG CTT CTT AGA GA 3'	550
	DDF2 = 5'CAT CGT GTA AGC TAA CTT C 3'	

A mistura de amplificação foi conforme descrito no item 3.7.2, porém utilizando 7µL de MgCl₂.

As misturas foram levadas ao termociclador) e submetidas ao seguinte programa: 1 ciclo de desnaturação inicial a 94°C durante 2 min, 94°C durante 1 min, 54°C durante 1 min, 72°C durante 1 min, num total de 30 ciclos e uma temperatura final de extensão de 72°C durante 10 min. Os produtos da amplificação foram visualizados em transiluminador, sob luz UV, após eletroforese em gel de agarose (Sigma) a 1,5% durante 2 h. sob corrente constante de 90V esperando-se encontrar um amplicom de 941 pb e 550pb para *E. faecalis* e *E. faecium*, respectivamente. O tampão utilizado na corrida eletroforética foi TBE 1X, os géis foram corados com brometo de etídeo, descorados em água Milli-Q e posteriormente, fotografados utilizando o sistema digital.

3.7.4 Detecção dos genes codificadores de resistência à vancomicina

Para a detecção dos genes envolvidos na resistência à vancomicina foi utilizada a metodologia preconizada por Dutka-Malen et al. (1995) para detectar a presença dos genes *van A*, *van B*, *van C1*, *van C2* e *van C3*.

A obtenção das células e extração do DNA molde foram realizadas de acordo com o item 3.7.1.

Os iniciadores utilizados foram desenhados a partir do gene codificador da D-alanina:D-alanina (D-Ala:D-Ala) ligase e enzimas relacionadas à resistência aos glicopeptídeos.

Foram utilizadas as seguintes seqüências iniciadoras:

Gene	Sequência Iniciadora (5'-3')	Produto (pb)
<i>vanA</i>	A1= 5'GGG AAA ACG ACA ATT GC 3' A2= 5'GTA CAA TGC GGC CGT TA 3'	732
<i>vanB</i>	B1= 5'ATG GGA AGC CGA TAG TC 3' B2= 5'GAT TTC GTT CCT CGA CC 3'	635
<i>vanC-1</i>	C1= 5'GGT ATC AAG GAA ACC TC 3' C2= 5'CTT CCG CCA TCA TAG CT 3'	822
<i>vanC-2, vanC-3</i>	D1= 5'CTC CTA CGA TTC TCT TG 3' D2= 5'CGA GCA AGA CCT TTA AG 3'	439

A mistura de amplificação foi preparada conforme descrito no item 3.7.2, porém utilizando 7 µL de MgCl₂.

Depois de preparadas todas as reações em tubos do tipo Eppendorf, estas misturas foram levadas ao termociclador e submetidas ao seguinte programa: um ciclo de desnaturação inicial a 94°C (2 min), 30 ciclos a 94°C (1 min), 54°C (1 min), 72°C (1 min) e um ciclo na temperatura final de extensão de 72°C (1 min).

Os amplicons foram visualizados em transiluminador, sob luz UV, após eletroforese em gel de agarose (Type I-A: low EEO / Sigma) a 1,5% durante 2h em corrente constante de 90V. O tampão utilizado na corrida eletroforética em tampão TBE 1X (Sigma) 0,5M (pH 8,0)]. Os géis foram corados com brometo de etídeo (Sigma) por 30 min, e descorados em água Milli-Q e, posteriormente, fotografados utilizando o sistema digital.

As amostras *E. faecalis* A 256 (genótipo *van A*), *E. faecalis* V 538 (genótipo *van B*), *E. gallinarum* SS 1228 (genótipo *van C1*), *E. casseliflavus* SS1229 (genótipo *van C2*) e *E. flavescens* SS 1317 (genótipo *van C2-C3*) foram utilizados como controles positivos. A amostra *E. faecalis* 29212 foi utilizada como controle negativo.

3.7.5 Detecção dos genes codificadores de resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos

Uma reação de PCR multiplex foi desenvolvida para a amplificação dos genes que determinam resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos excluindo-se o gene *ant(6)-1*, segundo metodologia preconizada por Vakulenko et al. (2003).

A obtenção das células e extração do DNA molde foram realizadas de acordo com o item 3.7.1.

Os iniciadores utilizados foram desenhados a partir dos genes de resistência dos enterococos a gentamicina, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic* e *aph(2'')-Id*, e dos genes que codificam para a resistência dos enterococos a vários aminoglicosídeos, exceto a gentamicina, *aph(3')-IIIa* e *ant(4')-Ia*.

As seqüências iniciadoras utilizadas para a amplificação dos genes de resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos foram as seguintes:

Gene	Seqüência Iniciadora) (5- 3')	Produto (pb)
<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> :	AAC-3= 5'CAG AGC CTT GGG AAG ATG AAG 3' AAC-4= 5'CCT CGT GTA ATT CAT GTT CTG GC 3'	348
<i>aph(2'')-Ib</i> :	APH IB-1= 5'CTT GGA CGC TGA GAT ATA TGA GCA C 3' APH IB-2= 5'GTT TGT AGC AAT TCA GAA ACA CCC TT 3'	867
<i>aph(2'')-Ic</i> :	APH IC-1= 5'CCA CAA TGA TAA TGA CTC AGT TCC C 3' APH IC-2= 5'CCA CAG CTT CCG ATA GCA AGA G 3'	444
<i>aph(2'')-Id</i> :	APH ID-1= 5'GTG GTT TTT ACA GGA ATG CCA TC 3' APH ID-2= 5'CCC TCT TCA TAC CAA TCC ATA TAA CC 3'	641
<i>aph(3')-IIIa</i> :	APH IIIA-1= 5'GGC TAA AAT GAG AAT ATC ACC GG 3' APH IIIA-2= 5'CTT TAA AAA ATC ATA CAG CTC GCG 3'	523
<i>ant(4')-Ia</i> :	ANT IA-1= 5'CAA ACT GCT AAA TCG GTA GAA GCC 3' ANT IA-2= 5'GGA AAG TTG ACC AGA CAT TAC GAA CT 3'	294

A mistura de amplificação da reação foi preparada como descrito no item 3.7.2, porém utilizando 1,5µL de MgCl₂.

Os genes a serem amplificados foram adicionados nas seguintes concentrações: 25 pmol *aac* (6')-*le-aph* (2'')-*la*, *aph* (2'')-*lb*, 3,5 pmol para *aph* (2'')-*lc*, 5 pmol para *aph* (2'')-*ld*, 3 pmol para *aph* (III)-*a* e 2 pmol para *ant* (4')*la*. O volume utilizado no teste foi de 2µL do DNA bacteriano mais 23µL da mistura de amplificação.

Depois de preparadas as reações em tubos do tipo Eppendorf foram levadas ao termociclador e submetidas ao seguinte programa: um ciclo de desnaturação inicial a 94°C (3 min), 94°C (40 seg), um ciclo de anelamento a 55° C (40 seg), 72°C (40 seg), num total de 35 ciclos e uma temperatura final de extensão de 72° C (2 min).

Os produtos amplificados foram visualizados em transiluminador sob luz UV, após eletroforese em gel de agarose (Type I-A Low EEO / Sigma) a 1,5% durante 2h sob corrente constante de 90V. O tampão utilizado na corrida eletroforética foi TBE 1X (Sigma) 0,5M (pH 8,0)]. Os géis foram corados com brometo de etídeo (Sigma) 0,5µg/mL em água Milli-Q durante 30 min., e descorados em água Milli-Q e, posteriormente, fotografados utilizando o sistema digital.

3.7.6 Detecção dos genes responsáveis pelos diferentes fenótipos de resistência à eritromicina

O procedimento para detecção dos genes envolvidos com os fenótipos de resistência aos macrolídeos foi realizado segundo recomendações de Sutcliffe et al. (1996b) e de Sepalla et al. (1998).

A obtenção das células e extração do DNA molde foram realizadas de conforme descrito no item 3.7.1.

As seqüências iniciadoras empregadas estão listadas a seguir, juntamente com o tamanho esperado dos produtos de reação e suas respectivas referências.

Gene	Seqüência Iniciadora (5'-3')	Produto (pb)	Referência
<i>erm(A)</i>	F= 5' GCATGACATAAACCTTCA 3' R= 5' AGGTTATATGAAACAGA 3'	206	Seppala et al., 1998
<i>erm(B)</i>	F= 5' GAAAAGGTACTCAACCAAATA 3' R=5'AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC 3'	639	Sutcliffe et al., 1996
<i>mef(A/E)</i>	F = 5' AGTATCATTAAATCACTAGTGC 3' R = 5' TTCTTCTGGTACTAAAAGTGG 3'	349	Sutcliffe et al., 1996

O sobrenadante dos extratos contendo o DNA das amostras foram submetidos à reação de amplificação conforme descrito no item 3.7.2, porém utilizando 2mM de MgCl₂.

As amplificações foram realizadas em termociclador com o seguinte programa: um ciclo a 95°C (3 min), para desnaturação, seguido de 35 ciclos de 93°C (1 min), 52°C (1 min) [no caso dos genes *erm(B)* e *erm(A)*] ou 54°C (1 min) [no caso do gene *mef(A/B)*] e 72°C (1 min), para desnaturação, anelamento e extensão, respectivamente. Para extensão final será utilizado um ciclo à 72°C (5 min). Os produtos amplificados foram visualizados em transiluminador, sob luz UV, após eletroforese em gel de agarose (Type I-A Low EEO / Sigma) a 1,5% durante 2 h em corrente constante de 90V. O tampão utilizado na corrida eletroforética foi TBE (Sigma), 0,2M e EDTA (Sigma) 0,5M (pH 8,0). Os géis foram corados com brometo de etídeo (Sigma) 0,5µg/mL em água Milli-Q durante 30 min, e descorados em água Milli-Q e, posteriormente, fotografados utilizando o sistema digital.

3.7.7 Detecção dos genes codificadores de resistência à tetraciclina

Para detecção dos genes envolvidos na resistência à tetraciclina foi utilizada a metodologia preconizada por Ng et al. (2001).

A obtenção das células e extração do DNA molde foram realizadas conforme descrito no item 3.7.1.

Abaixo estão listadas seqüências iniciadoras e suas respectivas referências utilizadas:

Gene	Seqüência Iniciadora (5'-3')	Produto (pb)	Referência
<i>tetK</i>	TCG ATA GGA ACA GCA GTA CAG CAG ATC CTA CTC CTT	169	Warsa <i>et al.</i> , 1996
<i>tetL</i>	TCG TTA GCG TGC TGT CAT TC GTA TCC CAC CAA TGT AGC CG	267	McMurry <i>et al.</i> , 1987
<i>TeM</i>	GTG GAC AAA GGT ACA ACG AG CGG TAA AGT TCG TCA CAC AC	406	Warsa <i>et al.</i> , 1996
<i>tetO</i>	AAC TTA GGC ATT CTG GCT CAC TCC CAC TGT TCC ATA TCG TCA	515	Taylor <i>et al.</i> , 1987

A mistura de amplificação foi preparada conforme descrito no item 3.7.2, porém utilizando 3mM de MgCl₂.

As concentrações de cada uma das seqüências iniciadoras foram as seguintes: 1,25µM para *tetK*, 1µM para *tetL*, 0,5µM e 1,25µM para *tetO*.

As amplificações foram realizadas em termociclador, onde a mistura foi submetida a um ciclo de desnaturação inicial a 94° C (5min), seguido de ciclos a 94° C (1 min) a 55° C, para anelamento dos iniciadores e a 72° C (30 seg). para extensão. Os amplicons obtidos foram visualizados em transiluminador sob luz UV, após eletroforese em gel de agarose (Type I-A Low EEO / Sigma) a 1,5% durante 2h. em corrente constante de 90V. O tampão utilizado na corrida eletroforética em tampão TBE (Sigma) Os géis foram corados com brometo de etídeo 0,5 µg/mL (Sigma) durante 30 min, e descorados em água Milli- e, posteriormente, fotografados utilizando o sistema digital.

3.7.8 Detecção de genes de virulência

Para detecção dos genes associados com a virulência de *Enterococcus* foi utilizada a metodologia preconizada por Vankerckhoven et al. (2004).

A obtenção das células e extração do DNA molde foram realizadas conforme descrito no item 3.7.1.

Os iniciadores utilizados foram desenhados a partir dos genes que codificam os seguintes fatores de virulência dos enterococos: substância de agregação (*asa1*), gelatinase (*gelE*), citolisina (*cylA*), proteína de superfície de enterococos (*esp*) e hialuronidase (*hyl*).

Gene	Seqüência Iniciadora (5'- 3')	Produto (pb)
<i>asa1</i>	ASA 11= 5'GCA CGC TAT TAC GAA CTA TGA 3' ASA 12= 5'TAA GAA AGA ACA TCA CCA CGA 3'	375
<i>gelE</i>	GEL 11= 5'TAT GAC AAT GCT TTT TGG GAT 3' GEL 12= 5'AGA TGC ACC CGA AAT AAT ATA 3'	213
<i>cylA</i>	CYT 1= 5'ACT CGG GGA TTG ATA GGC 3' CYT IIb= 5'GCT GCT AAA GCT GCG CTT 3'	688
<i>esp</i>	ESP 14F= 5'AGA TTT CAT CTT TGA TTC TTG G 3' ESP 12R= 5'AAT TGA TTC TTT AGC ATC TGG 3'	510
<i>hyl</i>	HYL n1= 5'ACA GAA GAG CTG CAG GAA ATG 3' HYL n2= 5'GAC TGA CGT CCA AGT TTC CAA 3'	276

A mistura de amplificação foi preparada conforme descrito no item 3.7.2 utilizando 1,5 µL de MgCl₂.

Depois de preparadas todas as reações em tubos do tipo Eppendorf, estas foram levadas ao termociclador e submetidas ao seguinte programa: um ciclo de desnaturação inicial a 94°C (4 min), 94°C (1 min), 56°C (1 min), 72°C (1 min) num total de 30 ciclos e uma temperatura final de extensão de 72°C por 10 min.

Os produtos amplificados foram visualizados em transiluminador sob luz UV, após eletroforese em gel de agarose (Type I-A Low EEO / Sigma) a 1,5% durante 2 h em corrente constante de 90V. O tampão utilizado na corrida eletroforética foi TBE 1X (Sigma), 0,2M e EDTA (Sigma), 0,5M (pH 8,0)]. Os géis foram corados com brometo de etídeo (Sigma) 0,5µg/mL em água Milli-Q por 30 min, descorados em água Milli-Q e, posteriormente, fotografados utilizando o sistema.

3.8 Análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico através de eletroforese em ampo pulsado (PFGE)

O DNA cromossômico das amostras bacterianas foi analisado após extração e fragmentação utilizando a enzima de restrição *SmaI* e posterior separação dos fragmentos gerados através de eletroforese em campo pulsado (PFGE).

O DNA cromossômico foi preparado pela técnica da lise "in situ", em pequenos blocos de agarose ("plugs"), com base nos procedimentos descritos por Teixeira et al. (1997) e Mondino et al. (2003). As amostras bacterianas foram cultivadas em ágar BHI, contendo 5% de sangue desfibrinado de carneiro (BHI / Sg) e incubados durante 24h a 37° C.

Após este período de incubação foi preparada uma suspensão com turvação semelhante à do padrão 8 da escala de McFarland em 300 µl de tampão PIV [NaCl 1M, Tris HCl 10mM (Sigma) pH 7,6]. Um volume de 300 µl de agarose de baixa temperatura de fusão (NuSieve GTG Agarose; FMC Bioproducts, Rockland, ME, EUA) a 2,0% em tampão PIV foi adicionado à suspensão. Após homogenização, o material foi distribuído em moldes para a elaboração dos blocos, que foram então resfriados a 4° C durante 30 minutos. Após solidificação, os blocos de agarose, contendo as células bacterianas foram submetidos ao tratamento com solução de lise (EC) - [Tris-HCl, (Sigma), 6mM pH 7,6, NaCl (Sigma), 1M e EDTA (Sigma) 100 mM, pH 7,5, 8,5% (p/v) de Brij 58 (Sigma), 0,5% (p/v) de lauril sarcosinato de sódio (Sigma), 0,2% de desoxicolato de sódio (Sigma), 1 mg/mL de lisozima (Sigma) e 5U/mL de mutanolisina (Sigma) e incubados por 18-24h a 37° C, sob agitação. Esta solução foi, então, substituída pela solução ESP [EDTA (Sigma), 0,5M, pH 8,0, lauril sarcosinato de sódio a 1% (p/v), proteinase K (Sigma)] 10-20U/mg a 0,1mg/mL, incubando-se por 18-24h a 50° C. Após este período de incubação repetiu-se mais uma troca de tampão e o material foi reincubado nas condições acima. A partir desta etapa os blocos de agarose (plugs) foram imediatamente preparados para a digestão ou mantidos a 4° C até serem utilizados.

Antes do tratamento com a enzima de restrição *Sma*I, os blocos foram lavados com 2 mL do tampão TE [Tris-HCl, 10 mM, pH 7,6, EDTA (Sigma) 0,1 mM] por quatro vezes (duas vezes por uma hora e duas por duas horas). Os blocos foram, então tratados com o tampão específico da enzima de restrição durante 18-24h a 25° C, para equilibrar a reação e após este período, incubados com 2U da enzima de restrição *Sma*I (Amersham, Biosciences Corporation Indianápolis, Ind, USA), preparada em seu próprio tampão de acordo com as instruções do fabricante e incubada durante 18-24h a 25° C. Os blocos de agarose contendo o DNA foram fundidos a 70°C e então, aplicados nos reservatórios do gel de corrida, preparado com 1,2% (p/v) de agarose

(Molecular Biology Certified Agarose; Bio-Rad) em tampão TBE (Bio Rad) 0,5X (pH 8,3).

Os fragmentos de restrição foram separados em um sistema de eletroforese em campo pulsado utilizando-se o CHEF DR III, (Bio-Rad), utilizando-se os seguintes parâmetros: pulso inicial de 2 seg. e final de 20 seg., gradiente de voltagem 6V/cm, temperatura de 11^o C, e tempo de corrida de 22h. Padrões de pesos moleculares conhecidos (Pulse Marker, 50-1000Kb; Sigma) foram utilizados para avaliar o tamanho dos fragmentos de DNA. Os géis foram corados em solução de brometo de etídeo (Sigma) 0,5mg/mL, e observados em um transiluminador (Pharmacia) sob luz UV, e fotografados.

A análise dos perfis de fragmentação das amostras foi realizada pela inspeção visual e a análise automatizada foi realizada com auxílio do programa "Molecular Analyst Fingerprinting Plus", Versão 1.12 (BioRad). Os percentuais de similaridade dos perfis de fragmentação foram estimados pelo coeficiente de Dice (Dice, 1945) e foram gerados dendrogramas utilizando o método UPGMA (Unweighted Pair Method Using Arithmetic Averages) com tolerância de 1%.

4 RESULTADOS

4.1 Isolamento de *Enterococcus* spp a partir dos alimentos

Foram analisadas 25 amostras de carne crua de frango congeladas, resfriadas e frescas de 12 marcas diferentes, adquiridas dentro do prazo de validade para consumo, exceto uma (A-23, frango inteiro), cuja descrição no rótulo identificava o produto como “Cortes congelados especiais – Coxas e Sobrecoxas”. Na **Tabela 2** estão representadas as características das amostras de carne crua de frango, suas denominações, forma de apresentação e respectiva distribuidora, bem como a contagem das colônias/g (UFC/g) de *Enterococcus* obtidas na cultura primária.

As amostras foram denominadas pela letra A, seguida por um número de identificação de 1 a 25 e as respectivas distribuidoras, responsáveis pelos produtos foram denominadas com algarismos romanos, de tal forma que a identidade e origem dos produtos permanecessem em sigilo.

Em todas as amostras de carne de frango analisadas foram detectados isolados caracterizados como pertencentes ao gênero *Enterococcus* em ágar Enterococcosel. As contagens das UFC/g dos produtos analisados variaram de 70 UFC/g (amostra A13, coxinha de asa / congelada) até incontáveis. Estas contagens variaram consideravelmente entre as matrizes congeladas, tanto as distribuídas nas embalagens originais como entre aquelas comercializadas a granel. Entretanto, somente entre aquelas matrizes resfriadas e as frescas foi possível detectar resultados identificados como “incontáveis” nas condições do ensaio, ou seja, quando a quantidade de colônias nas placas da cultura primária, estava acima de 100 colônias por placa. Tais resultados foram observados nas amostras: A9 (retalhos de frango / fresco), A20 (coxas de frango / resfriada) e A21 (frango inteiro / resfriada).

Tabela 2: Descrição das amostras de carne crua de frango analisadas e resultados das culturas quantitativas para *Enterococcus* spp.

Denominação atribuída ^a	Apresentação ^b	Condições de refrigeração ^c	Distribuidoras ^d	UFC ^e g
A1	Frango inteiro	Congelada	I	4,8x10 ²
A2	Frango inteiro	Resfriada	II	4,5x10 ³
A3	Galeto	Congelada	II	4,4x10 ²
A4	Frango inteiro	Congelada	III	7,3x10 ²
A5	Frango inteiro	Congelada	I	3,3x10 ³
A6	Coxas/Sobrecoxas	Congelada	IV	2,4x10 ³
A7	Galeto	Congelada	II	6,9x10 ³
A8	Peito/filés	Congelada	IV	8,8x10 ³
A9	Retalhos/frango	Fresca	V	Incontável
A10	Coxas/Sobrecoxas	Congelada	II	3,9x10 ³
A11	Asas	Congelada	II	6,0x10 ³
A12	Coxas/Sobrecoxas	Congelada	II	8,6x10 ²
A13	Coxinha da asa	Congelada	VI	7,0x10
A14	Coxas/sobrecoxas	Congelada	VII	1,2x10 ²
A15	Coxas/sobrecoxas (temperadas)	Congelada	VIII	6,7x10 ²
A16	Galeto	Congelada	IX	8,0x10
A17	Sobrecoxas	Fresca	VI	1,9x10 ³
A18	Sobrecoxas	Resfriada	VI	3,8x10 ²
A19	Peito/carcaça	Resfriada	VI	2,6x10 ³
A20	Coxas	Resfriada	VI	Incontável
A21	Frango inteiro	Resfriada	X	Incontável
A22	Peito/carcaça	Congelada	XI	2,7x10 ³
A23	Coxas/sobrecoxas	Congelada	XII	5,0x10 ³
A24	Frango inteiro	Fresca	V	8,0x10 ²
A25	Frango inteiro	Fresca	V	2,9x10 ²

^a Denominação dada à amostra de carne de frango

^b Forma de apresentação do produto, quando da coleta;

^c Condições de refrigeração das amostras dispostas à venda;

^d Identificação das distribuidoras responsáveis pelos produtos;

^e Unidades formadoras de colônias sugestivas de *Enterococcus* spp por grama do alimento.

Um total de 12 diferentes distribuidoras de aves foram relacionadas aos produtos analisados, conforme distribuição ao consumidor, no varejo e denominadas por algarismos romanos de I a XII.

Entre as amostras coletadas aleatoriamente e submetidas aos ensaios, aquelas que apresentaram as contagens de enterococos mais elevadas foram: A9, A20 e A21, classificadas como UFC/g incontáveis e procedentes de três distribuidoras diferentes, respectivamente; V, VI e X; A8, com $8,8 \times 10^3$ UFC/g, procedente da distribuidora IV; A7, com $6,9 \times 10^3$ UFC/g, procedente da distribuidora II; A11, apresentando $6,0 \times 10^3$ UFC/g de produto procedente da distribuidora II; A23, apresentando $5,0 \times 10^3$ UFC/g, procedente da distribuidora XII; A2, com $4,5 \times 10^3$ UFC/g procedente da distribuidora II e A10, com $3,9 \times 10^3$ UFC/g procedente da distribuidora II.

Das 9 amostras de frango, que apresentaram as maiores contagens iniciais de colônias de *Enterococcus* nas culturas primárias, 4 foram procedentes da mesma distribuidora de aves denominada II.

Foram também analisadas 25 amostras de leite pasteurizado dos tipos B, C e desnatado. Estas amostras foram denominadas considerando as características de cada tipo de leite, ou seja LP (leite pasteurizado) LPC, LPB e LPD (tipo B, C e D) seguidos pelo número de identificação da amostra.

As usinas de beneficiamento e suas respectivas cooperativas agropecuárias foram denominadas por algarismos romanos de I a IX, enquanto os nomes de fantasia foram classificados com letras do alfabeto de A a K.

A **Tabela 3** apresenta a descrição das amostras de leite pasteurizado, incluindo a denominação atribuída às amostras, nomes de fantasia, as cooperativas distribuidoras e as contagens iniciais de colônias (UFC/mL) nos produtos analisados.

Tabela 3: Descrição das amostras de leite pasteurizado analisadas e resultados das culturas quantitativas para *Enterococcus* spp.

Denominação ^a	Nome de fantasia do produto	Cooperativa distribuidora ^b	UFC/mL ^c
LPC 1	B	II	1,0x10 ²
LPB 2	A	I	1,0x10 ³
LPB 3	A	I	7,0x10
LPB 4	C	I	8,9x10 ³
LPB 5	D	III	0
LPC 6	E	IV	11,9x10 ³
LPC 7	B	II	3,0x10
LPC 8	E	IV	1,3x10 ²
LPC 9	D	III	1,0x10
LPC 10	B	II	9,0x10
LPC 11	D	III	0
LPD 12	F	V	9,0x10
LPB 13	A	I	5,8x10 ²
LPB 14	C	I	1,7x10 ²
LPB 15	C	I	3,5x10 ²
LPC 16	G	VI	0
LPC 17	B	II	Incontáveis
LPC 18	H	VII	0
LPC 19	E	IV	3,4x10 ²
LPC 20	E	IV	4,0x10 ²
LPC 21	D	III	0
LPB 22	A	I	Incontáveis
LPC 23	I	IV	Incontáveis
LPB 24	A	I	Incontáveis
LPC 25	I	II	Incontáveis

^a Denominação dada à amostra de leite;

^b Denominação das distribuidoras responsáveis pelos produtos;

^c Unidades Formadoras de Colônias sugestivas de *Enterococcus* spp. por mL da amostra de leite.

Na amostragem de leite pasteurizado as contagens de UFC/mL variaram de zero a incontáveis, sendo que houve uma diferença considerável envolvendo tanto as marcas como suas respectivas cooperativas avaliadas.

Entre as 25 amostras de leite pasteurizado analisadas 5 [LPB5 (D / III), LPD/11 (D / III), LPC / 16 (G / V), LPC/18(H / VII) e LPC/21 (D / III)], apresentaram resultados negativos para a pesquisa de microrganismos pertencentes ao gênero *Enterococcus* em Agar Enterococcosel. Cinco amostras apresentaram resultados “incontáveis” (nº de colônias acima de 100 por placa): LPC/17 (B / II); LPB/22 (A / I); LPC/23 (I / VIII); LPB/24 (A / I) e LPC/25 (I / II).

Contagens também elevadas de UFC/mL foram observadas em tres outras amostras de leite; sobretudo a LPC/6 com nome de fantasia representado pela letra E, procedente da cooperativa de processamento IV, apresentando contagem de $11,9 \times 10^3$ UFC/mL. A amostra LPB/4 cujo nome de fantasia e cooperativa de processamento são C e I respectivamente, apresentou $8,9 \times 10^3$ UFC/mL do produto analisado. E a amostra LPB 2, da marca A procedente da cooperativa I apresentou $1,0 \times 10^3$ UFC de enterococos por mL de produto. As 12 demais amostras de leite apresentaram contagens entre 10 e $5,8 \times 10^2$ UFC/mL.

4.2 Caracterização fisiológica das amostras bacterianas

Foram isoladas 294 amostras de *Enterococcus* spp. dos produtos alimentícios analisados neste estudo. Destas, 167 foram isoladas a partir de carne crua de frango e 127 foram recuperadas de leite pasteurizado. Tais microrganismos apresentaram-se como cocos Gram positivos, catalase negativos, capazes de hidrolisar a bile em presença de esculina, produzirem as enzimas PYRase e LAPase e crescerem na presença de 6,5% de NaCl.

Duzentos e oitenta e três (96,6%) amostras de *Enterococcus* foram identificados quanto à espécie. Entretanto, 10 (3,8%) não foi possível a identificação da espécie com base nas características fisiológicas, muito embora pelas características fenotípicas 8 destes isolados tenham sido classificados dentro dos grupos fisiológicos propostos por Facklam e colaboradores (1989), conforme a seguir:

A1/7: arginina negativa, manitol positivo, sorbose e sorbitol positivos: **Grupo I**; A3/9B: arginina, manitol, sorbose e sorbitol negativos: **Grupo IV**;

A8/3: arginina e manitol positivos, sorbose e sorbitol negativos: **Grupo II**;
A10/10: arginina e sorbitol positivos, manitol, e sorbose negativos: **Grupo III**;
A20/2: arginina, manitol, sorbose e sorbitol negativos: **Grupo IV**; A21/4G:
arginina, e sorbitol negativos, manitol e sorbose positivos: **Grupo I**; LPC7/8:
arginina negativas, sorbose e sorbitol positivos: **Grupo I**. LPB24/1: manitol,
sorbose, rafinose, telurito de K, sacarose e piruvato de sódio negativos e
arginina, arabinose, sorbitole MGP positivos, **Grupo I**.

A distribuição das espécies entre os *Enterococcus*, relacionados com suas fontes de isolamento está representada na **Tabela 4**.

Das 294 amostras de enterococos isoladas, a maioria (62,6%) pertenceram à espécie *E. faecalis*, seguida por *E. casseliflavus* (17,3%), *E. durans* (6,5%); *E. gallinarum* (3%); *E. gilvus* (2,4%); *E. faecium* (2%); *E. hirae* (1,4%); *E. sulfureus* (1%) e 11 (3,8%) sem identificação. Considerando cada tipo de alimento em particular, a espécie *E. faecalis* foi isolada predominantemente tanto em carne de frango (85/167; 50,9%) como em leite (99/127; 77,9%).

Em relação às outras espécies houve diferenças na distribuição em ambos os tipos de alimentos. Assim o *E. casseliflavus* foi mais frequentemente isolada de carne de frango do que de leite (26,3% X 5,5%), o mesmo acontecendo com *E. gallinarum* (4,2% X 1,6%), *E. faecium* (3% X 0,8%). Ao contrário, *E. durans* foi mais frequentemente isolada de leite do que de frango (12,6% X 1,8%). As espécies *E. gilvus*, *E. hirae* e *E. sulfureus* foram isoladas apenas de carne de frango.

A percentagem de espécies não identificadas foi maior entre os isolados de carne de frango (5,4%), quando comparada com os de leite (1,6%).

Tabela 4: Distribuição das espécies e fontes de isolamento entre *Enterococcus* isolados a partir de frango e de leite pasteurizado

Espécies	Número (%) de isolados / Fonte de Isolamento		
	Carne de Frango	Leite Pasteurizado	Total
<i>E. faecalis</i>	85 (50,9)	99 (77,9)	184 (62,6)
<i>E. casseliflavus</i>	44 (26,3)	7 (5,5)	51 (17,3)
<i>E. durans</i>	3 (1,8)	16 (12,6)	19 (6,5)
<i>E. gallinarum</i>	7 (4,2)	2 (1,6)	9 (3,0)
<i>E. gilvus</i>	7 (4,2)	-	7 (2,4)
<i>E. faecium</i>	5 (3,0)	1 (0,8)	6 (2,0)
<i>E. hirae</i>	4 (2,4)	-	4 (1,4)
<i>E. sulfureus</i>	3 (1,8)	-	3 (1,0)
Sem identificação	9 (5,4)	2 (1,6)	11 (3,8)
Total de Isolados	167 (100)	127 (100)	294 (100)

Entre os isolados procedentes de carne de frango, 107 (67,7%) apresentaram perfis fenotípicos clássicos, enquanto 51 (32,3%) apresentaram perfis fisiológicos com algumas atípicas, observadas tanto entre as espécies mais frequentes como entre aquelas isoladas com menor frequência (**Tabela 5**). Neste grupo, os resultados fisiológicos atípicos mais frequentes envolveram a não descarboxilação da arginina entre os *E. casseliflavus* e a fermentação da rafinose entre os *E. faecalis*.

Tabela 5: Perfis fenotípicos típicos e atípicos entre as amostras bacterianas pertencentes a espécies de *Enterococcus* spp predominantes em carne de frango

Testes fenotípicos	<i>E. faecalis</i>					<i>E. casseliflavus</i>						<i>E. gilvus</i>		<i>E. gallinarum</i>		
	1 ^a (70)	2 ^b (1)	3 ^b (12)	4 ^b (1)	5 ^b (1)	1 ^a (22)	2 ^b (13)	3 ^b (1)	4 ^b (1)	5 ^b (5)	6 ^b (2)	1 ^a (5)	2 ^b (2)	1 ^a (5)	2 ^b (1)	3 ^b (1)
Manitol	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Arginina	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Arabinose	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	V	V ^d	V	V	V	V	+	+	-	-	+
Rafinose	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Telurito K	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
Motilidade	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
Pigmento	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Piruvato	+	+	+	-	-	V	V ^e	V	V	V	V	+	+	-	-	-
MGP ^c	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+

^a perfis fisiológicos típicos

^b perfis fisiológicos atípicos

^c MGP – metil- α -D-glicopiranosídeo

^d 8 isolados (+); 5 isolados (-)

^e 8 isolados (+); 16 isolados (-)

sinais (+ / -) sombreados representam as variações fisiológicas observadas.

Entre as 85 amostras de enterococos caracterizados como *E. faecalis* isoladas de carne de frango, 70 (82,35%) apresentaram perfis fisiológicos típicos (denominados biotipo 1) com resultados negativos para a produção de ácido a partir de sorbose, arabinose, rafinose, sorbose e positivo frente a manitol, sacarose e sorbitol. Entretanto, 15 outros isolados apresentaram biotipos diferentes com atipias fisiológicas representadas, conforme a seguir:

Uma amostra bacteriana A3/4 apresentou resultados positivos para a produção de ácido pela fermentação da rafinose e do MGP (biotipo 2).

Doze amostras, procedentes de três matrizes, apresentaram resultados positivos para a produção de ácido a partir de rafinose (biotipo 3).

Uma amostra bacteriana (A4/1) representou o biotipo 4, com reação negativa para a produção de ácido a partir do manitol; enquanto uma outra (A19/5) apresentou resultado negativo para a utilização do piruvato de sódio (biotipo 5).

Entre as 44 amostras bacterianas caracterizadas como *E. casseliflavus*, 22 apresentaram o perfil fisiológico clássico, enquanto as demais mostraram atipias fisiológicas: treze representantes procedentes de 4 matrizes diferentes, apresentaram resultados negativos quanto à capacidade de descarboxilação da arginina (biotipo 2). Uma amostra apresentou resultados negativos para a

descarboxilação da arginina e para a produção de ácido a partir do MGP (biotipo 3), e uma amostra bacteriana com resultados negativos para a descarboxilação da arginina e positivo para o crescimento em presença do telurito de potássio (biotipo 4). Cinco amostras bacterianas procedentes de 4 frangos diferentes foram incluídos no biotipo 5, onde os isolados apresentaram resultados negativos para a descarboxilação da arginina e para a motilidade.

Os demais biotipos atípicos representados por duas amostras (A10/9 e A12/1) com atipias fisiológicas relacionadas com a descarboxilação da arginina, tolerância à presença de telurito de potássio e motilidade foram classificados no biotipo 6.

Entre os 7 isolados caracterizados como *E. gallinarum* procedentes de carne de frango, 5 apresentaram resultados positivos para a produção de ácido a partir de arabinose, manitol rafinose, sacarose e MGP, bem como para a descarboxilação da arginina e foram negativos frente à sorbose, ao sorbitol, tolerância ao telurito de potássio e do piruvato de sódio, compondo o biotipo 1. Entretanto, observou-se também nesta espécie, variantes com atipias fisiológicas assim representadas: uma amostra (A5/4) com resultado negativo para o teste da motilidade (biotipo 2) e outra (A5'/7), negativa para a descarboxilação da arginina e para a produção de ácido a partir de sorbitol, além de ser tolerante à presença do telurito de potássio (biotipo 3).

Na amostragem em estudo foi possível também detectar a presença de 7 isolados caracterizados como *E. gilvus*, sendo que 5 deles (A1/5, A1/10, A7/5, A7/6 e A13/2) apresentaram reação positiva para a produção de ácido frente aos açúcares manitol, sorbitol, rafinose e sacarose e também para o teste da utilização do piruvato de sódio, enquanto negativos para a descarboxilação da arginina e para a produção de ácido frente à sorbose e à arabinose (biotipo 1). Entretanto, dois isolados (A1/3 e A5/1) pertencentes a esta espécie apresentaram atipias fisiológicas representadas por resultados negativos para a produção de ácido a partir da sorbose e positivos frente ao MGP (biotipo 2).

Entre amostras identificadas como *E. faecium*, *E. durans* e *E. sulfureus*, embora isoladas com menor frequência, a partir de carne crua de frango, e também ocorreram atipias fisiológicas que estão representadas na **Tabela 6**.

Entre os 6 isolados caracterizados como *E. faecium*, 4 apresentaram resultados positivos para a descarboxilação da arginina e para a produção de ácido frente ao manitol, arabinose, sorbitol, rafinose e sacarose e resultado

negativo para o crescimento em presença do telurito de potássio, utilização do piruvato e produção de ácido a partir do MGP (biotipo 1). Entretanto, dois isolados (A17/5 e A25/3) apresentaram resultado negativo para o teste da produção de ácido a partir da sacarose (biotipo 2).

Entre as quatro amostras de *E. hirae*, nenhuma apresentou características bioquímicas clássicas (biotipo 1): uma (A3/7) apresentou atipias fisiológicas envolvendo a produção de ácido a partir da arabinose (biotipo 2); duas delas (A14/3 e A14/4) apresentaram tolerância à presença de telurito de potássio (biotipo 3), enquanto uma (A21/5) apresentou reação positiva para a produção de ácido na presença de sorbitol (biotipo 4).

Os três isolados caracterizados como *E. durans* (A3/6, A22/2G e A25/3) apresentaram o perfil fisiológico esperado, sendo positivos apenas para a descarboxilação da arginina e negativos para a produção de ácido a partir de arabinose manitol, rafinose, sacarose, sorbose, sorbitol, e MGP e também para o crescimento na presença do telurito de potássio e para a utilização do piruvato de sódio.

Três isolados procedentes de carne de frangos foram caracterizados como *E. sulfureus*. Nenhuma destas amostras apresentou o perfil fisiológico clássico, uma vez que foram positivas para a produção de ácido a partir de arabinose, assim como para o crescimento na presença de telurito de potássio (biotipo 2).

Tabela 6: Perfis fenotípicos típicos e atípicos entre espécies de *Enterococcus* de baixa frequência de isolamento a partir de carne de frango

Testes Fenotípicos	<i>E. faecium</i>		<i>E. hirae</i>				<i>E. durans</i>	<i>E. sulfureus</i>	
	1 ^a (4)	2 ^b (2)	1 ^a (0)	2 ^b (1)	3 ^b (2)	4 ^b (1)	1 ^a (3)	1 ^a (0)	2 ^b (3)
Manitol	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginina	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Arabinose	+	+	-	+	-	-	-	-	+
Sorbitol	V	V ^d	-	-	-	+	-	-	-
Rafinose	V	V ^e	+	+	+	+	-	+	+
Telurito K	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Motilidade	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pigmento	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Sacarose	+	-	+	+	+	+	-	+	+
Piruvato	-	-	-	-	-	-	-	-	+
MGP ^c	-	-	-	-	-	-	-	+	+

^a perfis fisiológicos típicos

^b perfis fisiológicos atípicos

^c MGP – Metil- α -glicopiranosídeo

^d 1 isolado (+); 4 isolados (-)

^e 3 isolados (+); 2 isolados (-)

sinais (+ / -) sombreados representam as variações fisiológicas apresentadas pela espécie.

As 125 amostras de enterococos isoladas a partir de leite pasteurizado foram identificadas como: *E. faecalis* (77,9%), *E. durans* (12,6%), *E. casseliflavus* (5,5%), *E. gallinarum* (1,6%) e *E. faecium* (0,8%). Entre estas, 80 apresentaram perfis fisiológicos típicos, enquanto que 45 mostraram alguma atipia fisiológica. O maior número de resultados fisiológicos atípicos envolveu os testes referentes ao telurito de potássio, a produção de ácido a partir da sacarose e MGP e da utilização do piruvato de sódio (**Tabela 7**).

Tabela 7: Perfis fenotípicos típicos e atípicos entre espécies de *Enterococcus* isolados a partir de leite pasteurizado

Testes fenotípicos	<i>E. faecalis</i>			<i>E. durans</i>		<i>E. casseliflavus</i>		<i>E. gallinarum</i>		<i>E. faecium</i>
	1 ^a (97)	2 ^b (1)	3 ^b (1)	1 ^a (7)	2 ^b (9)	1 ^a (3)	2 ^b (4)	1 ^a (1)	2 ^b (1)	1 ^a (1)
Manitol	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginina	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Arabinose	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	-	-	-	V	V ^d	-	-	V
Rafinose	-	-	-	-	-	+	+	+	+	V
Telurito K	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
Motilidade	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
Pigmento	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Sacarose	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
Piruvato	+	+	+	-	-	V	V ^e	-	-	-
MGP ^d	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-

^a perfis fisiológicos típicos;

^b perfis fisiológicos atípicos;

^c MGP – Metil- α -glicopiranosídeo

^d *E. casseliflavus* : V (+) 4 / (-) 3 (sorbitol)

^e *E. casseliflavus*: V (+) 3 / (-) 4 (piruvato de sódio)

sinais +/- sombreados representam as variações fisiológicas dentro da espécie.

Entre as 99 amostras caracterizadas como *E. faecalis* isoladas de leite 97 (77,6%) apresentaram resultados positivos para os testes referentes à descarboxilação da arginina, para o crescimento em presença de telurito de potássio, a utilização do piruvato de sódio e produção de ácido a partir dos açúcares manitol, sorbitol e sacarose, enquanto negativos frente à sorbose, arabinose, rafinose e MGP (biotipo 1). Entretanto, outros dois biotipos foram observados neste grupo de microrganismos, representados por uma amostra (LPB13/6) com resultado negativo para a produção de ácido a partir do manitol, e positivo frente ao MGP (biotipo 2), e outra (LPB8/4B) apresentando resultado negativo para a produção de ácido a partir do sorbitol (biotipo 3). Um isolado bacteriano deste grupo o LPC1/7 apresentou atipia fisiológica relacionada com a utilização do piruvato de sódio (biotipo 4).

Entre 16 amostras de *E. durans* procedentes de leite pasteurizado, 7 apresentaram resultados positivos para a descarboxilação da arginina e

negativos para a produção de ácido a partir dos açúcares arabinose, manitol, rafinose, sacarose, sorbose, sorbitol e MGP assim como para o crescimento em presença de telurito de potássio e para a utilização do piruvato de sódio (biotipo 1). Por outro lado, 9 amostras das espécie apresentaram resultados positivos para os testes de verificação do crescimento na presença de telurito de potássio: e foram alocadas no biotipo 2.

Entre as 7 amostras bacterianas isoladas de leite e identificadas como *E. casseliflavus*, três apresentaram o perfil bioquímico típico, compondo o biotipo 1, sendo positivos para a produção de ácido a partir de arabinose manitol, rafinose, sacarose, sorbitol e MGP, bem como para a descarboxilação da arginina e utilização do piruvato de sódio, e resultados negativos frente à sorbose e crescimento na presença do telurito de potássio. Entretanto, 4 amostras apresentaram resultados negativos para a descarboxilação da arginina e positivos para o crescimento em presença do telurito de potássio (biotipo 2).

Entre os 2 isolados caracterizados como *E. gallinarum* obtidos de leite, um (LPC6/2) apresentou resultados fisiológicos típicos, sendo positivo para a produção de ácido a partir de manitol, arabinose, rafinose, sacarose e MGP, bem como positivo para a descarboxilação da arginina, utilização do piruvato de sódio e negativo para a produção de ácido a partir de sorbose, sorbitol e para o crescimento em presença de telurito de potássio (biotipo 1). O outro isolado caracterizado como *E. gallinarum* (LPC6/2) apresentou resultado positivo para o crescimento em presença de telurito de potássio.

O único isolado procedente de leite pasteurizado, caracterizado como *E. faecium* (LPC20/1) apresentou resultado positivo para o teste da utilização do piruvato de sódio, bem como para a produção de ácido a partir de arabinose, manitol e sacarose, enquanto negativo para a descarboxilação da arginina, em crescimento na presença de telurito de potássio e para a produção de ácido a partir do MGP (biotipo 1).

4.3 Susceptibilidade aos antimicrobianos

Dos 294 isolados caracterizados como enterococos, 283 foram submetidos aos testes para verificação da susceptibilidade frente a 14 antimicrobianos, através de testes de difusão em ágar. Na **Tabela 8** estão representados os resultados dos testes de susceptibilidade a antimicrobianos.

Vinte e um (7,4%) isolados apresentaram-se sensíveis a todos os antimicrobianos testados, sendo 15 (5,3%) obtidos de carne crua de frango e 6 (2,1%) de leite pasteurizado. A maioria das amostras apresentou resultados de sensibilidade a vários antimicrobianos testados: ampicilina (99,6%), cloranfenicol (94,0%), gentamicina (96,1%), imipenem (97%), nitrofurantoína (97,9%), norfloxacin (95,4%) e penicilina (99,3%). Entre as quinolonas testadas, foi possível observar uma taxa de susceptibilidade mais elevada frente à norfloxacin (95,4%), quando comparada com os resultados encontrados frente à ciprofloxacina (83%). Por outro lado, os percentuais referentes a resistência intermediária foram mais elevados em relação à ciprofloxacina (16,3%) que frente a norfloxacin (3,5%). Todos os isolados apresentaram sensibilidade aos dois glicopeptídeos testados (teicoplanina e vancomicina).

Entre as diferentes espécies de *Enterococcus* isoladas com maior frequência a partir dos dois tipos de alimentos estudados, algumas espécies apresentaram 100% de sensibilidade frente a vários antimicrobianos conforme indicado a seguir: *E. faecalis* (AM, LN, PE, TE, VA); *E. casseliflavus* (AM, CL, IM, LN, NI, PE, TE, VA); *E. durans* (AM, CL, PE, TE, VA) e *E. gallinarum* (AM, CI, CL, IM, LN, NI, PE, TE, VA).

As amostras pertencentes a espécies de baixa frequência de isolamento caracterizadas como *E. sulfureus* e *E. gilvus* apresentaram-se sensíveis a todos os antimicrobianos testados, enquanto as amostras pertencentes à espécie *E. hirae* mostraram-se sensíveis a AM, CI, CL, IM, LN, NI, PE, TE, VA.

Tabela 8: Susceptibilidade aos antimicrobianos de amostras das diferentes espécies de *Enterococcus* spp isoladas de carne de frango e leite pasteurizado

Espécies (No. de isolados)	Perfil de Susceptibilidade ^b	Agentes Antimicrobianos ^a - número (%)													
		AM	CI	CL	ER	GE	IM	LN	NI	NO	PE	ES	TE	TT	VA
<i>E. faecalis</i> (184)	S	184 (100)	154 (83.7)	168 (91.3)	16 (8.7)	183 (99.5)	180 (97.8)	184 (100)	182 (98.9)	178 (96.7)	184 (100)	159 (86.4)	184 (100)	112 (60.8)	184 (100)
	I	-	30 (16.2)	3 (1.6)	114(62)	-	1 (0.5)	-	1 (0.5)	6 (3.3)	-	-	-	13 (7.1)	-
	R	-	-	13 (7.1)	54 (29.3)	1 (0.5)	3 (1.6)	-	1 (0.5)	-	-	25 (13.6)	-	59 (32.1)	-
<i>E. casseliflavus</i> (51)	S	51 (100)	45 (88.2)	51 (100)	18 (35.3)	46 (90.2)	51 (100)	51 (100)	51 (100)	46 (90.2)	51 (100)	50 (98)	51 (100)	31 (60.8)	51 (100)
	I	-	4 (7.8)	-	28 (54.9)	-	-	-	-	2 (4)	-	-	-	-	-
	R	-	2 (4.0)	-	5 (9.8)	5 (11.8)	-	-	-	3 (5.8)	-	1 (2)	-	20 (39.2)	-
<i>E. durans</i> (19)	S	19 (100)	13 (68.4)	19 (100)	3 (15.8)	18 (94.7)	17 (89.5)	18 (94.7)	17 (89.5)	18 (94.7)	19 (100)	18 (94.7)	19 (100)	16 (84.2)	19 (100)
	I	-	6 (31.6)	-	13 (68.4)	-	1 (5.2)	1 (5.3)	1 (5.2)	1 (5.3)	-	-	-	1 (5.3)	-
	R	-	-	-	3 (15.8)	1 (5.3)	1 (5.2)	-	1 (5.2)	-	-	1 (5.3)	-	2 (10.5)	-
<i>E. gallinarum</i> (9)	S	9 (100)	9 (100)	9 (100)	7 (77.7)	5 (55.6)	9 (100)	9 (100)	9 (100)	8 (88.9)	9 (100)	5 (55.6)	9 (100)	4 (44.4)	9 (100)
	I	-	-	-	2 (22.2)	-	-	-	-	1 (11.1)	-	-	-	3 (33.3)	-
	R	-	-	-	-	4 (44.4)	-	-	-	-	-	4 (44.4)	-	2 (22.2)	-
<i>E. gilvus</i> (7)	S	7 (100)	6 (85.7)	7 (100)	3 (42.8)	7 (100)	7 (100)	7 (100)	7 (100)	7 (100)	7 (100)	7 (100)	7 (100)	5 (71.4)	7 (100)
	I	-	1 (14.3)	-	3 (42.8)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R	-	-	-	1 (14.3)	-	-	-	-	-	-	-	-	2 (28.6)	-
<i>E. faecium</i> (6)	S	5 (83)	2 (33.3)	5 (83)	1 (16.6)	6 (100)	4 (66.6)	6 (100)	4 (66.6)	6 (100)	4 (66.6)	6 (100)	6 (100)	2 (33.3)	6 (100)
	I	-	4 (66.6)	1 (17)	2 (33.3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R	1 (17)	-	-	3 (50.0)	-	2 (33.3)	-	2 (33.3)	-	2 (33.3)	-	-	4 (66.6)	-
<i>E. hirae</i> (4)	S	4 (100)	4 (100)	4 (100)	1 (25)	4 (100)	4 (100)	4 (100)	4 (100)	4 (100)	4 (100)	3 (75)	4 (100)	2 (50)	4 (100)
	I	-	-	-	3 (75)	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (25)	-
	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (25)	-	1 (25)	-
<i>E. sulfureus</i> (3)	S	3 (100)	2 (66.6)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	2 (66.6)	3 (100)
	I	-	1 (33.3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (33.3)	-
Total: 283	S	282 (99.6)	235 (83.0)	266 (94.0)	52 (18.4)	272 (96.1)	275 (97.2)	282 (99.6)	277 (97.9)	270 (95.4)	281 (99.3)	251 (88.7)	283 (100)	174 (61.5)	283 (100)
	I	-	46 (16.3)	4 (1.4)	165 (58.3)	-	2 (0.7)	1 (0.4)	2 (0.7)	10 (3.5)	-	-	-	18 (6.4)	-
	R	1 (0.4)	2 (0.7)	13 (4.6)	66 (23.3)	11 (3.9)	6 (2.1)	-	4 (1.4)	3 (1.1)	2 (0.7)	32 (11.3)	-	91 (32.1)	-

^a agentes antimicrobianos: AM, ampicilina; CI, ciprofloxacina; CL, cloranfenicol; ER, eritromocina; GE, gentamicina; IM, imipenem; LN, linezolida; NI, nitrofurantóina; NO, norfloxacina; PE, penicilina; ES, estreptomicina; TE, teicoplanina; TT, tetraciclina e VA, vancomicina.

^b Perfis de susceptibilidade: S = sensível; I = intermediária e R = resistente.

Percentuais significativos de resistência intermediária envolvendo amostras bacterianas isoladas das duas matrizes de alimentos investigadas foram relativos a eritromicina (165 amostras, 58,3%), sobretudo entre os *E. faecalis* (14 amostras, 62%), *E. casseliflavus* 28 (54,9%) e *E. durans* (13 amostras, 68,4%).

Observou-se ainda, que 48 (17%) amostras, sendo 17 (6%) procedentes de carne de frango e 31 (11%) de leite pasteurizado, apresentaram resistência intermediária a dois ou mais antimicrobianos simultaneamente. Estas condições envolveram a maioria das espécies identificadas, com relação aos macrolídeos, fluoroquinolonas, nitrofurantoína e cloranfenicol.

A resistência plena aos antimicrobianos testados foi detectada nas diferentes espécies de enterococos isolados a partir de ambas as fontes de isolamento. Os percentuais mais elevados de resistência envolveram tetraciclina (91 isolados, 32,1%), eritromicina (66 isolados, 23,3%), estreptomicina (32 isolados, 11,3%) e cloranfenicol (13 isolados, 4,6%). Quando foram consideradas as diferentes espécies sob o ponto de vista da resistência plena à tetraciclina, foi observado que os percentuais mais elevados foram registrados em *E. faecium* (4 amostras, 66,6%), seguidos por *E. casseliflavus* (20 amostras, 39,2%) e *E. faecalis* (59 amostras, 32,1%). Por outro lado considerando-se a resistência plena à eritromicina e estreptomicina os maiores percentuais envolveram apenas *E. faecalis*, sendo observados em 29,3% e 13,6% respectivamente.

Na **Tabela 9** estão representados os resultados sobre a susceptibilidade aos antimicrobianos considerando apenas as amostras isoladas a partir de carne crua de frango.

Os percentuais mais elevados de sensibilidade aos antimicrobianos testados, envolvendo as espécies mais freqüentemente isoladas foram observados entre os *E. casseliflavus*, onde todos os isolados apresentaram-se sensíveis a AM, CL, IM, LN, NI, PE, TE e VA, enquanto todos os *E. faecalis* apresentaram sensibilidade a AM, PE, TE e VA. Entre as amostras pertencentes a espécies de menor freqüência de isolamento em carne de frango, os percentuais de sensibilidade mais elevados foram observados entre *E. sulfureus*, sensíveis a 12 dos antimicrobianos testados (AM, CL, ER, GE, IM, LN, NI, NO, PE, ES, TE e VA), enquanto *E. durans* e *E. gilvus* apresentaram-se sensíveis a 11 dos antimicrobianos testados (AM, CI, CL, GE, LN, NI, NO, PE,

ES, TE e VA / (AM, CL, GE, IM, LN, NI, NO, PE, ES, TE e VA respectivamente) e *E. gallinarum* a 9 deles (AM, CI, CL, IM, LN, NI, PE, TE e VA).

Do total de 158 isolados obtidos a partir de frango os maiores percentuais de sensibilidade foram observados com relação a ampicilina (99,4%), penicilina (98,7%), nitrofurantoína (97,5%), linezolida (96,2%) e norfloxacina (94,3%), imipenem (94,9%).

Percentuais significativos de resistência intermediária foram observados em relação à eritromicina (63 amostras, 39,9%), envolvendo, principalmente, *E. casseliflavus* (52,3%), seguidos por *E. faecalis* (36,5%) e *E. gallinarum* (28,6%), sendo também encontrada as espécies isoladas com menor frequência a partir de frangos: *E. hirae* (75%), *E. gilvus* (42,9%) e *E. faecium* (20%). Em relação à tetraciclina 42,8% das amostras *E. gallinarum*, 33,3% das de *E. durans* e 25% das de *E. hirae* apresentaram resistência intermediária quando testados frente a este antimicrobiano.

Os percentuais mais elevados de resistência aos antimicrobianos testados entre os isolados obtidos a partir de frangos envolveram a tetraciclina (53,8%), seguidos pela eritromicina (33,3%) e estreptomicina (15,2%).

Entre as amostras de *E. faecalis*, 53 (62,4%) isolados apresentaram resistência à tetraciclina, seguidos por 48,2% apresentando resistência à eritromicina e 22,4% resistência à estreptomicina. Entre as amostras de *E. casseliflavus* percentual mais elevado de resistência foi relacionado à tetraciclina (45,5%). Por outro lado as amostras identificadas como *E. gallinarum* apresentaram os maiores índices de resistência frente à estreptomicina e gentamicina (57,1% das amostras), seguidos pela resistência à tetraciclina observada em 28,6% dos isolados. Amostras de *E. gilvus*, apresentaram características de resistência plena envolvendo a tetraciclina (28,6%) e a eritromicina (14,2%). Os *E. faecium* apresentaram índices mais elevados de resistência envolvendo a tetraciclina (80%), seguidos pela eritromicina (60%) e penicilina (40%), enquanto a espécie *E. hirae* apresentou resistência apenas à tetraciclina (25%).

Tabela 9: Susceptibilidade aos antimicrobianos das diferentes espécies de *Enterococcus* spp isoladas de carne de frango

Espécies (No. de isolados)	Perfis de susceptibilidade ^b	Agentes Antimicrobianos ^a / Número (%)													
		AM ^c	CI	CL	ER	ES	GE	IM	LN	NI	NO	PE	TE	TT	VA
<i>E. faecalis</i> (85)	S	85 (100)	65 (76,6)	74 (87,1)	13 (15,3)	66 (77,6)	84 (98,8)	81 (95,3)	81 (95,3)	33 (97,3)	80 (94,1)	85 (100)	85 (100)	31 (36,5)	85 (100)
	I	-	20 (23,5)	2 (2,4)	31 (36,5)	-	-	1 (1,2)	-	1 (1,2)	5 (5,9)	-	-	1 (1,2)	-
	R	-	-	9 (10,6)	41 (48,2)	19 (22,4)	1 (1,2)	3 (3,5)	-	1 (1,2)	-	-	-	53 (62,4)	-
<i>E. casseliflavus</i> (44)	S	44 (100)	39 (88,6)	44 (100)	17 (38,6)	43 (97,7)	39 (88,6)	44 (100)	42 (95,5)	44 (100)	41 (93,2)	44 (100)	44 (100)	24 (54,5)	44 (100)
	I	-	3 (6,8)	-	23 (52,3)	-	-	-	-	-	1 (2,3)	-	-	-	-
	R	-	2 (4,5)	-	4 (9,1)	1 (2,3)	5 (11,4)	-	-	-	2 (4,5)	-	-	20 (45,5)	-
<i>E. durans</i> (3)	S	3 (100)	3 (100)	3 (100)	1 (33,3)	3 (100)	3 (100)	1 (33,3)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	-	3 (100)
	I	-	-	-	-	-	-	1 (33,3)	-	-	-	-	-	1 (33,3)	-
	R	-	-	-	2 (66,7)	-	-	1 (33,3)	-	-	-	-	-	2 (66,7)	-
<i>E. gallinarum</i> (7)	S	7 (100)	7 (100)	7 (100)	5 (71,4)	3 (42,9)	3 (42,9)	7 (100)	7 (100)	7 (100)	6 (85,7)	7 (100)	7 (100)	2 (28,6)	7 (100)
	I	-	-	-	2 (28,6)	-	-	-	-	-	1 (14,3)	-	-	3 (42,8)	-
	R	-	-	-	-	4 (57,1)	4 (57,1)	-	-	-	-	-	-	2 (28,6)	-
<i>E. gilvus</i> (7)	S	7 (100)	6 (85,7)	7 (100)	3 (42,9)	7 (100)	7 (100)	7 (100)	7 (100)	7 (100)	7 (100)	7 (100)	7 (100)	5 (71,4)	7 (100)
	I	-	1 (14,3)	-	3 (42,9)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R	-	-	-	1 (14,2)	-	-	-	-	-	-	-	-	2 (28,6)	-
<i>E. faecium</i> (5)	S	4 (80)	1 (20)	4 (80)	1 (20)	5 (100)	5 (100)	3 (60)	5 (100)	3 (60)	5 (100)	3 (60)	5 (100)	1 (20)	5 (100)
	I	-	80 (4)	1 (20)	1 (20)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R	1 (20)	-	-	3 (60)	-	-	2 (40)	-	2 (40)	-	2 (40)	-	4 (80)	-
<i>E. hirae</i> (4)	S	4 (100)	4 (100)	4 (100)	1 (25)	3 (75)	4 (100)	4 (100)	4 (100)	4 (100)	4 (100)	4 (100)	4 (100)	2 (50)	4 (100)
	I	-	-	-	3 (75)	1 (25)	-	-	-	-	-	-	-	1 (25)	-
	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (25)	-
<i>E. sulfureus</i> (3)	S	3 (100)	2 (66,7)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	2 (66,7)	3 (100)
	I	-	1 (33,3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (33,3)	-
Total: 158	S	157 (99,4)	127 (80,4)	146 (92,4)	44 (27,8)	133 (84,2)	148 (93,7)	150 (94,9)	152 (96,2)	154 (97,5)	149 (94,3)	156 (98,7)	158 (100)	67 (42,4)	158 (100)
	I	-	29 (18,30)	3 (1,9)	63 (39,9)	1 (0,6)	-	2 (1,3)	6 (3,8)	1 (0,6)	7 (4,4)	-	-	6 (3,8)	-
	R	1 (0,6)	2 (1,3)	9 (5,7)	51 (32,3)	24 (15,2)	10 (6,3)	6 (3,8)	-	3 (1,9)	3 (1,9)	2 (1,3)	2 (1,3)	-	85 (53,8)

^a agentes antimicrobianos: AM, ampicilina; CI, ciprofloxacina; CL, cloranfenicol; ER, eritromicina; GE, gentamicina; IM, imipenem; LN, linezolida; NI, nitrofurantoína; NO, norfloxacina; PE, penicilina; ES, estreptomicina; TE, teicoplanina; TT, tetraciclina e VA, vancomicina.

^b Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos: S, sensível; I, intermediária e R, resistente.

A **Tabela 10** apresenta os perfis de resistência aos antimicrobianos das espécies de enterococos isolados a partir de carne de frango. Noventa e nove amostras de enterococos apresentaram o fenótipo de resistência a pelo menos um ou mais antimicrobianos, envolvendo as diferentes espécies identificadas: *E. faecalis* (58), *E. casseliflavus* (22), *E. faecium* (7), *E. gallinarum* (5), *E. gilvus* (2), *E. hirae* (2) e *E. durans* (2), e *E. sulfureus* (1). Destas, 36 amostras apresentaram resistência para apenas um antimicrobiano (ER, ES, NI ou TT), enquanto que 35 apresentaram resistência simultânea para dois dos antimicrobianos testados: 22 isolados para ER/TT; 5 isolados para GE/TT; 1 isolado para NI/TT; 2 isolados para ES/TT; 3 isolados para ER/GE e 2 isolados para ER/ES.

Vinte e oito amostras apresentaram resistência a três ou mais antimicrobianos simultaneamente: 11 isolados para ER/ES/TT; 1 isolado para ER/NI/TT; 4 isolados para CL/ER/TT; 1 isolado para ER/IM/TT; 2 isolados para ES/GE/TT; 1 isolado para ES/CL/TT e dois isolados para CI/NO/TT. A resistência simultânea a 4 antimicrobianos foi observada em 3 amostras, sendo 1 para ER/IM/PE/TT e 2 para ER/ES/CL/TT. Apenas 2 amostras apresentaram resistência simultânea a 5 antimicrobianos diferentes ER/ES/IM/PE/TT.

Os resultados dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos realizados com amostras de enterococos isoladas a partir de leite pasteurizado, podem ser observados na **Tabela 11**. Todos os isolados deste grupo apresentaram-se sensíveis aos seguintes antimicrobianos: AM, IM, PE, TE e VA. Entre os isolados procedentes desta matriz, os percentuais mais elevados de sensibilidade envolveram a gentamicina (99,2%) e linezolidina (99,2%), seguidos por norfloxacina (96,8%), cloranfenicol (96%) e estreptomicina (94,4%).

Tabela 10: Perfis de resistência aos antimicrobianos entre as espécies de *Enterococcus* spp isoladas de carne de frango.

Agentes Antimicrobianos ^a	Espécies N° (%)									Total de Resistentes
	<i>E. faecalis</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. gilvus</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. sulfureus</i>		
ER	4	1	-	-	-	-	-	-	-	5
ES	1	-	-	-	-	1	-	-	-	2
NI	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
TT	12	11	1	1	1	1	-	1	-	28
ER/TT	17	3	-	1	-	-	1	-	-	22
GE/TT	-	4	-	-	1	-	-	-	-	5
NI/TT	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
ES/TT	2	-	-	-	-	-	-	-	-	2
ES/GE	-	-	3	-	-	-	-	-	-	3
ER/ES	2	-	-	-	-	-	-	-	-	2
ER/ES/TT	11	-	-	-	-	-	-	-	-	11
ER/NI/TT	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
CL/ER/TT	4	-	-	-	-	-	-	-	-	4
ER/GE/TT	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
ER/IM/TT	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
ES/GE/TT	-	1	1	-	-	-	-	-	-	2
ES/CL/TT	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
CI/NO/TT	-	2	-	-	-	-	-	-	-	2
ER/IM/PE/TT	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
ER/ES/CL/TT	2	-	-	-	-	-	-	-	-	2
ER/ES/IM/PE/TT	-	-	-	-	2	-	-	-	-	2
Total	58	22	5	2	7	2	2	1	1	99

^a Agentes antimicrobianos: CL, cloranfenicol; ER, eritromicina; ES, estreptomicina; GE, gentamicina; IM, imipenem; NI, nitrofurantoina; NO, norfloxacin; IM, imipenem; NO, norfloxacin; TT, tetraciclina e PE, penicilina

Tabela 11: Susceptibilidade aos antimicrobianos entre amostras de diferentes espécies de *Enterococcus* spp isoladas de leite pasteurizado

Espécies (No. de isolados)	Perfil de Resistência	Agentes Antimicrobianos ^a (%)													
		AM ^c	CI	CL	ER	GE	IM	LN	NI	NO	PE	ES	TE	TT	VA
<i>E. faecalis</i> (99)	S ^b	100(99)	89,9 (89)	95 (94)	3 (3)	100 (99)	100 (99)	84,9 (84)	100 (99)	99 (98)	100 (99)	93,9 (93)	100 (99)	81,8 (81)	100 (99)
	I	-	10,1 (10)	1 (1)	83,9 (83)	-	-	13,1 (13)	-	1 (1)	-	-	-	12,1 (12)	-
	R	-	-	4 (4)	13,1 (13)	-	-	2 (2)	-	-	-	6,1 (6)	-	6,1 (6)	-
<i>E. durans</i> (16)	S	100 (16)	62,5 (10)	100 (16)	12,5 (2)	97,3 (15)	100 (16)	62,5 (10)	87,5(14)	93,7(15)	100 (16)	93,7 (15)	100 (16)	100 (16)	100 (16)
	I	-	37,5 (6)	-	81,2 (13)	-	-	31,2(5)	6,2 (1)	6,3 (1)	-	-	-	-	-
	R	-	-	-	6,3 (1)	6,3 (1)	-	6,3 (1)	6,2(1)	-	-	6,3 (1)	-	-	-
<i>E. casseliflavus</i> (7)	S	100 (7)	85,7 (6)	100 (7)	14,3 (1)	100 (7)	100 (7)	100 (7)	100(7)	71,4(5)	100 (7)	100 (7)	100 (7)	100(7)	100 (7)
	I	-	14,3 (1)	-	71,4 (5)	-	-	-	-	14,3 (1)	-	-	-	-	-
	R	-	-	-	14,3 (1)	-	-	-	-	14,3 (1)	-	-	-	-	-
<i>E. gallinarum</i> (2)	S	100 (2)	100 (2)	100 (2)	100 (2)	100(2)	100(2)	100 (2)	100(2)	100 (2)	100(2)	100 (2)	100(2)	100(2)	100 (2)
	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecium</i> (1)	S	100 (1)	100 (1)	100 (1)	-	100 (1)	100 (1)	100 (1)	100 (1)	100 (1)	100 (1)	100 (1)	100 (1)	100 (1)	100 (1)
	I	-	-	-	100 (1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total: 125	S	100 (125)	108 (86,4)	120 (96)	6,4 (8)	99,2 (124)	100 (125)	83,2 (104)	18,4 (123)	96,8 (121)	100 (125)	94,4 (118)	100 (125)	85,6 (107)	100 (125)
	I	-	17 (13,6)	1 (0,8)	81 (102)	-	-	14,4 (18)	0,8 (1)	2,4 (3)	-	-	-	9,6 (12)	-
	R	0	-	4 (3,2)	12 (15)	0,6 (1)	-	2,4 (3)	0,8 (1)	0,8 (1)	-	5,6 (7)	-	4,8 (6)	-

^a Agentes antimicrobianos: AM, ampicilina; CI, ciprofloxacina; CL, cloranfenicol; ER, eritromicina; GE, gentamicina; IM, imipenem; LN, linezolida; NI, nitrofurantoína; NO, norfloxacina; PE, penicilina; ES, estreptomicina; TE, teicoplanina; TT, tetraciclina e VA, vancomicina.

^b Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos: S, sensível; I, intermediária e R, resistente.

Todas as amostras de *E. faecalis* isoladas de leite pasteurizado apresentaram-se sensíveis a AM, GE, IM, LN, NI, PE, TE e VA, enquanto que todas as amostras de *E. casseliflavus*, apresentaram sensibilidade frente à AM, CL, GE, IM, LN, NI, PE, ES, TE, TT e VA. Entre as amostras identificadas como *E. durans*, todas foram sensíveis a AM, CL, IM, PE, TE, TT e VA. Em relação as amostras de *E. faecium*, foram sensíveis a CL, GE, IM, LN, NI, NO, PE, ES, TE, TT e VA, enquanto todas amostras procedentes de leite caracterizados como *E. gallinarum*, apresentaram sensibilidade a todos os 14 antimicrobianos testados.

O fenótipo mais freqüente de resistência intermediária, foi observado em 102 (81%) amostras distribuídas entre *E. faecalis* (83,9%), *E. durans* (81,2%) e *E. casseliflavus* (71,4%). O segundo maior percentual de resistência intermediária envolveu a ciprofloxacina (13,6%) entre os *E. durans* (37,5%), *E. casseliflavus* (14,3%) e *E. faecalis* (10,1%).

Do total de 125 enterococos isolados de leite pasteurizado, 32% apresentaram resistência plena aos antimicrobianos testados, predominantemente à eritromicina (12%) e ao cloranfenicol (4%). Quando considerados os percentuais de resistência de acordo com as espécies, destacaram-se as amostras de *E. faecalis* com relação a resistência a eritromicina (13,1%) e as de *E. casseliflavus*, com relação a eritromicina e norfloxacina(14,3%). Por outro lado amostras de *E. durans*, a segunda espécie mais freqüente, apresentaram resistência plena a eritromicina, gentamicina, e a estreptomicina (uma amostra cada).

Na **Tabela 12** podem ser observados os perfis de resistência aos antimicrobianos das espécies de enterococos isolados a partir de leite pasteurizado.

Tabela 12: Perfil de resistência aos antimicrobianos entre as espécies de *Enterococcus* spp isoladas de leite pasteurizado

Antimicrobianos	Espécies Nº (%)			Total de amostras / Perfis de resistência
	<i>E. faecalis</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. casseliflavus</i>	
CL	2	-	-	2
ER	6	-	1	7
NI	-	1	-	1
NO	-	-	1	1
TT	4	-	-	4
CL/ER	1	-	-	1
ER/ES	3	-	-	3
CL/ER/ES	1	-	-	1
ER/ES/TT	1	-	-	1
ER/ES/GE	-	1	-	1
CL/ER/ES/TT	1	-	-	1
Total	19	2	2	23

Quinze isolados apresentaram o fenótipo de resistência a apenas um dos antimicrobianos testados, sendo 12 *E. faecalis* (6 / R a ER, 4 / R a TT e 2 / R a CL), *E. durans* (1 / R a NI) e *E. casseliflavus* (1 / R a ER e 1 / R a NO). Quatro isolados caracterizados como *E. faecalis* apresentaram o fenótipo de resistência a 2 antimicrobianos simultaneamente (CL / ER e 3 ER / ES). Foi possível observar ainda um grupo de isolados de *E. faecalis* e de *E. durans* que apresentaram o fenótipo de resistência a três ou mais antimicrobianos, [CL, ER, ES (1 *E. faecalis*) ER, ES, TT (1 *E. faecalis*) / ER, ES, GE (1 *E. durans*) e CL, ER, ES, TT (1 *E. faecalis*)].

A avaliação da resistência a níveis elevados de gentamicina (HLR-GE, High-level Resistance to Gentamycin) e estreptomicina (HLR-ST, High-level Resistance to Streptomycin) foi realizada pela técnica da disco-difusão, revelou a presença destes fenótipos entre os enterococos isolados neste estudo. Na **Tabela 13** pode ser observada a ocorrência de enterococos isolados apresentando HLR-GE e HLR-ST, tanto de carne de frango como de leite pasteurizado.

As amostras (total de 37, 13,1%) apresentando este perfil de resistência foram isoladas de carne crua de frango (30) e de leite pasteurizado (7). Foram detectadas diferenças, quando consideradas as espécies individualmente em ambas as matrizes analisadas. Assim, a ocorrência do fenótipo HLR-ES foi

mais freqüente nas amostras de *E. faecalis* procedentes de frango quando comparadas àquelas isoladas a partir de leite pasteurizado.

Entre os enterococos isolados apresentando o fenótipo HLR-GE procedentes de carne de frango, 4 pertenciam a espécie *E. casseliflavus*, enquanto 1 foi identificado como *E. faecalis*. Entre os isolados obtidos a partir de leite pasteurizado não foi observada a presença do fenótipo HLR-GE.

Dos 26 (9,2%) isolados exibindo HLR-ES isolados a partir de carne crua de frango, 19 deles pertenciam à espécie *E. faecalis* e apenas um à espécie *E. hirae*. Entre as amostras obtidas de leite pasteurizado, 6 foram identificadas como *E. faecalis*.

Entre as 6 amostras de enterococos que apresentaram resistência a níveis elevados de gentamicina e estreptomicina, simultaneamente, (HLR-GE e HLR-ST) foi possível observar que cinco foram procedentes de carne de frango (*E. casseliflavus* 1 amostra e *E. gallinarum* 4 amostras) e 1 foi isolado de leite pasteurizado e identificado como *E. durans*.

Tabela 13: Ocorrência de resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos entre *Enterococcus* spp isolados a partir de carne de frango e de leite pasteurizado.

Espécies (nº de isolados)	Fonte de isolamento	Número (%) de isolados apresentando HLR-A			
		HLR-GE ^a	HLR-ST ^b	HLR-GE/ST ^c	Total
<i>E. faecalis</i> (179)	Frango	1 (6)	19 (10.6)	-	20 (11.1)
	Leite	-	6 (3.4)	-	6 (3.4)
<i>E. casseliflavus</i> (51)	Frango	4 (7.8)	-	1 (2)	5 (9.8)
<i>E. gallinarum</i> (9)	Frango	-	-	4 (44.5)	4 (44.5)
<i>E. durans</i> (19)	Leite	-	-	1 (5.2)	1 (5.2)
<i>E. hirae</i> (4)	Frango	-	1 (25.0)	-	1 (25.0)
Outras espécies de <i>Enterococcus</i> (15)	Frango	-	-	-	-
	Leite	-	-	-	-
Total de isolados (282)		5 (1.8)	26 (9.2)	6 (2.1)	37 (13.1)

^a Isolados apresentando resistência a níveis elevados de gentamicina;

^b Isolados apresentando resistência a níveis elevados de estreptomicina;

^c Isolados apresentando resistência a níveis elevados de gentamicina e de estreptomicina simultaneamente.

A maioria dos isolados portadores de resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos foi classificada como multirresistente apresentando resistência concomitante a pelo menos dois dos seguintes antimicrobianos: eritromicina, tetraciclina, nitrofurantoína, cloranfenicol ou norfloxacina.

Enterococos apresentando características de multirresistência, isto é, exibindo simultaneamente fenótipo de resistência frente a dois ou mais antimicrobianos diferentes simultaneamente, foram recuperados neste estudo, tanto a partir de carne crua de frango (60 amostras, 89,6%) como de leite pasteurizado (7 amostras, 0,4%).

A **Tabela 14** apresenta a distribuição dos perfis de multirresistencia, entre as diferentes espécies de *Enterococcus* isoladas a partir das duas diferentes fontes de alimentos analisadas neste estudo.

Tabela 14: Distribuição dos perfis de multirresistência entre as diferentes espécies de *Enterococcus* spp isoladas de carne de frango e leite pasteurizado

Perfis de multirresistência ^a	Número (%) de amostras de acordo com as espécies e fontes de isolamento								
	<i>E. faecalis</i>		<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. durans</i>		<i>E. gilvus</i>	Total de multirresistentes
	Frango	Leite	Frango	Frango	Frango	Frango	Leite	Frango	
ES / ER	1 (2.4)	3 (50)	-	-	-	-	-	-	4 (6.0)
ES / GE	-	-	-	-	3 (75)	-	-	-	3 (4.5)
TT / ER	17 (41.5)	-	3 (30)	-	-	1 (50)	-	1 (100)	22 (33.0)
TT / GE	-	-	4 (40)	-	-	-	-	-	4 (6.0)
TT / NI	1 (2.4)	-	-	-	-	-	-	-	1 (1.5)
TT / NO	-	-	2 (20)	-	-	-	-	-	2 (3.0)
TT / ES	2 (4.9)	-	-	-	-	-	-	-	2 (3.0)
ES / ER / GE	-	-	-	-	-	-	1 (100)	-	1 (1.5)
ES / ER / CO	-	1 (16.7)	-	-	-	-	-	-	1 (1.5)
TT / ER / GE	1 (2.4)	-	-	-	-	-	-	-	1 (1.5)
TT / ER / CL	4 (9.8)	-	-	-	-	-	-	-	4 (6.0)
TT / ER / IM	-	-	-	-	-	1 (50)	-	-	1 (1.5)
TT / ER / NI	-	-	-	1 (50)	-	-	-	-	1 (1.5)
TT / ER / ES	11 (26.8)	1 (16.7)	-	-	-	-	-	-	12 (18)
TT / ES / GE	-	-	1 (10)	-	1 (25)	-	-	-	2 (3.0)
TT / ES / CL	1 (2.4)	-	-	-	-	-	-	-	1 (1.5)
TT / ER / PE / IM	-	-	-	1 (50)	-	-	-	-	1 (1.5)
TT / ER / ES / CL	3 (7.3)	1 (16.7)	-	-	-	-	-	-	4 (6.0)
TOTAL	41	6	10	2	4	2	1	1	67

^a Agentes antimicrobianos: CL, cloranfenicol; ER, eritromocina; ES, estreptomocina; GE, gentamicina; IM, imipenem; NI, nitrofurantoína; NO, norfloxacina; PE, penicilina; TT, tetraciclina.

Várias espécies de enterococos foram associadas com multirresistência, incluindo *E. faecalis*, *E. casseliflavus*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. durans* e *E. gilvus* obtidos de carne crua de frango, e apenas *E. faecalis* e *E. durans* entre aquelas obtidas de leite pasteurizado.

Entre as espécies isoladas de carne de frango mais frequentemente envolvidas com multirresistência *E. faecalis* representou 61,2%. Neste grupo, 17 (41,5%) isolados apresentaram resistência simultânea a eritromicina e tetraciclina, seguido pelo perfil de resistência envolvendo a eritromicina, estreptomicina e tetraciclina (11 – 26,8%). Outro perfil encontrado em 4 (9,8%) das amostras envolveu a eritromicina, o cloranfenicol e a tetraciclina.

Outra espécie freqüentemente associada com multirresistencia, entre os isolados de frango, foi *E. casseliflavus*, na qual observamos 15% com esta característica. Destes 4 (40%) amostras apresentaram resistência simultânea a gentamicina e tetraciclina, enquanto 3 (4,2%) a eritromicina e tetraciclina e uma (10%) revelou um perfil de resistência envolvendo a estreptomicina, gentamicina e tetraciclina.

Entre os *E. gallinarum*, 3 (75%), apresentaram características de resistência a ambos os aminoglicosídeos testados e uma amostra apresentou, resistência à estreptomicina, gentamicina e tetraciclina. Uma (50%) amostra de *E. faecium* revelou o perfil de resistência simultânea para eritromicina, imipenem, penicilina e tetraciclina, enquanto outra (50%) apresentou resistência simultânea a eritromicina, tetraciclina e nitrofurantoína.

Entre as espécies mais freqüentemente associadas à multirresistência, isoladas de leite pasteurizado, foi possível identificar *E. faecalis* (46 amostras, 79%) seguida por *E. durans* (1 amostra, 1,5%). Entre as amostras de *E. faecalis*, foram detectados 4 perfis diferentes de acordo com a resistência apresentada: 3 isolados (50%) resistência à eritromicina e à estreptomicina; 1 isolado (16,7%) resistência à eritromicina, estreptomicina e cloranfenicol; 1 (16,7%) isolado resistência à eritromicina, estreptomicina e tetraciclina e 1 (16,7%) resistência à eritromicina, estreptomicina, tetraciclina e ao cloranfenicol.

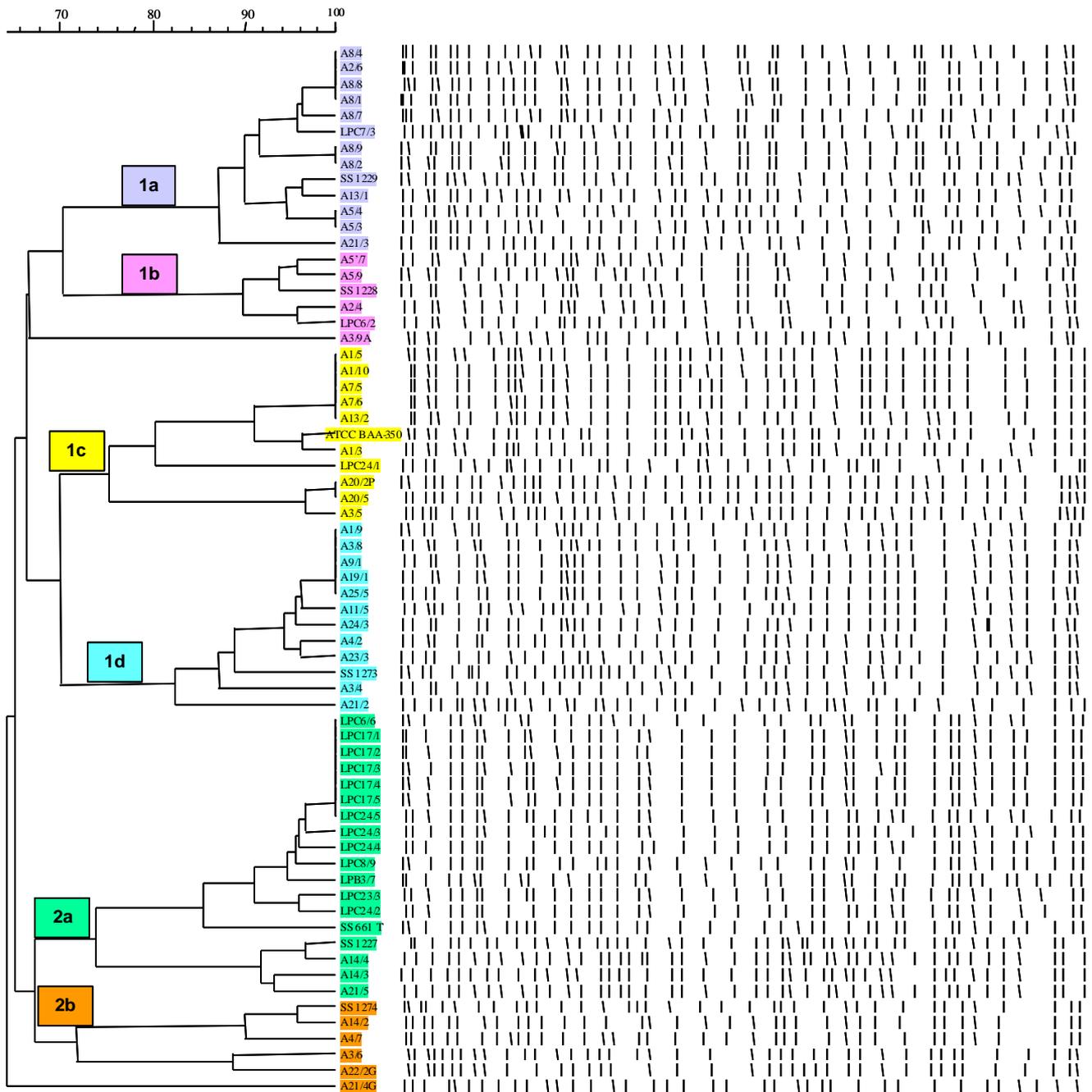
4.4 Análise dos perfis de proteínas totais (SDS-PAGE)

Com base nos resultados dos testes fisiológicos foram selecionadas 59 amostras bacterianas (43 procedentes de frango e 16 de leite pasteurizado), incluindo aquelas que apresentaram características bioquímicas atípicas ou que pertenciam ao grupo das espécies menos frequentes, para serem analisadas quanto aos perfis de proteínas totais através de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

Isolados de diferentes espécies identificadas foram submetidos à análise dos perfis proteicos. Foi obtida confirmação das seguintes espécies: *E. faecalis* (n = 15); *E. casseliflavus* (n = 22); *E. gilvus* (n = 2); *E. faecium* (n = 2); *E. durans* (n = 3) *E. hirae* (n = 4) e *E. sulfureus* (n = 3).

Os isolados caracterizados como pertencentes ao gênero *Enterococcus*, mas sem identificação das espécies (11 no total) também foram submetidos a análise dos perfis de proteínas totais, entretanto não foi possível a identificação das espécies.

Na **Figura 1** pode ser observado o dendrograma resultante da análise comparativa dos perfis proteicos de amostras pertencentes a diversas espécies de *Enterococcus* identificadas no presente estudo.



Padrões de referência: SS 1229, *E. casseliflavus*; SS 1228, *E. gallinarum*; ATCC BAA-350, *E. gilvus*; SS 1273, *E. faecalis*; SS 661, *E. durans*, SS 1227, *E. hirae* e SS 1274, *E. faecium*.

Figura 1: Dendrograma representando os índices de similaridade entre os perfis de proteínas de amostras de *Enterococcus* spp isoladas de carne de frango e de leite pasteurizado.

Os resultados obtidos através da análise dos perfis de proteínas revelaram percentuais de similaridade de, no mínimo, 64%, sendo distribuídos em dois grandes grupos: O primeiro grupo foi dividido em quatro sub-grupos 1a a 1d), enquanto que o segundo foi subdividido em em 2 sub-grupos 2a e 2b).

O sub-grupo **1a** englobou representantes da espécie *E. casseliflavus* isolados de carne de frango e leite pasteurizado e a cepa referência *E. casseliflavus* SS 1229.

As amostras bacterianas A8/4, A2/6, A8/8 e A8/1 apresentaram 100% de homologia entre si e 96% de similaridade com a cepa padrão. Da mesma maneira os isolados A8/9 e A8/2 apresentaram 100% de homologia entre si e 94% de similaridade com a cepa padrão. O isolado LPC7/3 procedente de leite pasteurizado agrupado neste perfil apresentou 90% de homologia com a cepa padrão e 86% com os demais representantes procedentes de carne de frango. Os isolados A5/3 e A5/4 apresentaram 100% de homologia entre eles e 96% de similaridade com a cepa padrão. As amostras de *E. casseliflavus*, que compuseram este sub-grupo apresentaram de 86 a 96% de homologia com a cepa de referência. Os perfis eletroforéticos representativos de amostras deste sub-grupo estão apresentados na **Figura 2**.

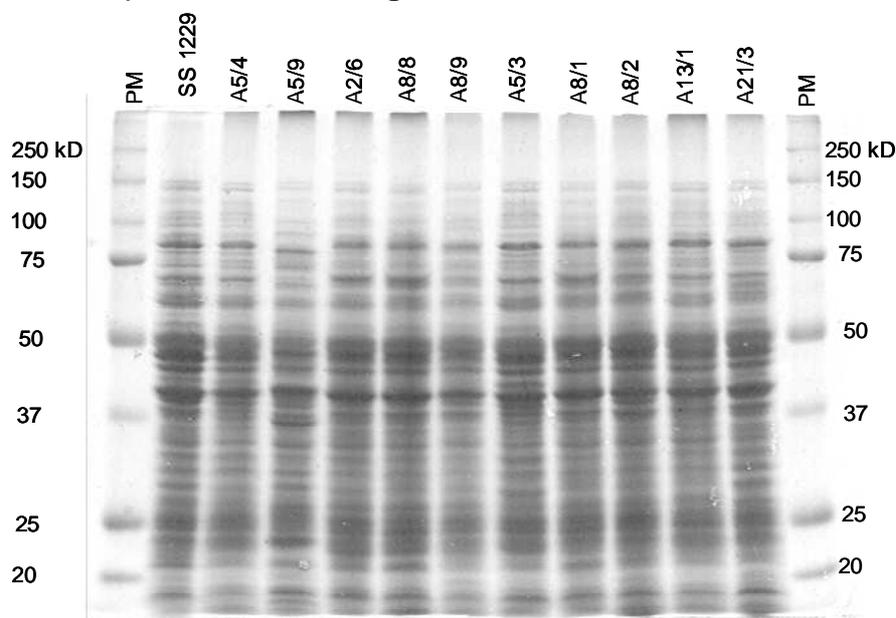


Figura 2: Gel ilustrativo dos perfis de proteínas totais de amostras caracterizadas como *E. casseliflavus*, que apresentaram atipias fisiológicas. Cepa padrão de referência: SS1229, *E. casseliflavus*. PM, padrão molecular 20 – 250 kD.

O sub-grupo **1b** foi composto por representantes da espécie *E. gallinarum*: A5'/7 A5/9, A2/4 e LPC6/2 procedentes de carne de frango e leite pasteurizado bem como a cepa padrão de *E. gallinarum* SS 1228.

Os perfis eletroforéticos representativos de amostras deste sub-grupo estão representados na **Figura 3**.

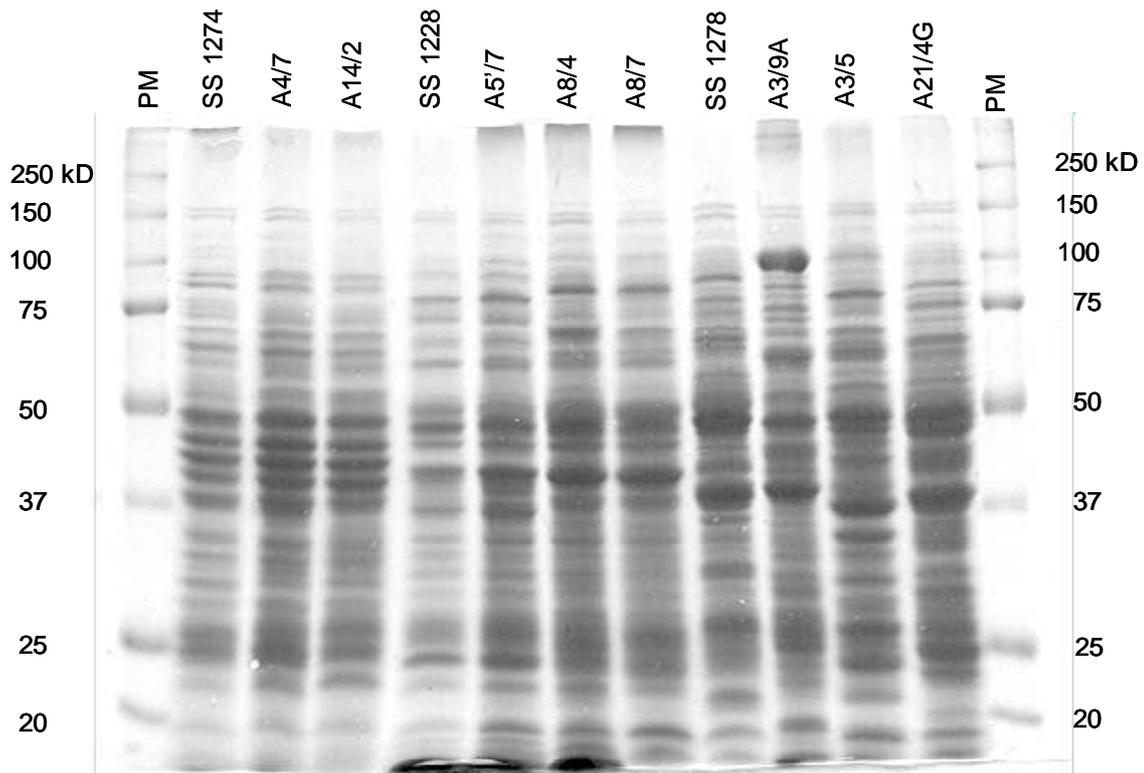


Figura 3: Gel ilustrativo dos perfis de proteínas totais de amostras caracterizadas como *E. gallinarum* e *E. faecium*. Cepas padrão de referência: SS 1228, *E. gallinarum* e SS 1274 *E. faecium*. PM, padrão molecular 20 – 250 kD.

O sub-grupo **1c** foi composto por representantes da espécie *E. gilvus* (A1/5, A1/10, A7/5, A7/6 e A13/2, A1/3 e LPC24/1, procedentes de carne de frango e leite pasteurizado bem) como a cepa padrão de *E. gilvus* ATCC BAA-350. Os isolados A1/5, A1/10, A7/5, A7/6 e A13/2 apresentaram 100% de homologia entre si e 92% de similaridade com a cepa de referência. O isolado A3/1 apresentou 96% de homologia com os demais representantes de *E.*

gilvus, bem como com a cepa de referência. O isolado LPC24/1 apresentou 80% de homologia com a cepa padrão e 76% com demais representantes deste sub-grupo.

Perfis eletroforéticos de amostras do sub-grupo 1c estão representados na **Figura 4**.

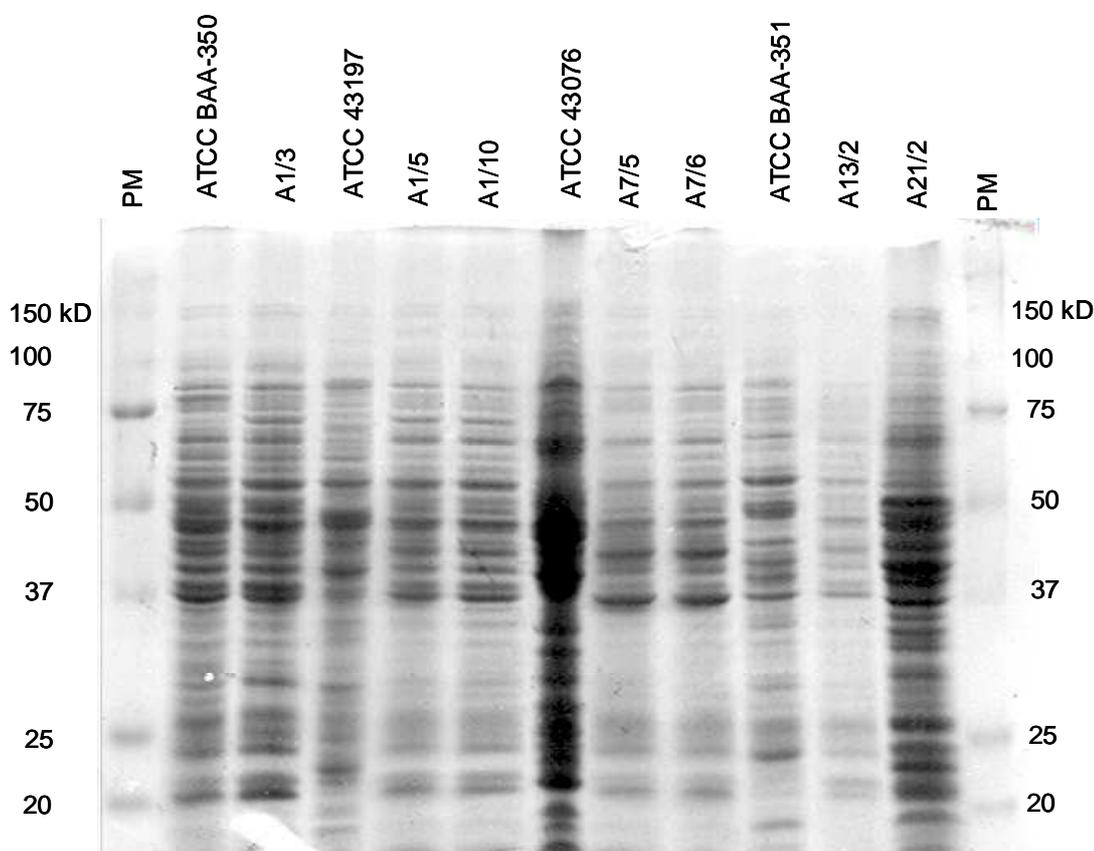


Figura 4: Gel ilustrativo dos perfis de proteínas totais de amostras caracterizadas como *E. gilvus*. Cepas padrão de referência: *E. gilvus* ATCC BAA-350; *E. malodoratus* ATCC 43197 e *E. saccharolyticus* ATCC 43076. PM, padrão molecular 20 – 150 kD.

O sub-grupo **1d** foi composto por representantes da espécie *E. faecalis* dos diferentes biotipos, procedentes de carne de frango e também a cepa padrão de *E. faecalis* SS 1273.

Neste sub-grupo os isolados A1/9, A3/8, A9/1, A19/1 e A25/5 apresentaram 100% de homologia entre si e 90% de similaridade com a cepa de referência. Os isolados A11/5, A24/3, A4/2 e A23/3 apresentaram 88% de

homologia com a cepa de referência e 84% com os demais representantes do sub-grupo, enquanto o isolado A21/2 apresentou 82% de homologia com o padrão e com os demais representantes.

Perfis eletroforéticos de amostras sub-grupo 1d estão representados na **Figura 5**.

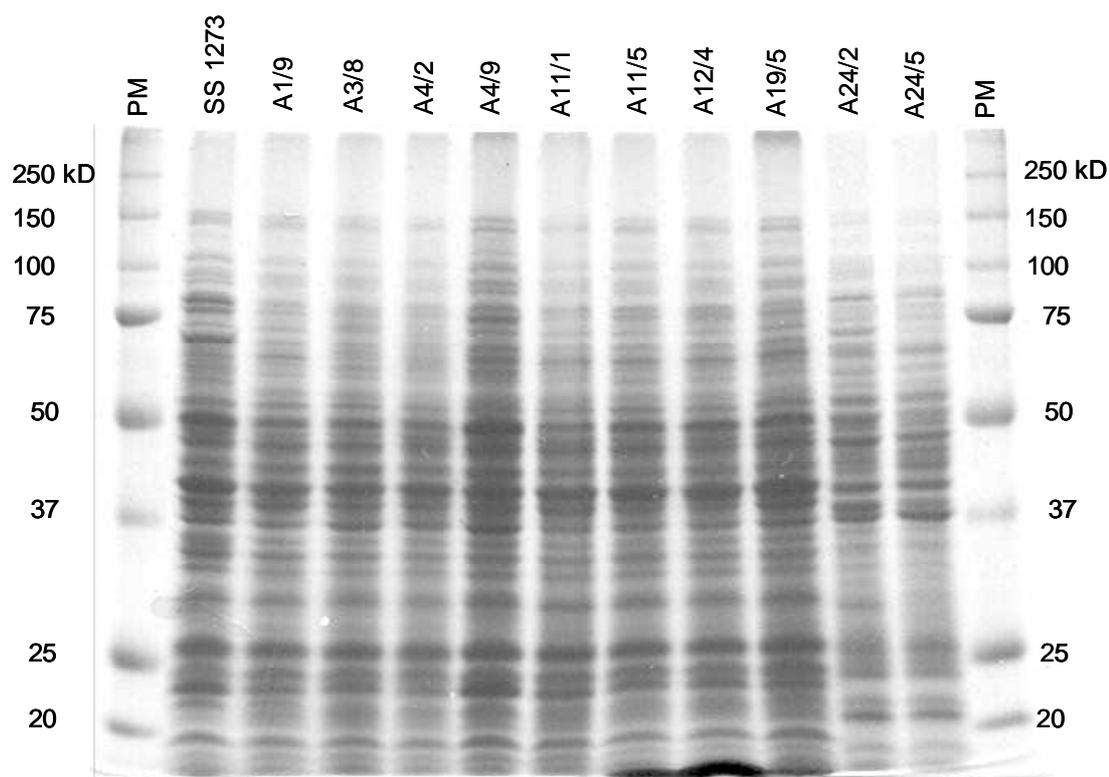


Figura 5: Gel ilustrativo dos perfis de proteínas totais de amostras caracterizadas como *E. faecalis*, que apresentaram atipias fisiológicas. Cepa padrão de referência: SS 1273, *E. faecalis*. PM, padrão molecular 20 – 250 kD.

O segundo grande grupo foi dividido em dois sub-grupos: um denominado de **2a** que apresentou 2 ramos representados por amostras de *E. durans*, *E. hirae* e outro denominado de **2b** composto por *E. faecium*.

O sub-grupo **2a**, em um de seus ramos, foi composto por perfis protéicos de amostras caracterizadas como *E. durans*, procedentes de leite pasteurizado, acompanhados da cepa padrão de *E. durans* SS 661. Os isolados LPC6/6, LPC17/1, LPC17/2, LPC17/3, LPC17/4, LPC17/5 e LPC24/5 apresentaram 100% de homologia entre si e 86% de similaridade com a cepa padrão. Os isolados LPC24/3, LPC24/4, LPC8/9, e LPB3/7 apresentaram neste grupo 86% de homologia com a cepa padrão e 94% de similaridade entre si.

Os perfis eletroforéticos de amostras de *E. durans* estão representados na **Figura 6**.

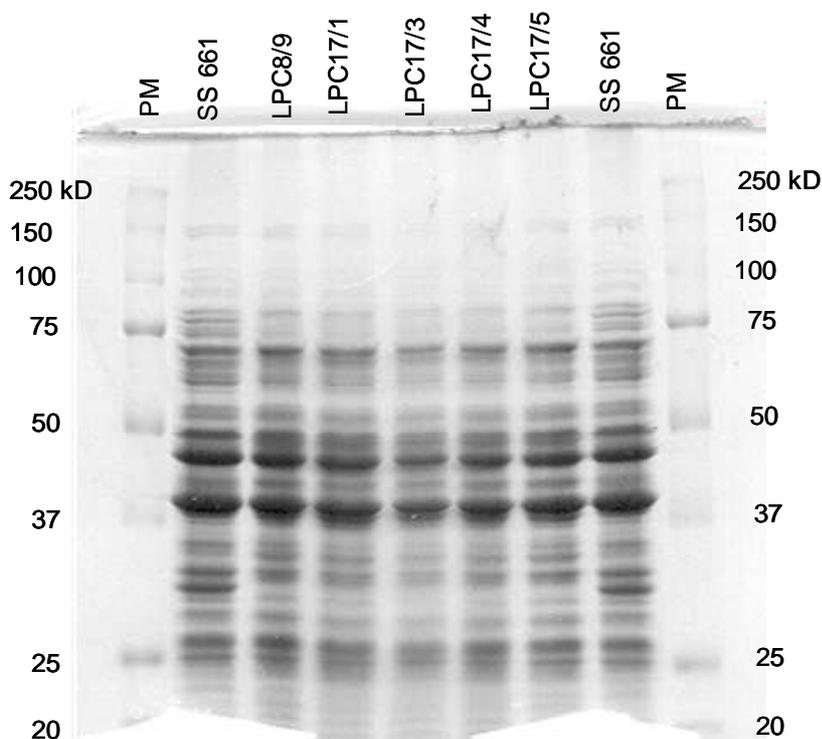


Figura 6: Gel ilustrativo dos perfis de proteínas totais de amostras caracterizadas como *E. durans*. Cepas padrão de referência: SS 661, *E. durans* PM, padrão molecular 20 – 250 kD.

O segundo ramo do sub-grupo **2a** foi constituído por representantes da espécie *E. hirae*: A14/4, A14/3, A21/5 e a cepa padrão de referência *E. hirae* SS1227. Os isolados A14/3 e A21/5 apresentaram 92% de similaridade entre si e 90% de homologia com o padrão de referência e com os demais representantes da espécie *E. hirae*.

Os perfis eletroforéticos de amostras de *E. hirae* estão representados na **Figura 7**.

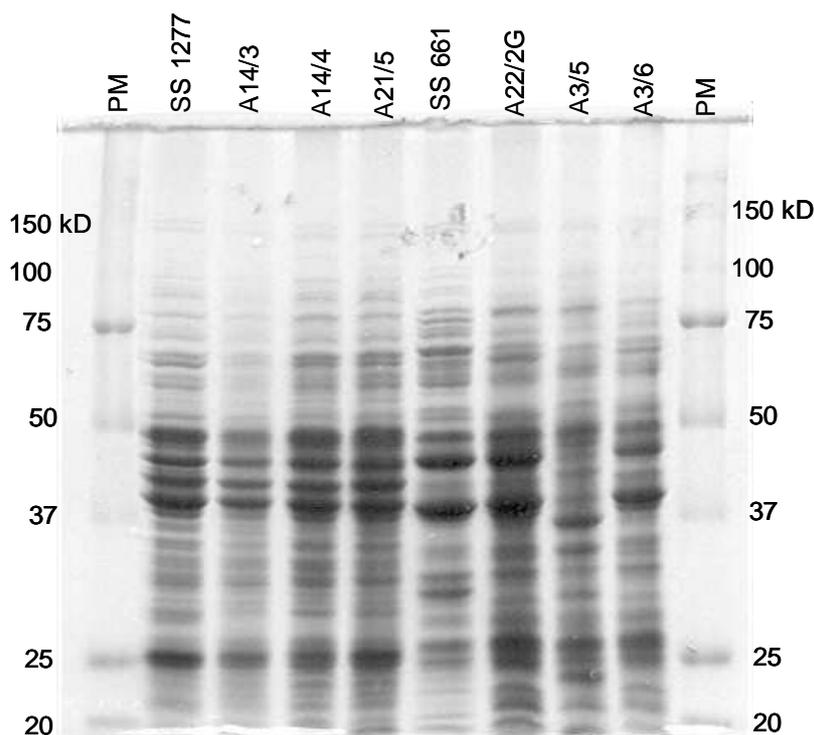


Figura 7: Gel ilustrativo dos perfis de proteínas totais de amostras caracterizadas como *E. hirae*. Cepas padrão de referência: SS1227, *E. hirae* PM, padrão molecular 20 – 250 kD.

O sub-grupo **2b** foi constituído por amostras de *E. faecium* (A14/2, A4/7, A3/6, A22/2G) e a cepa padrão *E. faecium* SS 1274. Os perfis eletroforéticos deste sub-grupo estão representados na **Figura 3**.

A utilização da técnica da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) como ferramenta auxiliar para a identificação mais precisa das amostras bacterianas que apresentaram atípicas nos perfis fenotípicos neste estudo, foi bastante eficiente. Permitiu a confirmação das espécies com perfis atípicos dos enterococos isolados dos dois tipos de alimentos analisados.

4.5 Caracterização Molecular

4.5.1 Caracterização de gênero e espécie através de Técnicas de PCR

Com a finalidade de auxiliar na identificação de amostras atípicas, foram implementados testes baseados na PCR e foram testadas amostras das espécies *E. faecalis*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* e *E. faecium* procedentes de carne de frango e de leite pasteurizado foram testados entre aquelas com atipias fisiológicas e as não edentificadas.

Todas as amostras testadas apresentaram resultados positivos quando submetidas a técnica da PCR direcionado para a região conservada do gene 16S rRNA do gênero *Enterococcus* gerando um amplicon de 733 pb, conforme ilustrado na **Figura 8**.

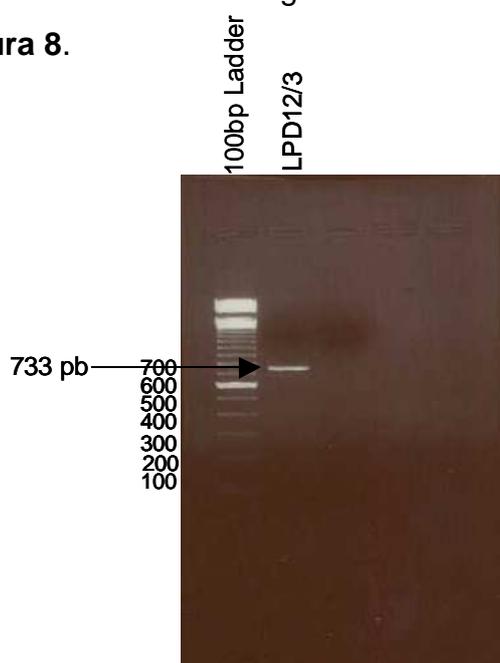


Figura 8: Gel ilustrativo da amplificação por PCR de regiões conservadas do 16S rRNA, específicas para o gênero *Enterococcus* spp (733 pb). 1: PM, padrão de peso molecular 100 pb. 2: Amostra LPD12/3 isolada de leite.

Para a identificação de amostras os *E. faecalis* e *E. faecium* foram pesquisados os genes codificadores *ddl_{E. faecalis}* e *ddl_{E. faecium}* respectivamente. Nestes casos os resultados foram considerados positivos, quando confirmada a amplificação das bandas com fragmentos de DNA dos tamanhos esperados 941 pb e 550 pb respectivamente.

O gene *ddl_{E. faecalis}* foi detectado em 32 amostras de *E. faecalis* testadas (**Figura 9**), da mesma forma o gene *ddl_{E. faecium}* foi detectado nas 6 as amostras de *E. faecium* testadas (**Figura 10**).

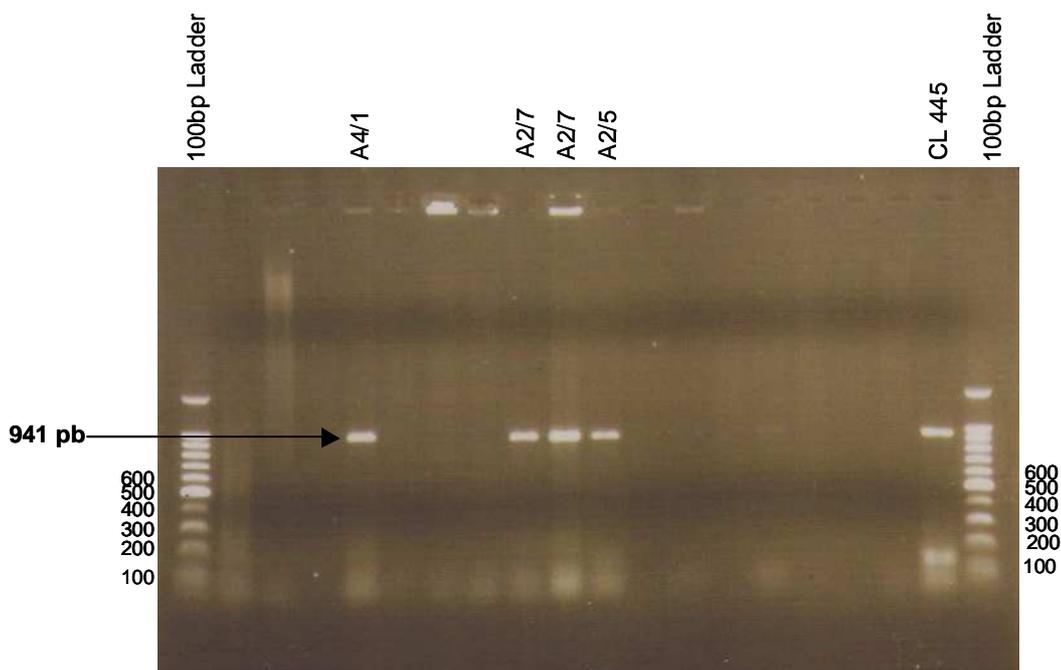


Figura 9: Gel ilustrativo da amplificação pela PCR do gene *ddlE. faecalis* específico para a identificação de *E. faecalis*. PM, padrão de peso molecular 100 pb. Amostras de carne de frango. Cepa padrão de referência CL 445.

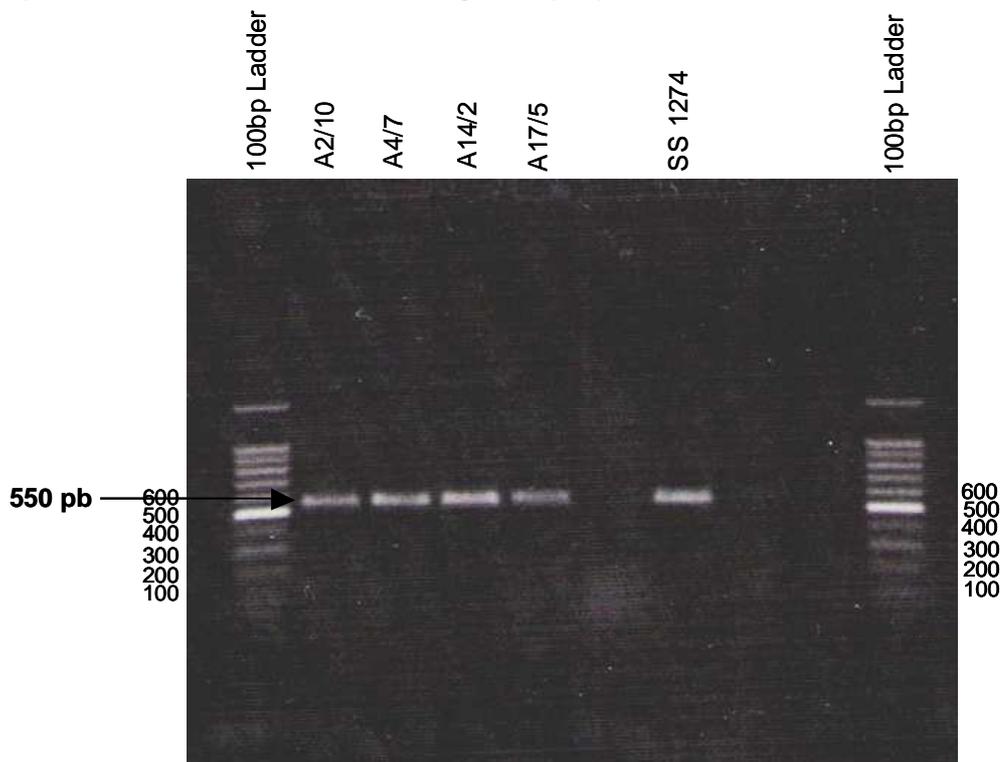


Figura 10: Gel ilustrativo da amplificação pela PCR do gene *ddlE. faecium* específico para a identificação de *E. faecium*. PM, padrão de peso molecular 100 pb. Amostras isoladas de carne de frango. Cepa padrão SS 1274, *E. faecium*.

Foi também realizada a pesquisa dos genes *vanC1*, *vanC2* e *vanC3*, com a finalidade de utilização como instrumento adicional para a identificação das espécies *E. casseliflavus* e *E. gallinarum*. Os resultados foram considerados positivos pela confirmação da amplificação das bandas com fragmentos de DNA do tamanho esperado de 439 pb para *E. casseliflavus* e de 822 pb para *E. gallinarum*. Os genes *vanC2/vanC3* foram detectados em todas as amostras de *E. casseliflavus* testadas, enquanto o gene *vanC1* foi detectado em 6 amostras de *E. gallinarum* testadas (**Figura 11**).

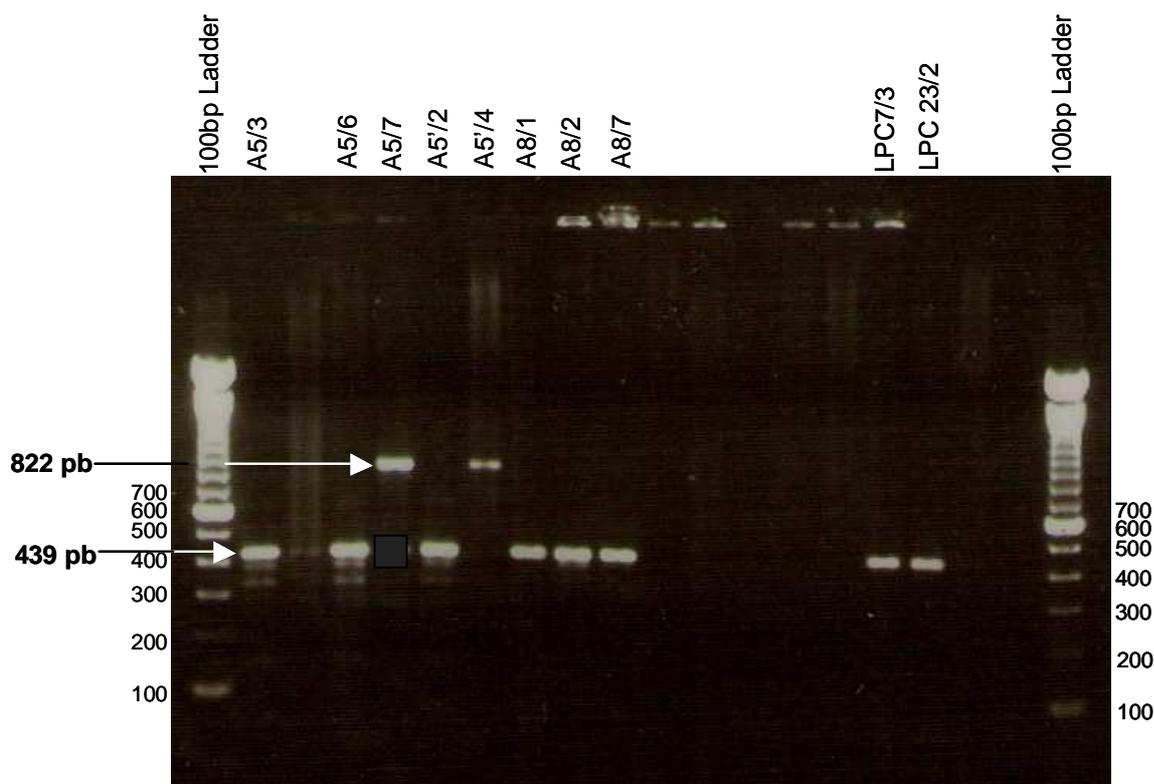


Figura 11: Gel ilustrativo da amplificação pela PCR espécie-específico dos genes de *E. gallinarum* (*vanC1*), 822 pb e *E. casseliflavus* (*vanC2* – *vanC3*), 439 pb. PM, padrão de peso molecular 100 pb. Amostras isoladas de carne de frango e de leite.

4.5.2 Detecção dos genes que codificam a resistência à vancomicina

Todos os isolados caracterizados como *Enterococcus* apresentaram-se como sensíveis à vancomicina, através dos testes da disco-difusão. Alguns destes isolados incluindo representantes obtidos de frango e de leite pasteurizado e especialmente aqueles que apresentaram marcadores de resistência a outros antimicrobianos foram submetidos a análise através da PCR, para detecção dos genes responsáveis pela expressão de resistência à vancomicina.

Nenhum dos isolados testados apresentou-se como portador dos genes *vanA* ou *vanB* em concordância com os resultados obtidos nos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos.

4.5.3 Detecção dos genes codificadores de resistência aos aminoglicosídeos

Os resultados foram considerados positivos pela detecção do produto de amplificação de 348 pb para o gene *aa(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, e a detecção de produto de amplificação de 523 pb para o gene *aph(3'')-IIIa* associados a resistência a aminoglicosídeos (**Figura 12**).

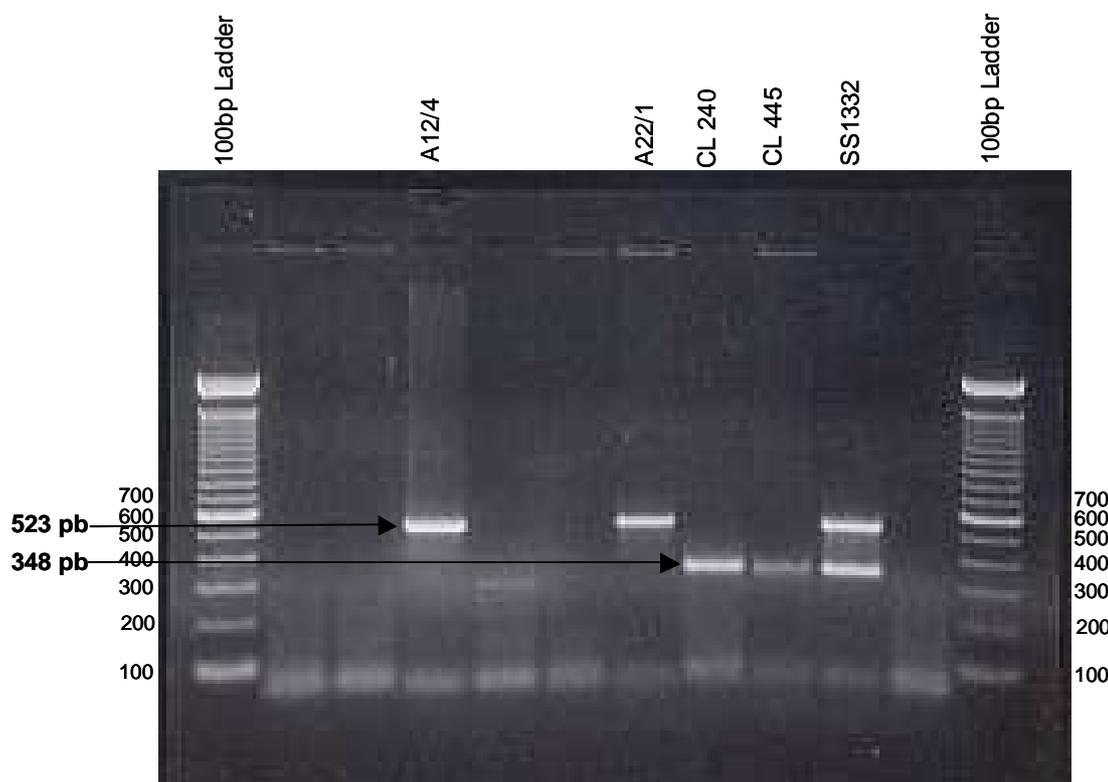


Figura 12: Gel ilustrativo da amplificação pela PCR dos genes que codificam para a resistência a aminoglicosídeos *aac(6')-Ie-aph(2'')*-Ia (348 pb) e outros aminoglicosídeos *aph(3'')*-IIIa (523 pb) em amostras de *Enterococcus*. PM, padrão de peso molecular de 100 pb. Amostras isoladas de carne de frango. Cepas padrão de referência *E. faecium* CL 240, *E. faecalis* CL 445 e *E. faecalis* SS 1332

O gene *aac(6')-Ie-aph(2'')*-Ia foi detectado em 10 das amostras testadas, A5/5, A5/7, A5/9, A5'1, A5'3, A5'6, A5'7, A5'8, A5'9 e A19/2P envolvendo as espécies *E. faecalis* e *E. gallinarum*. Os isolados analisados neste grupo, quando da avaliação quanto à susceptibilidade aos antimicrobianos pelo teste da disco-difusão, expressaram resistência à gentamicina e a e pela PCR expressaram o fenótipo de resistência à gentamicina e estreptomicina.

O gene *aph(3'')*-IIIa foi detectado em 6 amostras *E. faecalis* e 1 amostra de *E. casseliflavus* A3/4, A3/8, A8/2, A11/5, A11/6, A12/1 e A12/4, que apresentaram resultado positivo para a pesquisa da resistência a níveis elevados de estreptomicina pelo teste da disco-difusão e pela PCR o fenótipo correspondente.

4.5.4 Detecção dos genes responsáveis pelos diferentes fenótipos de resistência a eritromicina

No grupo dos isolados caracterizados como multirresistentes quando submetidos aos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos foram realizados testes através da PCR para a detecção dos genes *erm(A)*, *erm(B)* e *erm(C)* e *ermfA/E* responsáveis pela expressão de resistência a eritromicina. Apenas o gene *ermB* foi detectado entre amostras incluídas neste estudo, envolvendo as espécies *E. faecalis*, *E. casseliflavus* e *E. durans*, representado por um produto do tamanho esperado de 639 pb (**Figura13**).

A **Tabela 15** apresenta os resultados obtidos na pesquisa dos genes de resistência à eritromicina entre amostras de *Enterococcus* isoladas de carne de frango e leite pasteurizado utilizando a PCR.

Tabela 15. Distribuição dos genes de resistência à eritromicina detectado pela PCR em amostras de *Enterococcus* spp isolados de carne de frango e de leite pasteurizado

Espécies Identificadas	Identificação dos isolados ^b	Perfil de resistência aos antimicrobianos ^a	Genes detectados ^d		
			<i>ermA</i>	<i>ermB</i>	<i>mefA/B</i>
<i>E. faecalis</i>	A2/1	R/ ES/TT I/ ER	-	+	-
<i>E. faecalis</i>	A2/7	R/ ER/TT	-	+	-
<i>E. faecalis</i>	A3/4	R/ ER/TT/ES	-	+	-
<i>E. faecalis</i>	A3/8	R/ ER/TT/ES	-	+	-
<i>E. faecalis</i>	A4/3	R/ ER/TT/ES	-	+	-
<i>E. faecalis</i>	A4/4	R/ ER/TT	-	+	-
<i>E.casseliflavus</i>	A4/6	R/ ER/ES/TT	-	+	-
<i>E. faecalis</i>	A4/8	R/ ER/ES/TT	-	+	-
<i>E. faecalis</i>	A4/10	R/ ER/ES/TT	-	+	-
<i>E. faecalis</i>	A11/3	R/ CL/ER/ES/TT	-	+	-
<i>E. faecalis</i>	A11/4	R/ CL/ER/ES/TT	-	+	-
<i>E. faecalis</i>	A11/6	R/ER/ES/TT	-	+	-
<i>E. faecalis</i>	A11/7	R/ CL/ER/ES/TT	-	+	-
<i>E. faecalis</i>	A11/10	R/CL/ER/ES/TT	-	+	-
<i>E. faecalis</i>	A15/1	R/ ER/TT	-	+	-
<i>E. faecalis</i>	A15/5	R/ CL/ER/TT	-	+	-
<i>E. faecalis</i>	A19/2P	R/GE/ER/TT	-	+	-
<i>E. faecalis</i>	A19/4	R/ ER/TT	-	+	-
<i>E. faecalis</i>	A19/5	R/ ER/TT	-	+	-
<i>E. faecalis</i>	A21/2	R/ ER/TT	-	+	-
<i>E. faecalis</i>	A22/1	R/ ER/ES/TT	-	+	-
<i>E. faecalis</i>	A22/5	R/ ER/TT	-	+	-
<i>E. faecalis</i>	A24/3	R/ER/TT	-	+	-
<i>E. faecalis</i>	A24/5	R/ ER/TT	-	+	-
<i>E. faecalis</i>	LPB2/8	R/ CL/ER/ES	-	+	-
<i>E. faecalis</i>	LPB3/10	R/ ER/ES	-	+	-
<i>E. faecalis</i>	LPC7/6	R/CL/ER/ES/TT	-	+	-
<i>E. durans</i>	LPC8/6	R/ GE/ER/ES	-	+	-

^a Perfil de resistência a antimicrobianos, de acordo com o teste da disco-difusão: CL, cloranfenicol; ER, eritromicina; ES, estreptomicina; GE, gentamicina; TT, tetraciclina.

^b Isolados procedentes de carne crua de frango (A).

^c isolados procedentes de leite pasteurizado (LP).

^d genes detectados: *ermB*: gene responsável pela expressão de resistência à eritromicina entre os enterococos;

^e (+) resultados positivos para a presença do gene de resistência à eritromicina.

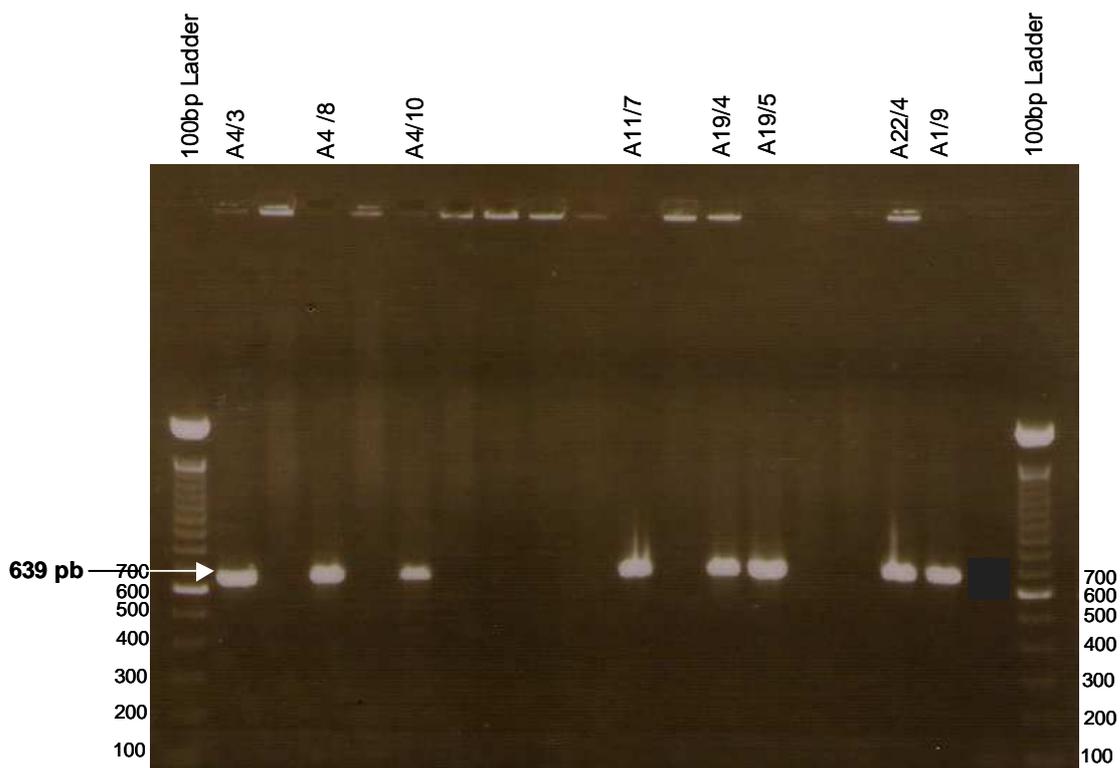


Figura 13: Gel ilustrativo da amplificação pela PCR do gene *ermB* (639 pb), que codifica para a expressão da resistência à eritromicina entre *Enterococcus* spp. PM, padrão de peso molecular de 100 pb. Amostras isoladas de carne de frango.

Todos os isolados citados apresentaram o fenótipo de resistência a eritromicina, quando da avaliação da susceptibilidade pela disco-difusão cuja presença foi confirmada pela PCR.

4.5.5 Detecção dos genes codificadores de resistência à tetraciclina

Todos os isolados caracterizados como multirresistentes foram submetidos aos ensaios pela PCR para a detecção dos genes responsáveis pela resistência dos enterococos à tetraciclina – *tetK*, *tetL*, *tetM* e *tetO*. A **Tabela 16** apresenta os resultados obtidos para a pesquisa dos genes de resistência à tetraciclina nas diferentes espécies de enterococos encontrados em carne de frango. Entre os isolados deste estudo foram detectados portadores dos genes *tetL*, *tetM* e *tetO* e nenhum portador do gene *tetK*. As

Figuras 14 e 15 ilustram os amplicons detectados entre amostras testadas no presente estudo.

A presença do gene *tetL*, um dos responsáveis pela expressão de resistência à tetraciclina entre os enterococos, confirmada pela amplificação das bandas com fragmentos de DNA do tamanho esperado (267 pb) (**Figura 14**).

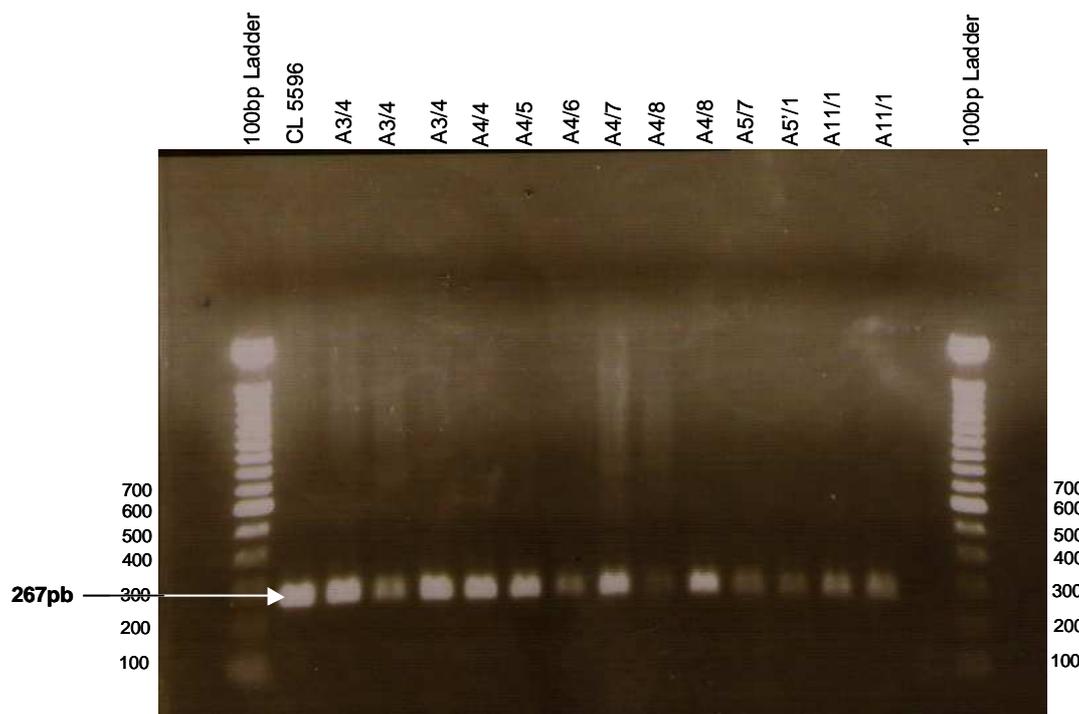


Figura 14: Gel ilustrativo da amplificação pela PCR do gene *tetL* (267 pb), que codifica para a expressão da resistência à tetraciclina entre *Enterococcus* spp. PM, padrão de peso molecular de 100 pb. Amostras isoladas de carne de frango. Cepa padrão de referência CL 5596, *S. agalactiae*.

Tabela 16: Distribuição dos genes de resistência à tetraciclina detectados por PCR entre amostras de *Enterococcus* spp. isoladas de carne de frango.

Espécie	Identificação Isolados	Perfil de Resistência ^a	Genes detectados ^b			
			<i>tetK</i>	<i>tetL</i>	<i>tetM</i>	<i>tetO</i>
<i>E. faecalis</i>	A1/9	R/ ER/TT	-	+	+	-
<i>E. faecalis</i>	A2/1	R/ ES/TT	-	+	+	-
<i>E. faecalis</i>	A2/7	R/ ER/TT	-	+	+	+
<i>E. faecalis</i>	A3/4	R/ ER/ES/TT	-	+	-	-
<i>E. faecalis</i>	A3/8	R/ ER/ES/TT	-	+	+	-
<i>E. faecalis</i>	A4/3	R/ ER/ES/TT	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	A4/4	R/ER/TT	-	+	+	-
<i>E. faecalis</i>	A4/5	R/ ER/TT	-	+	+	-
<i>E. casseliflavus</i>	A4/6	R/ ER/TT	-	+	+	+
<i>E. faecium</i>	A4/7	R/ ER/IM/PE/TT	-	+	+	-
<i>E. faecalis</i>	A4/8	R/ ER/ES/TT	-	+	-	-
<i>E. faecalis</i>	A4/9	R/ ER/ES/TT	-	+	-	-
<i>E. faecalis</i>	A4/10	R/ ER, ES, TT	-	+	-	-
<i>E. casseliflavus</i>	A5/4	R/ ES/GE/TT	-	+	+	+
<i>E. gallinarum</i>	A5/7	R/ GE	-	-	+	+
<i>E. gallinarum</i>	A5/9	R/ GE ; I/ TT	-	-	-	-
<i>E. casseliflavus</i>	A5'1	R/ GE/TT	-	+	+	+
<i>E. casseliflavus</i>	A5'3	R/ GE, TT	-	+	+	+
<i>E. faecalis:</i>	A11/1	R/ ES/TT	-	+	+	-
<i>E. faecalis</i>	A11/3	R/CL, ER, ES, TT	-	+	+	+
<i>E. faecalis</i>	A11/4	R/CL,ER,ER,TT	-	+	+	+
<i>E. faecalis</i>	A11/5	R/ ER,ES,TT	-	+	+	+
<i>E. faecalis</i>	A11/6	R/ ER,ES,TT	-	+	+	-
<i>E. faecalis</i>	A11/7	R/CL,ER,ES,TT; I/CI	-	+	+	-
<i>E. faecalis</i>	A11/8	R/ CL,ER,ES,TT; I/CI	-	+	+	+
<i>E. faecalis</i>	A11/10	R/ ER/ES/CO/TT	-	+	+	+
<i>E. faecalis</i>	A12/4	R/ ER/ES I/ CI,TT	-	+	+	+
<i>E. casseliflavus</i>	A13/4	R/ CI,NO,TT	-	-	+	-
<i>E. faecalis</i>	A15/1	R/ ER/TT	-	+	+	+
<i>E. faecalis</i>	A15/2	R/ ER/CO/TT	-	+	+	-
<i>E. faecalis</i>	A15/3	R/ ER/CO/TT	-	+	+	-
<i>E. faecalis</i>	A15/4	R/ ER/CO/TT	-	+	+	-
<i>E. faecalis</i>	A15/5	R/ ER/CO/TT	-	+	+	-
<i>E. faecalis</i>	A18/1	R/ ER/TT	-	+	+	-
<i>E. faecalis</i>	A18/2	R/ ER/TT	-	+	+	-
<i>E. faecalis</i>	A18/3	R/ ER/ES/TT	-	+	+	+
<i>E. faecalis</i>	A18/4	R/ ER/TT	-	+	+	-
<i>E. faecalis</i>	A19/2P	R/ ER/GE/TT	-	+	+	-
<i>E. faecalils</i>	A19/4	R/ ER/TT	-	+	-	-
<i>E. faecalis</i>	A19/5	R/ ER/TT	-	+	+	-
<i>E. casseliflavus</i>	A20/2G	R/ ER,TT; I/ CI	-	+	+	-
<i>E. faecalis</i>	A21/2	R/ ER/TT	-	-	-	-
<i>E. casseliflavus</i>	A21/3	R/ ER,TT	-	-	+	-
<i>E. faecalis</i>	A22/1	R/ ER/ES/TT	-	+	+	-
	A23/1	R/ ER,NI,TT I/ CI	-	+	+	-
<i>E. faecalis</i>	A23/3	R/ TT	-	+	+	-
<i>E. faecalis</i>	A24/1	R/ ER/TT	-	+	+	-
<i>E. faecalis</i>	A24/3	R/ ER/TT	-	+	+	+
<i>E. faecalis</i>	A24/4	R/ ER/TT	-	+	+	+
<i>E. faecalis</i>	A24/5	R/ ER/TT	-	+	+	-

^aPerfil de resistência a antimicrobianos de acordo com o teste da disco-difusão: CI,ciprofloxacina; CL, cloranfenicol; ER, eritromicina; ES, estreptomina; GE, gentamicina e TT, tetraciclina.

^bgenes detectados: *tetL*, *tetM* e *tetO*

signal (+) representa o resultado positivo para a presença do gene responsável pela resistência dos enterococos à tetraciclina.

O gene *tetL* foi o mais freqüente, sendo encontrado em amostras de *E. faecalis*, *E. casseliflavus* e *E. gallinarum*.

Entre as amostras de *E. casseliflavus multirresistentes* os seguintes isolados foram portadores do gene *tetL*: A4/6, A5/4, A5/8, A5'/1, A5'/3, A5'/6, A5'/8, A13/4, A20/2G, A21/3, A22/3, enquanto na espécie *E. gallinarum* os isolados portadores do gene *tetL* foram: A5/7, A5/9, A5'/7, A5'/9, LPC8/7 e LPB14/4.

A presença do gene *tetM*, responsável pela forma mais comum de resistência à tetraciclina entre os enterococos, foi confirmada pela amplificação das bandas com fragmentos de DNA do tamanho esperado: 406 pb.

Os seguintes isolados foram identificados como portadores do gene *tetM*: A19/1, A2/4, A2/7, A3/8, A4/4, A4/5, A4/9, A5/4, A11/1, A11/3, A11/4, A11/5, A11/6, A11/7, A11/8, A11/10, A15/1, A15/2, A15/3, A15/4, A15/5, A18/1, A18/2, A18/3, A18/4, A19/2P, A19/5, A21/3, A22/1, A23/3, A24/1, A24/3, A24/4, A24/5, LPB2/1, LPB2/8, LPB2/4, LPB3/10 e LPC7/6 (*E. faecalis*) e A4/6, A5/4, A5/1, A5'/3, A5'/6, A5'/8, A13/1, A13/4, A20/2G e A21/3 (*E. casseliflavus*). Os isolados caracterizados como *E. gallinarum* apresentando multirresistencia aos antimicrobianos testados portadores de gene *tetM* estão: A5/7, A5'/7 e A5'/9.

O gene *tetO* foi detectado, quando sua presença foi confirmada pela amplificação do fragmento de DNA de 515 pb. Os seguintes isolados foram identificados como portadores do gene *tetO*: A2/7, A4/9, A11/3, A11/4, A11/5, A11/8, A11/10, A12/4, A15/1, A18/3, A24/3 e LPB2/4 (*E. faecalis*) e entre os *E. casseliflavus*: A4/6, A4/9, A5/4, A5/7, A5'/1, A5'/3, A5'/6, A11/3, A11/4, A11/5, A24/3 e A24/4.

Alguns isolados apresentaram mais de um marcador de resistência à tetraciclina simultaneamente: *tetL* e *tetM* – A1/9, A2/1, A4/4, A4/5, A4/7, A5'/9, A11/6, A11/7, A15/2, A15/3, A15/4, A15/5, A17/1, A18/1, A18/2, A18/4, A19/2P, A19/5, A20/2G, A22/1, A22/2, A22/3, A23/1, A23/3, A24/1, A24/5, LPC1/6, LPB2/1, LPB2/6, LPB3/10, LPC1/6, LPB2/1, LPB2/6, LPB3/10, LPC6/7 e LPC8/6, pertencentes às espécies *E. faecalis*, *E. durans*, *E. gallinarum* ou *E. casseliflavus*.

Foi detectado ainda um grupo de isolados portadores de três genes de resistência à tetraciclina *tetL*, *tetM* e *tetO* simultaneamente: A2/7, A4/6, A4/9, A5/4, A5/7, A11/5, A11/8, A11/10, A15/1, A18/3, A15/1, A24/3, A24/4, LPB2/4 pertencentes às espécies *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* e *E. faecalis*.

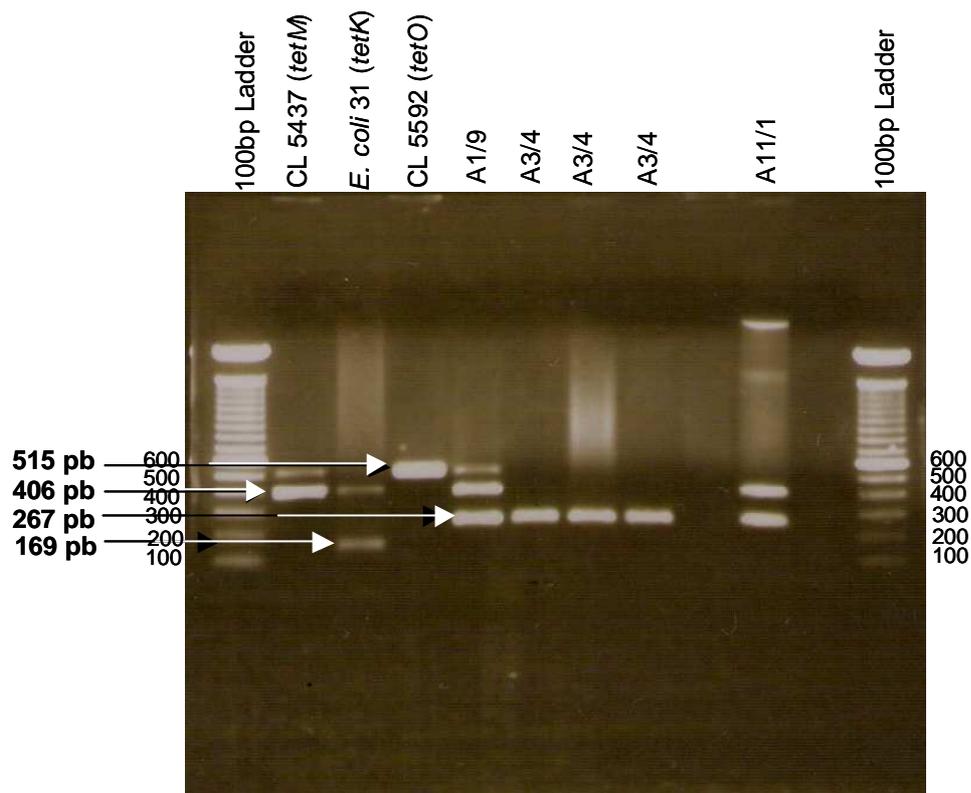


Figura 15: Gel ilustrativo da amplificação pela PCR dos genes *tetK* (169 pb), *tetL* (267 pb) e *tetM* (406 pb) e *tetO* (515 pb), que codificam para a expressão da resistência à tetraciclina entre *Enterococcus* spp. PM, padrão de peso molecular de 100 pb. Amostras isoladas de carne frango. Cepas padrão de referência CL 5437, *S. agalactiae*, *E. coli* 31 e CL 5592, *S. agalactiae*.

Na **Tabela 17** estão representados os resultados referentes a pesquisa dos marcadores de resistência à tetraciclina entre as espécies de *Enterococcus* isolados a partir de leite pasteurizado.

Tabela 17: Distribuição dos genes de resistência à tetraciclina detectados pela PCR entre os *E. faecalis* e *E. durans* procedentes de leite pasteurizado

Identificação dos isolados	Espécies identificadas	Perfil de resistência aos antimicrobianos ^a	Genes detectados ^b			
			<i>tetK</i>	<i>tetL</i>	<i>tetM</i>	<i>tetO</i>
LPC1/1	<i>E. faecalis</i>	-	-	-	+ ^c	-
LPC1/6	<i>E. faecalis</i>	-	-	+	+	-
LPC1/10	<i>E. faecalis</i>	-	-	+	+	-
LPB2/1	<i>E. faecalis</i>	R/ER,ES,TT	-	+	-	-
LPB2/2	<i>E. faecalis</i>	-	-	+	+	-
LPB4/2	<i>E. faecalis</i>	I/ ER,CI,TT	-	-	+	-
LPB4/3	<i>E. faecalis</i>	I/ ER, TT	-	+	+	-
LPB4/4	<i>E. faecalis</i>	I/ ER, TT	-	-	+	-
LPB4/5	<i>E. faecalis</i>	I/ ER, TT	-	-	+	-
LPB4/6	<i>E. faecalis</i>	I/ ER, TT	-	-	-	-
LPB4/7	<i>E. faecalis</i>	I/ ER, TT	-	+	+	-
LPC7/6	<i>E. faecalis</i>	R/ ER/ES/CL/TT	-	+	+	-
LPC8/6	<i>E. durans</i>	R/ ER/ES/GE/TT	-	-	+	-
LPB14/4	<i>E. faecalis</i>	R/ ER/CL I/ TT	-	+	+	-
LPC23/1	<i>E. faecalis</i>	R/ PE, AM, TT	-	-	+	-
LPC25/1	<i>E. faecalis</i>	I/ ER, LN, TT	-	-	-	-
LPC25/3	<i>E. faecalis</i>	R/ TT	-	-	+	-
LPC25/5		R/ TT	-	-	-	-

^a agentes antimicrobianos: CL-cloranfenicol, ER-eritromicina, ES-estreptomicina, GE-gentamicina e TT-tetraciclina.

^b genes detectados: *tetL*, *tetM* e *tetO* – responsáveis pela resistência à tetraciclina entre os enterococos;

^c sinal (+) representa resultado positivo para a presença do gene responsável pela resistência dos enterococos à tetraciclina.

4.5.6 Detecção dos genes de virulência

Um total de 67 enterococos isolados de carne de frango (60) e de leite pasteurizado (7) com características de multirresistência foram submetidos a análise através da PCR para pesquisa dos genes *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp* e *hyl* que codificam fatores de virulência.

Os resultados foram considerados positivos, quando a presença foi confirmada pela amplificação das bandas com fragmentos de DNA do tamanho esperado: *asa1* (375 pb), *gelE* (213 pb), *cylA* (688 pb), *esp* (510 pb) e *hyl* (276 pb). A presença do gene *asa1* um dos genes que codificam a substância de agregação foi detectada na espécie *E. faecalis* (47 amostras), e entre os isolados caracterizados como *E. casseliflavus* (LPC10/10) e *E. gallinarum* (A5/9) (**Figura 16**).

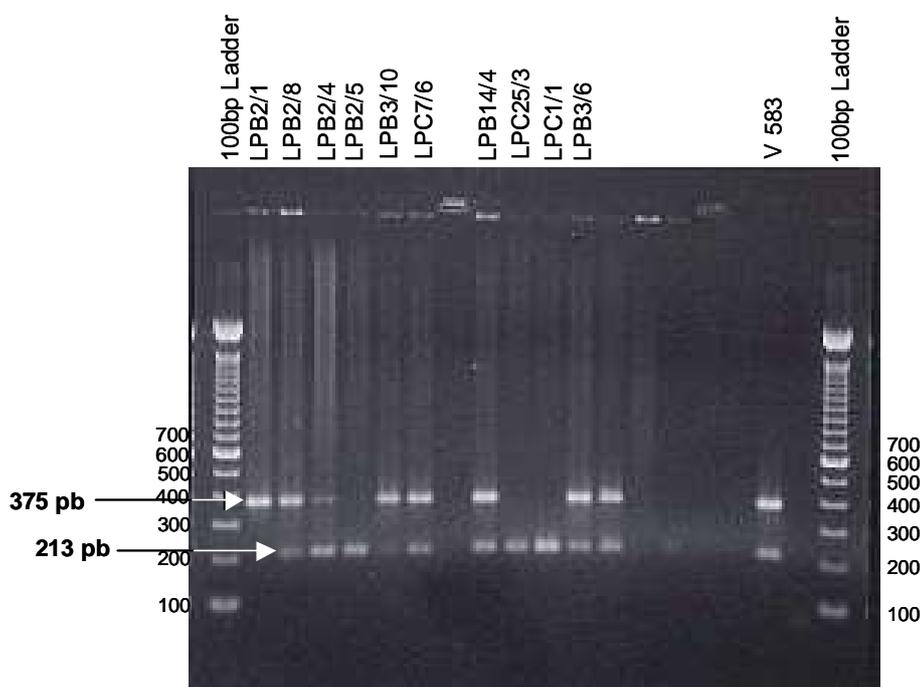


Figura 16: Gel ilustrativo da amplificação pela PCR dos genes *asa1* (213 pb) e *gelE* (375 pb) que codificam para a produção da substância de agregação e para a gelatinase, respectivamente. PM, padrão de peso molecular 100 pb. Amostras isoladas de leite. Cepa padrão de referência V 583.

A presença do gene *gelE* que codifica para a produção da gelatinase foi detectada em 64 isolados da espécie *E. faecalis* e em 3 isolados da espécie *E. casseliflavus* (A5'/3, A20/2G e A21/3).

A presença do gene *esp* foi detectada entre 6 isolados pertencentes às espécies *E. faecalis*, *E. durans* e *E. casseliflavus* obtidos de leite pasteurizado (**Figura 17**)

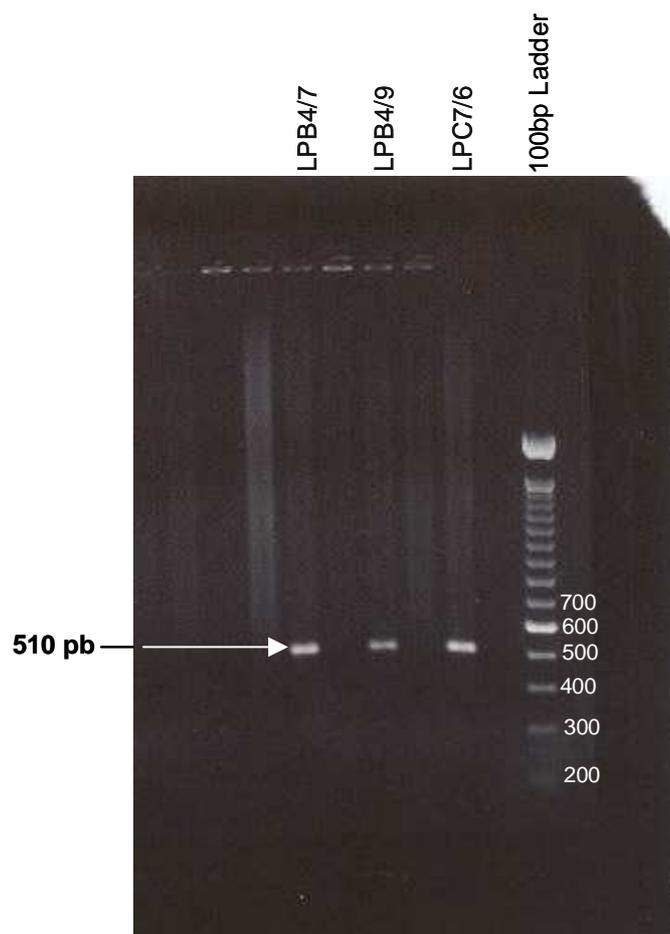


Figura 17: Gel ilustrativo da amplificação pela PCR do gene *esp* (510 pb), que codifica para a expressão das proteínas de superfície entre *Enterococcus* spp. PM, padrão de peso molecular de 100 pb. Amostras isoladas de leite.

A presença do gene *cy/A* (**Figura 18**) que codifica uma citolisina (relacionado a virulência dos enterococos) foi detectada em apenas um isolado procedente de leite pasteurizado (LPB2/1), enquanto que o gene *hyl* que codifica para a produção da hialuronidase não foi detectado entre os isolados deste estudo.



Figura 18: Gel ilustrativo da amplificação pela PCR do gene *cyI* (688 pb), que codifica para a produção de citolisina entre enterococos. PM, padrão de peso molecular de 100 pb. Amostra isolada de leite.

4.5.7 Análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico através da eletroforese em campo pulsado (PFGE)

A diversidade genética de 54 amostras de *E. faecalis* apresentando fenótipos de resistência a dois ou mais antimicrobianos isoladas de carne de frango (46 amostras) e de leite pasteurizado (8 amostras) foi avaliada através da análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico, utilizando-se a endonuclease de restrição *SmaI* e separação pela técnica da eletroforese em gel de agarose submetida a um campo pulsado (PFGE).

Foram detectados 39 complexos clonais ou perfis distintos, que foram aleatoriamente denominadas com letras do alfabeto, quando constituídos por mais de um isolado (total de 9 complexos clonais), enquanto 30 corresponderam a perfis isolados representados por apenas um isolado denominados com letras do alfabeto dobradas quando necessário. Estes resultados revelaram uma elevada diversidade genética entre as amostras de *E. faecalis* analisadas.

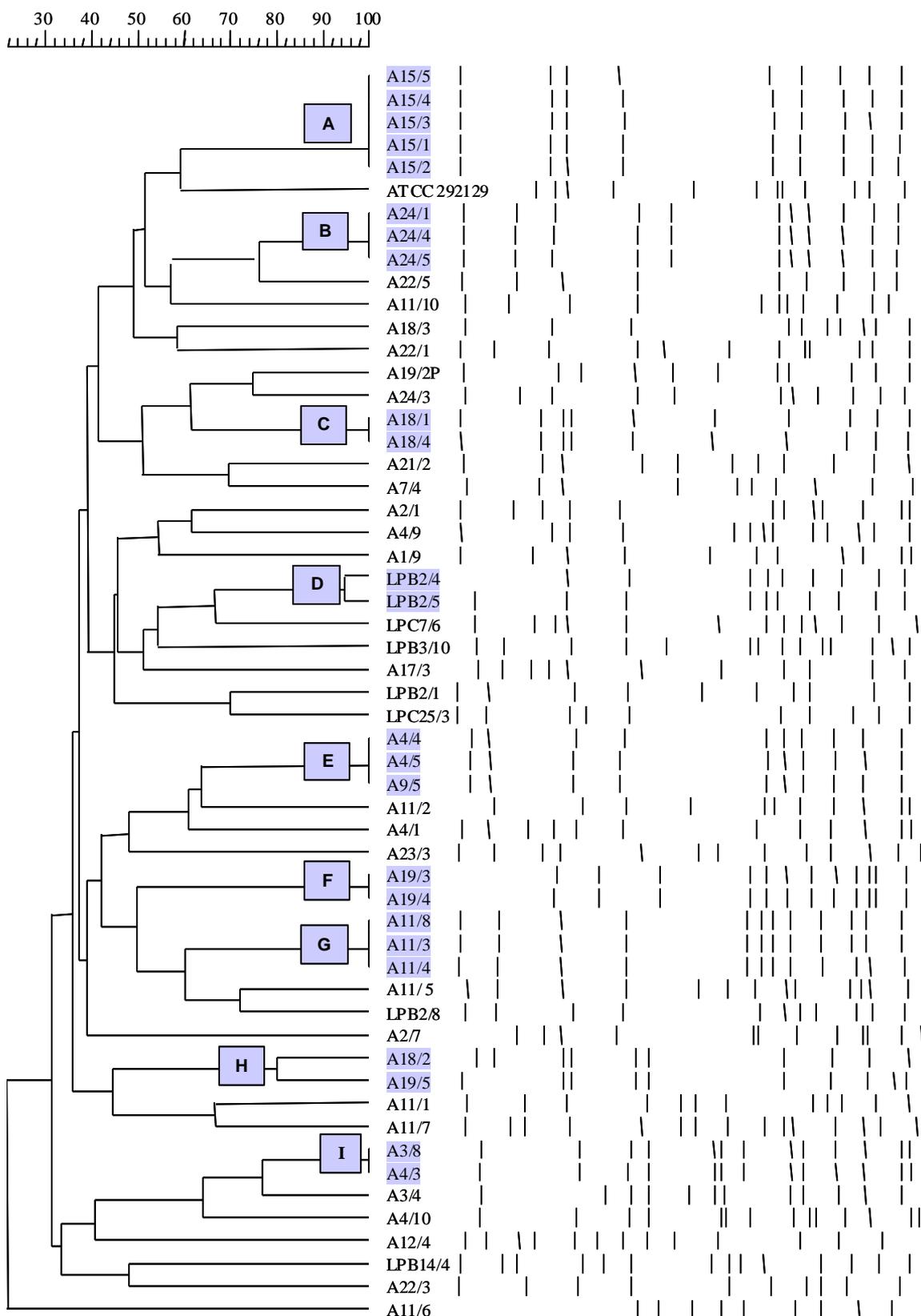


Figura 19: Dendrograma representativo dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico obtidos por eletroforese em campo pulsado, após digestão pela enzima *Sma*I de *E. faecalis* multirresistentes obtidos de carne de frango e de leite pasteurizado.

O **complexo clonal A** foi composto por cinco (A15/1, A15/2, A15/3, A15/4 e A15/5) amostras de *E. faecalis*. Os isolados apresentaram perfis eletroforéticos indistinguíveis entre si. Este grupo ou complexo clonal foi constituído por microrganismos procedentes da mesma amostra de alimento (A15 – cortes congelados de frango - coleta 2005), que apresentaram também perfis fenotípicos idênticos. Entretanto, apresentaram diferenças nos perfis de susceptibilidade frente aos antimicrobianos. Em todos os isolados deste complexo clonal foi detectada a presença dos genes de resistência *ermB*, *tetL*, *tetM* e *tetO* concomitantemente, bem como o gene *gelE*, que codifica para a produção da gelatinase. Nenhum dos isolados apresentou resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos, mas todos apresentaram resistência intermediária a ciprofloxacina . Os perfis de fragmentação obtidos estão demonstrados na **Figura 20**.

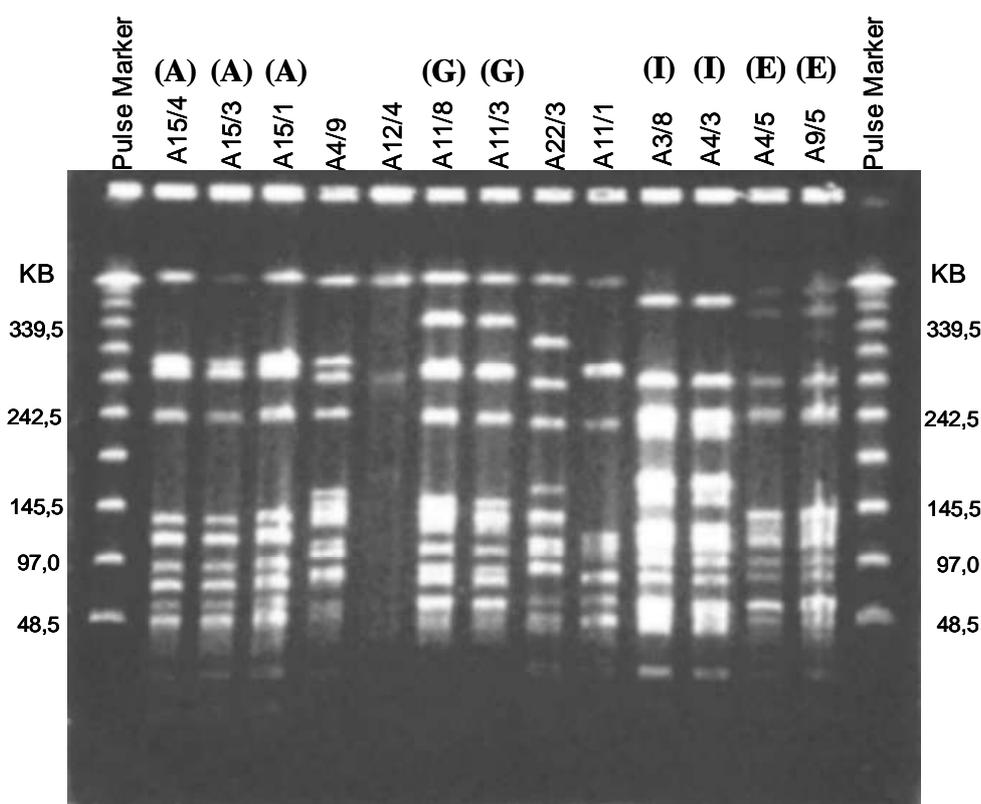


Figura 20: Gel ilustrativo dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico obtidos por eletroforese em campo pulsado (PFGE), após digestão com *SmaI* das amostras caracterizadas como *E. faecalis* multirresistentes. Estão indicadas as amostras dos complexos clonais **A**, **G**, **I** e **E**.

O **complexo clonal B** foi composto por 3 (A24/1, A24/4 e A24/5) isolados com perfis eletroforéticos idênticos entre si os quais estão representados na **Figura 21**. Este grupo foi composto por isolados procedentes da mesma amostra de alimento A24 – frango fresco; (coleta/2005), apresentando perfis fenotípicos idênticos, mas com atipia fisiológica relacionada à produção de ácido a partir da fermentação da rafinose. Os três isolados apresentaram perfis de resistência aos antimicrobianos semelhantes envolvendo a eritromicina e a tetraciclina, embora com relação a resistência intermediária apenas o A24/4 tenha apresentado o fenótipo de resistência ao cloranfenicol. O isolado A24/1 não portador de genes de virulência apresentou-se como portador de genes de resistência para a tetraciclina (*tetL*, *tetM* e *tetO*).

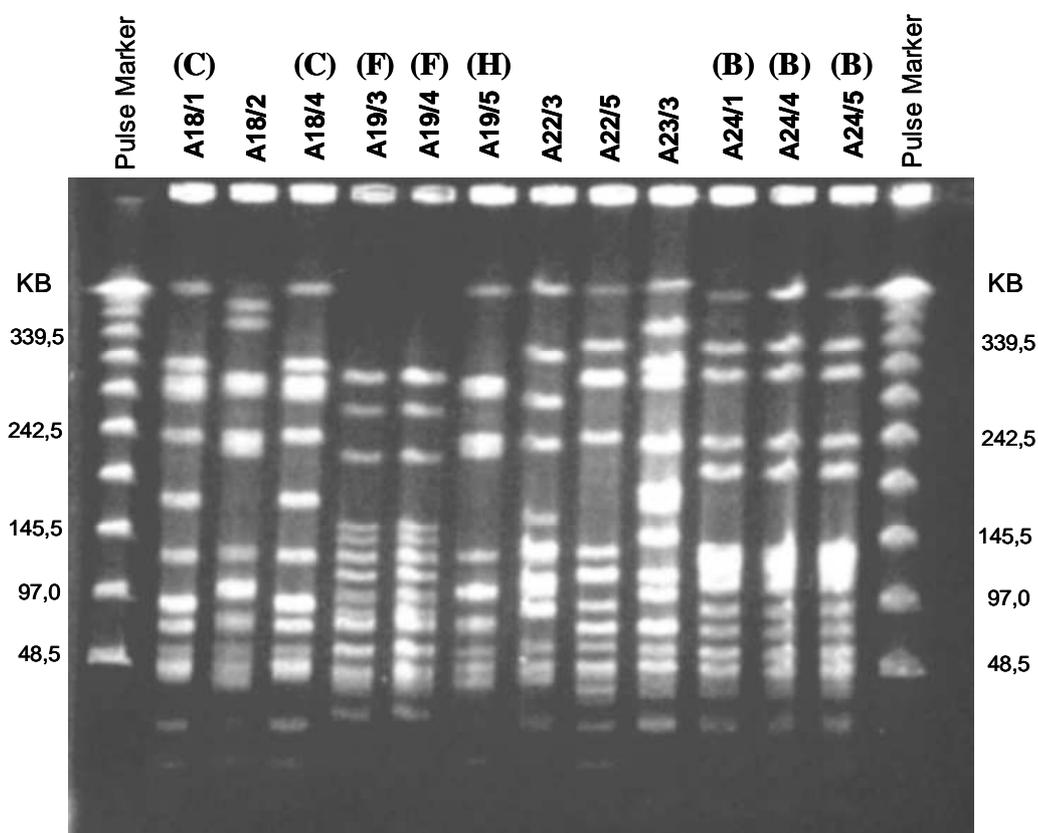


Figura 21: Gel ilustrativo dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico obtidos por eletroforese em campo pulsado (PFGE), após digestão com a enzima *SmaI* das amostras de *E. faecalis* multirresistentes, Estão indicadas as amostras dos complexos clonais **B**, **C**, **F** e **H**.

O **complexo clonal C** foi constituído por dois isolados (A18/1 e A18/4) procedentes da mesma amostra (A18 – sobrecoxas de frango / resfriada, coleta 2005) e que apresentaram perfis eletroforéticos idênticos entre si. Este grupo de microrganismos apresentou perfis fenotípicos semelhantes, bem como o comportamento frente aos antimicrobianos envolvendo resistência plena a eritromicina e à tetraciclina. Os dois isolados deste complexo clonal apresentaram-se como portadores dos genes *gelE* e *asa1*, que codificam para a produção de gelatinase e da substância de agregação, respectivamente. Apresentaram-se também como portadores do fenótipo de resistência para a tetraciclina (genes *tetL* e *tetM*).

No **complexo clonal D** foram incluídos dois isolados obtidos de leite pasteurizado (LPC2/4 e LPC2/5) procedentes da mesma matriz [LPC2 (coleta 2004), leite pasteurizado do tipo C]. Estes isolados apresentaram perfis eletroforéticos com 94% de identidade entre si e aproximadamente 50% de similaridade com o perfil da cepa de referência ATCC 29212. Estes dois isolados apresentaram perfis fenotípicos idênticos entre si. Em relação aos perfis de resistência aos antimicrobianos apresentaram as mesmas características, sendo resistentes a ER e ES. Entretanto com relação à resistência intermediária, enquanto o LPB2/4 exibiu resistência intermediária para a ciprofloxacina, o LPB2/5 apresentou fenótipos de resistência intermediária para a ciprofloxacina e linezolida. Em relação aos perfis moleculares de resistência, ambos apresentaram-se como portadores dos genes de resistência apenas para a tetraciclina (*tetL*, *tetM* e *tetO*). Quanto a resistência à eritromicina revelada pelo método da disco-difusão não foi detectado nenhum gene relacionado em nenhum dos dois isolados. Nestes dois isolados foram também detectados os genes de virulência *gelE* e *asa1*.

No **complexo clonal E** foram incluídos os isolados A4/4, A4/5 e A9/5 procedentes de duas amostras diferentes de frangos A4 e A9. Estes isolados apresentaram perfis eletroforético idênticos entre si. Os isolados A4/4 e A4/5 apresentaram características bioquímicas idênticas, bem como o comportamento frente aos antimicrobianos, quando apresentaram fenótipos de resistência para ER e TT. Entretanto, quando da análise molecular os genes que codificam para a resistência à eritromicina (*ermB*) foi detectado apenas no isolado A4/4, enquanto os genes *tetL* e *tetM*, que codificam para a resistência à tetraciclina foram detectados em A4/4 e A4/5. O isolado A9/5 apresentou as

mesmas características dos isolados anteriores, embora fosse procedente de amostra de alimento diferente, com coleta realizada em datas diferentes, e não tenha apresentado características de multirresistência aos antimicrobianos.

No **complexo clonal F** foram incluídos os isolados A19/3 e A19/4, procedentes da mesma amostra (A19 – Peito de frango / resfriada; coleta 2005) apresentando perfis eletroforéticos idênticos entre si. Estes dois isolados apresentaram perfis fenotípicos semelhantes com atipia fisiológica relacionada à produção de ácido a partir do MGP. Entretanto, com relação ao comportamento frente aos antimicrobianos apresentaram características diferentes, pois o isolado A19/3 mostrou resistência intermediária a eritromicina e ciprofloxacina e não apresentou nenhum gene de virulência, enquanto o A19/4 apresentou fenótipos de resistência para a eritromicina e tetraciclina, além da presença do gene *geIE* e dos marcadores genéticos de resistência aos antimicrobianos eritromicina (*ermB*) e a tetraciclina (*tetL*).

O **complexo clonal G** composto por três amostras (A11/3, A11/4 e A11/8) procedentes do mesmo alimento (A11; Cortes congelados de frango – asas; coleta 2004) apresentaram perfis de fragmentação do DNA cromossômico idênticos entre si. Enquanto as amostras A11/3 e A11/8 apresentaram perfis bioquímicos idênticos, a A11/4 apresentou atipia fisiológica relacionada a produção de ácido a partir de rafinose. Entretanto, com relação ao comportamento frente aos antimicrobianos as amostras apresentaram perfis diferentes: A11/3 apresentou o fenótipo de resistência para eritromicina, tetraciclina, cloranfenicol e para altos níveis de estreptomicina, além dos marcadores de virulência *geIE* e *asa1*. A amostra A11/4 apresentou o gene de virulência *asa1* e os marcadores de resistência para a tetraciclina (*tetL*, *tetM* e *tetO*), enquanto a A11/8 apresentou marcadores de resistência para o cloranfenicol e a níveis elevados de estreptomicina. São portadores de genes *asa1* e dos marcadores de resistência a eritromicina (*ermB*) e a tetraciclina (*tetL*, *tetM* e *tetO*). Os perfis de fragmentação destas amostras estão representados na **Figura 22**.

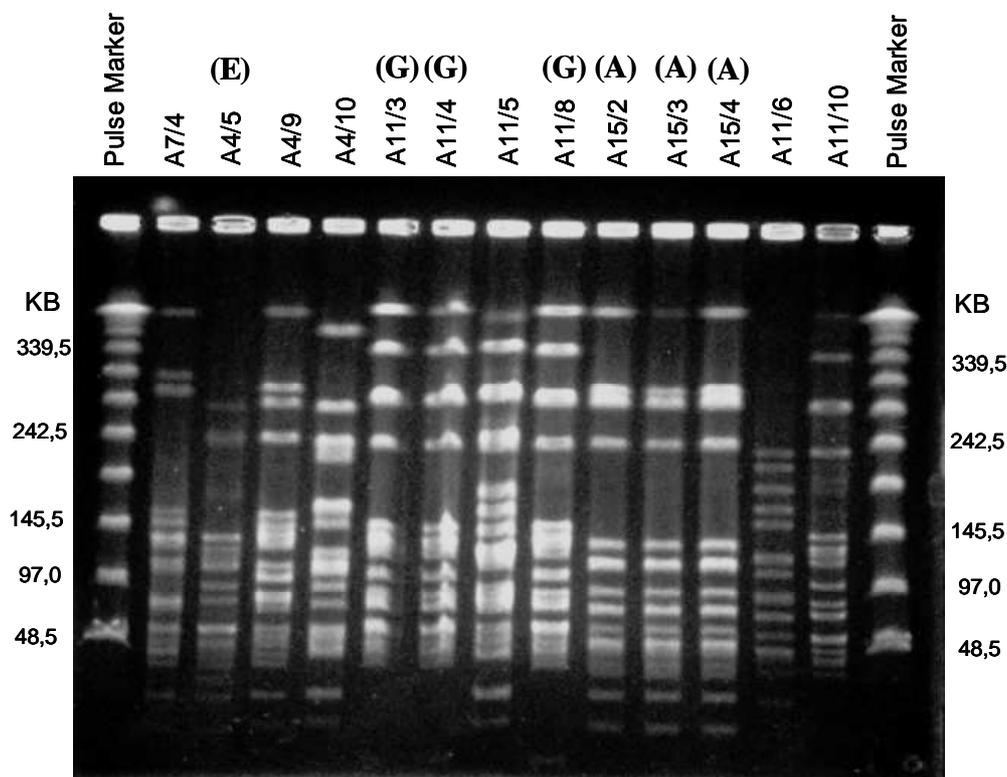


Figura 22: Gel ilustrativo dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico obtidos por eletroforese em campo pulsado (PFGE), após digestão com a enzima *Sma*I das amostras de *E. faecalis* multirresistentes. Estão indicadas as amostras dos complexos clonais pertencentes ao complexos clonais **A**, **E** e **G**.

Ao **complexo clonal H** pertenceram duas (A18/2 e A19/5) amostras procedentes de duas matrizes diferentes (A18 e A19): a matriz A18 correspondente a sobrecoxas – resfriada (coleta 2005) e A19 a peito / carcaça – resfriada (coleta 2005). Tais microrganismos apresentaram perfis eletroforéticos idênticos entre si. Estas amostras apresentaram perfis fenotípicos semelhantes ao perfil de identificação clássica, entretanto a amostra A19/5 apresentou atipia fisiológica relacionada à utilização do piruvato de sódio.

Em relação ao perfil de resistência aos antimicrobianos, o comportamento de ambos os isolados foi semelhante ou seja foram resistentes a ER e TT, mas o isolado A19/5 apresentou resistência intermediária à ciprofloxacina. O isolado A18/2 apresentou-se como portador dos genes de que codificam para a resistência à tetraciclina (*tetL* e *tetM*). Nesta amostra foi possível detectar também a presença do gene de virulência *gelE*, que codifica para a produção da gelatinase e do gene *asa1*, que codifica para a produção da substância de

agregação. Na amostra A19/5 foi detectados os genes que codificam para a resistência à eritromicina (*ermB*) e à tetraciclina (*tetL* e *tetM*).

O **complexo clonal I** foi representado por duas amostras (A3/8 e A4/3) procedentes de matrizes diferentes (A3 e A4). Estes isolados apresentaram perfis de fragmentação do DNA cromossômico idênticos entre si. Entretanto, diferem em relação à produção de ácido a partir da rafinose. Estas duas amostras apresentaram também características semelhantes, quando da pesquisa de marcadores de resistência aos antimicrobianos testados envolvendo a eritromicina, tetraciclina e altos níveis de estreptomicina. As duas amostras exibiram a presença dos genes de virulência *gelE* e *asa1*. Entretanto, quanto aos genes de resistência aos antimicrobianos detectados, a amostra A3/8 abrigou os genes de resistência *aph(3'')-IIIa*, *ermB*, *tetL*, *tetM*, *tetO* simultaneamente.

Oito isolados caracterizados com *E. faecalis* portadores dos fenótipos de multirresistência aos antimicrobianos, procedentes de leite pasteurizado foram detectados neste estudo. A diversidade genética detectada entre eles foi bastante elevada, sendo que cada um deles apresentou um perfil de PFGE diferente, representados no dendrograma na **Figura 19**.

A **Tabela 18** reúne as principais características observadas em *Enterococcus faecalis* procedentes das amostras de carne de frango e leite pasteurizado.

Tabela 18: Perfil de fragmentação do DNA cromossômico, genes detectados por PCR, perfil de resistência aos antimicrobianos e atipias fisiológicas de *E. faecalis* isolados de carne crua de frango (A) e leite pasteurizado (LP).

Caracterização dos isolados	Perfil de fragmentação do DNA (PFGE)	Perfil de Susceptibilidade aos antimicrobianos ^a			Genes de resistência ^b detectados (PCR)	Genes de virulência ^c detectados (PCR)	Atipias fisiológicas	Perfil de proteínas totais (SDS/PAGE)	Fonte de Isolamento (UFC/g ou mL) ^d
		HLR-A	Resistência plena	Resistência intermediária					
A1/9	T	-	ER/TT		<i>ermB, tetL, tetM</i>	<i>gel E</i>	clássico	1d	Frango (4,8x10 ²)
A2/1	R	ES	ES/TT	ER	<i>ermB, tetL, tetM</i>	<i>gelE</i>	clássico	NR	Frango
A2/7	EE	-	ER/TT	NO	<i>ermB, tetL, tetO</i>	<i>gelE</i>	clássico	NR	(4,5x10 ³)
A3/4	HH	ES	ER/ES/TT	-	<i>aph(3'')-IIIa, ermB, tetL</i>	<i>asa1, gelE,</i>	raf, MGP	1d	Frango (4,4x10 ²)
A3/8	I	ES	ER/ES/TT	-	<i>aph(3'')-IIIa, ermB, tetL, tetM</i>	<i>asa1, gelE</i>	raf	1d	
A4/1	AA	-	TT	ER	ND	ND	man, pir	NR	
A4/3	I	ES	ER/ES/TT	-	<i>ermB</i>	<i>asa1, gelE</i>	clássico	NR	
A4/4	E	-	ER/TT	-	<i>ermB, tetL, tetM</i>	<i>gelE</i>	clássico	NR	Frango
A4/5	E	-	ER/TT	-	<i>tetL, tetM</i>	<i>gelE</i>	clássico	NR	(7,3x10 ²)
A4/8		ES	ER/ES/TT	-	<i>ermB, tetL</i>	<i>gelE</i>	clássico	NR	
A4/9	S	ES	ER/ES/TT	NO	<i>tetM, tetO</i>	<i>asa1</i>	raf	NR	
A4/10	II	ES	ER/ES/TT	-	<i>ermB, tetL</i>	<i>gelE</i>	clássico	NR	
A7/4	Q	-	-	-	ND	<i>gelE</i>	clássico	NR	Frango (6,9x10 ³) _I
A9/5	E	-	-	ER	NR	ND	clássico	NR	Frango ()
A11/1	FF	ES	ES/TT	-	<i>ermB, tetL, tetM</i>	<i>asa1, gelE</i>	raf	NR	
A11/2	Z	-	TT	ER	NR	NR	clássico	NR	Frango
A11/3	G	ES	CL/ER/ES/TT	-	<i>tetL, tetM, tetO</i>	<i>asa1, gelE</i>	clássico	NR	(6,0x10 ³)
A11/4	G	ES	CL/ER/ES/TT	-	<i>tetL, tetM, tetO</i>	<i>asa1</i>	clássico	NR	
A11/5	CC	ES	ER/ES/TT	-	<i>ermB, tetL, tet M, tetO</i>	<i>asa1</i>	raf	1d	

^a agentes antimicrobianos: CI, ciprofloxacina; CL, cloranfenicol; ER, eritromicina; ES, estreptomicina; GE, gentamicina; NO, norfloxacina; PE, penicilina; TT, tetraciclina.

^b genes de resistência aos antimicrobianos: *ermB* (eritromicina); *tetL, tetM, tetO* (tetraciclina); *aph(3'')-IIIa* e *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* (gentamicina).

^c genes de virulência: *gelE* (gelatinase); *asa1* (substância de agregação).

ND: não detectado, NR: não realizado

^d Representação do número de enterococos encontrados nas amostras de carne de frango ou leite pasteurizado, em Unidades Formadoras de Colônias por grama ou mililitro; I: incontável.

Tabela 18 continuação: Perfil de fragmentação do DNA cromossômico, genes detectados por PCR, perfil de resistência aos antimicrobianos e atipias fisiológicas de *E. faecalis* isolados de carne crua de frango (A) e leite pasteurizado (LP).

Caracterização dos isolados	Perfil de fragmentação do DNA (PFGE)	Perfil de Susceptibilidade aos antimicrobianos ^a			Genes de resistência detectados (PCR)	Genes de virulência detectados (PCR)	Atipias fisiológicas	Perfil de proteínas totais (SDS/PAGE)	Fonte de Isolamento (UFC/g ou mL) ^d
		HLR-A	Resistência plena	Resistência intermediária					
A11/6	MM	ES	ER/ES/TT	-	<i>aph(3'')-IIIa, ermB, tetL, tetM</i>	<i>asa1, gelE</i>	clássico	NR	Frango (6,0x10 ³)
A11/7	GG	ES	CL/ER/ES/TT	CI	<i>ermB, tetL, tetM</i>	<i>asa1, gelE</i>	clássico	NR	
A11/8	G	ES	CL/ES/TT	CI/ER	<i>ermB, tetL, tetM, tetO</i>	<i>asa1, gelE</i>	clássico	NR	
A11/10	K	ES	CL/ER/ES/TT	CI	<i>ermB, tetL, tetM, tetO</i>	<i>asa1, gelE</i>	clássico	NR	Frango (8,6x10 ²)
A12/4	JJ	ES	ER/ES	TT/CI	<i>aph(3'')-IIIa, tetL, tetO</i>	<i>asa1, gelE</i>	raf	NR	
A15/1	A	-	ER/TT	CL	<i>ermB, tetL, tetM, tetO</i>	<i>gelE</i>	clássico	NR	Frango (6,7x10 ²)
A15/2	A	-	CL/ER/TT	-	<i>tetL, tetM</i>	<i>gelE</i>	clássico	NR	
A15/3	A	-	CL/ER/TT	-	<i>tetL, tetM</i>	<i>gelE</i>	clássico	NR	
A15/4	A	-	CL/ER/TT	CI	<i>tetL, tetM</i>	<i>gelE</i>	clássico	NR	
A15/5	A	-	CL/ER/TT	CI	<i>ermB, tetL, tetM</i>	<i>gelE</i>	clássico	NR	
A17/3	W	ES	ES	CI/ER	ND aminoglicosídeos	NR	clássico	NR	Frango (1,9x10 ³)
A18/1	C	-	ER/TT	-	<i>tetL, tetM</i>	<i>asa1, gelE</i>	clássico	NR	Frango (3,8x10 ²)
A18/2	H	ES	ES/ER/TT	-	<i>tetL, tetM</i>	<i>asa1, gelE</i>	clássico	NR	
A18/3	L	ES	ES/ER/TT	-	<i>tetL, tetM, tetO</i>	<i>gelE</i>	clássico	NR	
A18/4	C	-	ER/TT	-	<i>tetL, tetM</i>	<i>asa1, gelE</i>	clássico	NR	
A19/2P	M	GE	ER/GE/TT	-	<i>aac(6'')-Ie-aph(2'')-Ia, ermB, tetL, tetM</i>	<i>asa1, gelE</i>	clássico	NR	Frango (2,6x10 ³)

^a agentes antimicrobianos: CI, ciprofloxacina; CL, cloranfenicol; ER, eritromicina; ES, estreptomicina; GE, gentamicina; NO, norfloxacina; PE, penicilina; TT, tetraciclina.

^b genes de resistência aos antimicrobianos: *ermB* (eritromicina); *tetL, tetM, tetO* (tetraciclina); *aph(3'')-IIIa* e *aac(6'')-Ie-aph(2'')-Ia* (gentamicina).

^c genes de virulência: *gelE* (gelatinase); *asa1* (substância de agregação).

ND: não detectado, NR: não realizado

^d Representação do número de enterococos encontrados nas amostras de carne de frango ou leite pasteurizado, em Unidades Formadoras de Colônias por grama ou mililitro; I: incontável.

Tabela 18 continuação: Perfil de fragmentação do DNA cromossômico, genes detectados por PCR, perfil de resistência aos antimicrobianos e atipias fisiológicas de *E. faecalis* isolados de carne crua de frango (A) e leite pasteurizado (LP).

Caracterização dos isolados	Perfil de fragmentação do DNA (PFGE)	Perfil de Susceptibilidade aos antimicrobianos ^a			Genes de resistência ^b detectados (PCR)	Genes de virulência ^c detectados (PCR)	Atipias fisiológicas	Perfil de proteínas totais (SDS/PAGE)	Fonte de Isolamento (UFC/g ou mL) ^d
		HLR-A	Resistência plena	Resistência intermediária					
A19/3	F	-	-	CI/ER	ND	ND	clássico	NR	Frango
A19/4	F	-	ER/TT	-	<i>ermB, tetL</i>	<i>gelE</i>	clássico	NR	(2,6x10 ³)
A19/5	H	-	ER/TT	CI	<i>ermB, tetL, tetM</i>	<i>asa1, gelE</i>	pir	NR	I
A21/2	P	-	ER/TT	CI/NI	<i>ermB</i>	<i>asa1, gelE</i>	clássico	1d	Frango ()
A22/1	M	ES	ER/TT/ES	-	<i>aph(3'')-IIIa, ermB, tetL, tetM</i>	<i>asa1, gelE</i>	arg, imóvel	NR	Frango
A22/3	MM	-	ER/TT	-	<i>tetL, tetM</i>	<i>gelE</i>	clássico	NR	(2,7x10 ³)
A22/5	J	-	ER/TT	-	<i>ermB, tetL</i>	<i>gelE</i>	clássico	NR	
A23/3	BB	-	TT/NI	-	<i>tetL, tetM</i>	NR	clássico	1d	Frango (5,0x10 ³)
A24/1	B	-	ER/TT	-	<i>tetL, tetM</i>	ND	raf	NR	
A24/3	O	-	ER/TT	-	<i>ermB, tetL, tetM, tetO</i>	<i>asa1</i>	raf	1d	Frango
A24/4	B	-	ER/TT	CL	<i>tetL, tetM, tetO</i>	<i>asa1, gelE</i>	raf	NR	(8,0x10 ²)
A24/5	B	-	ER/TT	-	<i>ermB, tetL, tetM</i>	<i>asa1</i>	raf	NR	
LPB2/1	X	ES	ER/TT/ES	-	<i>tetM</i>	<i>asa1, gelE, cyl</i>	clássico	NR	
LPB2/4	D1	-	ER/ES	CI	<i>tetL, tetM, tetO</i>	<i>asa1, gelE</i>	clássico	NR	Leite (1,0x10 ³)
LPB2/5	D2	-	ER/ES	CI	ND	<i>gelE</i>	clássico	NR	
LPB2/8	DD	ES	ER/CL/ES	-	<i>ermB, tetL, tetM</i>	<i>asa1, gelE</i>	clássico	NR	
LPB3/10	V	ES	ER/ES	-	<i>ermB, tetL, tetM</i>	<i>asa1, gelE</i>	clássico	NR	Leite (7,0x10)
LPB7/6	U	ES	ER/TT/ES/CL	-	<i>ermB, tetL, tetM</i>	<i>asa1, esp</i>	clássico	NR	Leite (3,0x10)
LPB14/4	LL	-	ER/CL	TT	<i>tetL, tetM</i>	<i>asa1, gelE</i>	clássico	NR	Leite (1,7x10 ²)
LPC25/3	Y	-	TT	LN	<i>tetM</i>	<i>gelE</i>	clássico	NR	I Leite ()

^a agentes antimicrobianos: CI, ciprofloxacina; CL, cloranfenicol; ER, eritromicina; ES, estreptomicina; GE, gentamicina; NO, norfloxacina; PE, penicilina;

TT, tetraciclina.

^b genes de resistência aos antimicrobianos: *ermB* (eritromicina); *tetL, tetM, tetO* (tetraciclina); *aph(3'')-IIIa* e *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* (gentamicina).

^c genes de virulência: *gelE* (gelatinase); *asa1* (substância de agregação).

ND: não detectado, NR:: não realizado

^d Representação do número de enterococos encontrados nas amostras de carne de frango ou leite pasteurizado, em Unidades Formadoras de Colônias por grama ou mililitro; I: incontável.

5 DISCUSSÃO

Microrganismos do gênero *Enterococcus*, foram durante muito tempo foram essencialmente considerados como comensais, entretanto nas últimas décadas passaram a ser reconhecidos como importantes patógenos oportunistas (Edwards, 2000). Suas características de resistência intrínseca ou adquirida aos antimicrobianos, seu arsenal de características diferenciais, que contribuem para a virulência do microrganismo. Além disto, sua capacidade de sobrevivência em condições ambientais bastante adversas lhes conferem facilidade de disseminação e representatividade nos ambientes nosocomiais (Gilmore et al., 2002; Giraffa et al., 2002). Seus dois principais representantes, as espécies *E. faecalis* e *E. faecium*, integram o grupo dos mais importantes agentes bacterianos relacionados com as infecções nosocomiais (Facklam et al., 2002). Poucos são os dados disponíveis na literatura, que retratam as características biológicas e epidemiológicas dos *Enterococcus* que não sejam sobre os *E. faecalis* e *E. faecium*. Mas, reconhece-se que algumas outras espécies, apesar de não serem isoladas com tanta frequência, podem ser responsáveis por infecções graves em seres humanos (Schouten et al., 2000).

Entretanto, há uma dualidade bastante significativa envolvendo os enterococos, pois apesar da sua crescente associação com infecções, fazem parte, em números expressivos da microbiota gastrointestinal de seres humanos e animais e conseqüentemente são encontrados contaminando quase tudo o que cerca os seres humanos (Giraffa, 2003; Klein, 2003).

Este projeto foi desenvolvido com o objetivo de determinar a ocorrência e as características fenotípicas e genéticas e o comportamento frente aos antimicrobianos, de *Enterococcus* isolados de produtos alimentícios de origem animal, carne crua de frango e leite pasteurizado, comercializados no período de outubro de 2002 a outubro de 2005, na cidade do Rio de Janeiro / RJ.

A presença dos enterococos na microbiota do trato gastrointestinal de seres humanos e animais, explica a ocorrência em alimentos de todos os tipos (Aarestrup et al., 2000). Uma vez presentes nos alimentos, esses microrganismos são capazes de sobreviver e se multiplicar, podendo resistir a alguns processos tecnológicos de preparação e preservação dos alimentos (Giraffa, 2003).

Embora com diferenças nos percentuais a espécie *E. faecalis* foi a predominante das amostras isoladas de carne de frango (50,9% das amostras) como de leite pasteurizado (77,9% das amostras), em concordância com resultados de outros autores (Franz et al., 1999; Gelsomino et al., 2001; Gelsomino et al., 2002; Giraffa, 2003; Peters et al., 2003; Lopes et al., 2005; Poeta et al., 2006).

A segunda espécie de enterococos mais frequentemente isolada de frango foi *E. casseliflavus* (26,3%), seguido por *E. gallinarum* e *E. gilvus* (4,2% cada), enquanto *E. durans* (12,6%) foi a segunda espécie mais frequentemente isolada a partir de leite pasteurizado, seguida por *E. casseliflavus* (5,5%). A prevalência de *E. faecium* no presente estudo foi baixa entre as amostras obtidas de frango (3%), em contraste outros estudos indicando *E. faecium* como a espécie de enterococo isolada com maior frequência de frango (Hayes et al., 2003). Entretanto, estudos reportam *E. faecium* como a espécie de ocorrência mais frequente depois de *E. faecalis* em alimentos de origem animal (Gelsomino et al., 2001; Gelsomino et al., 2002; Lopes et al., 2005).

Entretanto, espécies de enterococos produtoras de pigmento (*E. casseliflavus*, *E. gilvus* e *E. sulfureus*) representam 32,3% dos isolados de carne de frango e 5,5% (*E. casseliflavus* sómente) das espécies isoladas de leite. Por outro lado espécies que possuem naturalmente, resistência intrínseca a baixos níveis de vancomicina (*E. casseliflavus* e *E. gallinarum*) representaram 30,5% dos isolados de frango e 7,1% dos isolados de leite pasteurizado. Nossos resultados estão em desacordo com dados da literatura que registram a maior frequência de isolamento entre *E. faecalis* e *E. faecium* neste tipo de alimento (Manu et al., 2003; Lopes et al., 2006).

Em nossa amostragem de carne de frangos foi detectada a presença de *E. gilvus*, uma espécie descrita recentemente (Tyrrell et al., 2002) a partir de espécimens clínicos. Que seja do nosso conhecimento, a ocorrência de *E. gilvus* isolados em alimentos de origem animal não foi anteriormente descrita. Entre outros representantes do gênero, destacamos ainda a presença de *E. sulfureus*, cujo nicho ambiental parece ser as plantas (Martinez-Murcia et al., 1991) e de *E. hirae*, espécie considerada como patógeno animal raramente envolvido com infecções em seres humanos, e que parece estar mais frequentemente associada a produtos de origem animal (Stern et al., 1994; Peters et al., 2003; Klein, 2003; Poeta et al., 2006)

A grande maioria das infecções em seres humanos está associada à espécie *E. faecalis* e *E. faecium*. Entretanto, em geral *E. faecium* destaca-se por exibir diferenças quanto às características de multirresistência aos antimicrobianos (Mundy et al., 2000). Como são predominantes no trato gastrointestinal de seres humanos e animais, sua presença nos alimentos é relacionada a baixas condições de higiene, embora este grupo de microrganismos seja considerado como parte da flora normal dos alimentos (Franz et al., 1999).

Nossos achados estão em concordância com os dados da literatura, onde *E. gallinarum* foi detectada entre as espécies de menor frequência procedentes de carne crua de frango (Klein , 2003; Peters et al., 2003). A espécie *E. gallinarum* é primariamente encontrada em fezes de aves, assim como pode ser encontrada na microbiota do trato gastrointestinal de indivíduos hospitalizados, e de indivíduos saudáveis. Entretanto, não existem dados na literatura sobre a existência de algum fator de risco significativo dando subsídios para a colonização ou para a infecção por esta espécie foi ainda definido, dando suporte a possibilidade de que estes microrganismos também façam parte significativa da microbiota normal dos seres humanos (Shouten et al., 2000).

A diversidade de espécies de enterococos isolados a partir de leite pasteurizado mostrou-se mais restrita, com a prevalência destacada de *E. faecalis* (77,9%), seguida de *E. durans* (12,6%) e uma pequena representatividade de outras espécies, em contagens frequentemente menores do que as observadas para o outro produto analisado (carne de frango). Por outro lado, entre as amostras procedentes de carne crua de frango as contagens (UFC/g) e a diversidade de espécies observadas foram mais elevadas. Também foram detectadas atipias fisiológicas, embora em número um pouco menor do que aquelas observadas em amostras bacterianas oriundas de leite.

Os antibióticos são compostos com atividade antimicrobiana, que podem ser utilizados em medicina humana e veterinária para tratamento ou prevenção das doenças ou ainda com outros propósitos como por exemplo, promotores de crescimento. Entretanto, como decorrência de seu uso, pode ocorrer a seleção de mutantes bacterianos resistentes e os marcadores de

resistência podem ser transferidos para diferentes amostras de uma determinada espécie bacteriana ou ainda para diferentes espécies.

Estas considerações se revestem de grande importância, quando se convertem em definições sobre o uso racional dos antimicrobianos na chamada “terapia prudente” que deve ser observada tanto na medicina humana como na veterinária (Phillips et al., 2004).

Há poucas dúvidas sobre o fato de que a resistência aos antimicrobianos possa se espalhar entre amostras de origem animal e humana. Por outro lado também é bastante conhecido, que patógenos e mesmo não patógenos podem ser transmitidos via cadeia alimentar. Nos casos de bactérias que possuem marcadores de resistência aos antimicrobianos estes poderão se espalhar entre amostras que circulam entre animais e entre aquelas relacionadas a seres humanos. A utilização de cepas das espécies *E. faecalis* e *E. faecium* como iniciadoras em processos tecnológicos de produção de alimentos, bem como a utilização de antibióticos como promotores de crescimento em animais tornam a situação mais complicada e controversa.

Entretanto, é difícil prever quais resistências podem ser transferida através da cadeia alimentar. Portanto, a chave desta questão leva a uma necessidade constante de novas e eficientes estratégias, para que se possa minimizar os riscos de disseminação da resistência aos antimicrobianos entre as diferentes populações microbianas (Singer, 2003).

Desde que os *Enterococcus* 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 da diversidade genética apresentada por estes microrganismos.

Entre os marcadores de resistência adquirida pelos enterococos, os que geram mais preocupações são os relacionados com as opções terapêuticas mais importantes que compreendem uma penicilina ou um glicopeptídeo e um aminoglicosídeo. Além disto, resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos resulta em anulamento do efeito sinérgico obtido pela associação com a penicilina e a ampicilina (Murray, 1990). Entretanto, amostras bacterianas portadoras de resistência aos glicopeptídeos, também têm sido detectadas desde o final da década de 80, e as amostras multirresistentes tornaram-se, desde então, sérios problemas terapêuticos.

Os enterococos isolados a partir de espécimens clínicos, em particular *E. faecium*, vêm exibindo taxas cada vez maiores de resistência a ampicilina (Kak et al., 2002). Neste estudo, foi encontrada uma taxa de 17% de resistência a ampicilina entre amostras caracterizadas como *E. faecium*. Taxas semelhantes (em torno de 20%) foram descritas por Cortés e colaboradores (2006), na Espanha entre amostras isoladas de leite de cabra, enquanto que Poeta e colaboradores (2006) observaram taxas de 10,5% de resistência à ampicilina em isolados procedentes de frangos em Portugal.

Em nossa amostragem 33,3% dos *E. faecium* exibiram resistência à penicilina. Estes resultados demonstram percentuais menos elevados do que aqueles observados por Franz e colaboradores (2001), que detectaram 45,8% de resistência a penicilina entre amostras de enterococos. Entretanto, nossos resultados revelaram percentuais mais elevados do que os observados por Cortés e colaboradores (2006) de 20% em leite de cabra.

Observamos ainda, que *E. faecium* isolados a partir de carne de frango foram significativamente mais resistentes ao imipenem que *E. faecalis* isolados a partir de leite pasteurizado. Neste estudo os resultados obtidos em relação ao cloranfenicol apontaram uma taxa de 7,1% de resistência envolvendo *E. faecalis* e estão de acordo com os resultados obtidos por outros autores (Franz et al., 2001; Lopes et al., 2005; Poeta et al., 2006). Entretanto nossos dados discordam de outros que observaram percentuais de resistência ao cloranfenicol bem mais elevados entre enterococos isolados a partir de alimentos (Franz et al., 2001; Mannu et al., 2003; Hummel et al., 2007). O uso do cloranfenicol em animais confinados em fazendas, como promotor de crescimento, foi banido na Europa e, portanto, os resultados obtidos atualmente refletem a pressão seletiva pelo uso do antimicrobiano apenas para o tratamento dos animais (Cortés et al., 2006).

O mecanismo mais comum de resistência adquirida pelos enterococos aos macrolídeos resulta na redução da ligação ribossômica não somente com a eritromicina, mas também com outros macrolídeos (Kak et al., 2002). Embora esta classe de antimicrobianos não seja utilizada para o tratamento das infecções enterocócicas, a estreptogramina (que constitui uma associação de antimicrobianos deste grupo: a quinupristina e a dalfopristina) tem sido utilizada como alternativa para o tratamento de infecções causadas por *E. faecium* multirresistentes.

Em relação à eritromicina, os isolados testados neste estudo apresentaram percentuais de 23,3% de resistência considerando-se o total analisado. Entretanto, diferenças consideráveis nos percentuais de resistência à eritromicina foram observados, quando analisamos as duas espécies individualmente: *E. faecalis* (50%) e *E. faecium* (29,3%). Franz e colaboradores (2001) também observaram percentuais elevados de resistência à eritromicina envolvendo os *E. faecalis* (44,7%) e menos elevados em relação à espécie *E. faecium* (27,1%) entre amostras bacterianas procedentes de alimentos. Outros dados da literatura revelaram índices variáveis de resistência à eritromicina (2 a 44%) associados à espécie *E. faecalis* entre amostras obtidas de carne crua de frangos (Hayes et al., 2003). A ocorrência de percentuais elevados de resistência à eritromicina pode ser, em parte, explicada pelo fato de que a resistência dos enterococos frente a este antimicrobiano é codificada por genes localizados em plasmídeos ou transposons e isto facilita a disseminação (Murray, 1999).

Significativos percentuais de resistência intermediária (58,3%), a eritromicina foram detectados entre amostras isoladas dos dois tipos de alimentos analisados neste estudo. Estes resultados estão de acordo com os dados descritos por Mannu e colaboradores (2003), que obtiveram percentuais expressivos (até 96%) de resistência intermediária envolvendo as mesmas espécies por nós identificadas.

Os percentuais de resistência a tetraciclina são, em geral bastante elevados entre as amostras de enterococos obtidos de espécimens clínicos e, sendo assim, esses antimicrobianos não são usualmente recomendados para o tratamento das infecções causadas pelos enterococos em seres humanos (Kak et al., 2002). Entre os isolados obtidos a partir de alimentos o panorama tende a ser mais moderado, embora os percentuais de resistência envolvendo este antimicrobiano sejam também significativos. Em nosso estudo observamos um percentual de 32,1% de resistência à tetraciclina entre o total de enterococos analisados. Entretanto, percentuais mais elevados de resistência à tetraciclina foram detectados quando, consideradas as espécies individualmente, envolvendo *E. hirae*, *E. casseliflavus*, *E. sulfureus* e *E. faecalis*. Nossos relatos estão de acordo com a literatura, onde Wilcks e colaboradores (2005), na Dinamarca, descreveram percentuais de até 35% de resistência entre *E. faecalis* obtidos de carne crua de bovinos. Outros relatos evidenciaram também

a ocorrência de enterococos exibindo elevados percentuais de resistência à tetraciclina (44,7% a 70%) entre enterococos isolados de alimentos (Franz et al., 2001; Hayes et al., 2003). O fato é que, nas últimas décadas, grande atenção tem sido dedicada aos enterococos veiculados por alimentos, vistos como importantes reservatórios de resistência aos principais antimicrobianos disponíveis como opções terapêuticas (Klare et al., 2003).

Dados da literatura relatando o aumento progressivo da resistência ao cloranfenicol, eritromicina e tetraciclina vem se acentuando nas últimas décadas. Apesar de terem seu uso banido como promotores de crescimento de animais na Europa (Poeta et al., 2006) conforme citado, o uso continua permitido para a terapêutica desses animais. A localização dos determinantes genéticos, que codificam a resistência específica a estes antimicrobianos, em plasmídeos ou em transposons conjugativos, explica a ampla disseminação dos mesmos não só entre os enterococos como também entre microrganismos de outros gêneros bacterianos.

As oxazolidinonas pertencem a uma nova classe de agentes antimicrobianos desenvolvidos para enfrentar os cocos Gram positivos multirresistentes e a linezolidina foi o primeiro composto desta classe a ser aprovada para uso clínico (Kak & Chow 2002). Nossas observações confirmam os dados da literatura que indicaram a ausência de resistência à linezolidina entre os enterococos isolados a partir de alimentos, embora uma amostra com susceptibilidade intermediária a esse antimicrobiano tenha sido detectada a partir de leite pasteurizado.

Nossos resultados revelaram que apenas 1,4% de isolados obtidos dos dois tipos de alimentos testados apresentaram resistência à nitrofurantoína. Tais amostras foram identificadas como *E. durans* e eram procedentes de leite pasteurizado, constituindo os 5,2% de amostras e eram de marcadores de resistência a este antimicrobiano. Esse percentual é próximo ao relatado por Hayes e colaboradores (5,5% entre *E. faecalis* obtidos de carne crua de bovinos) e bem menos elevado do que aquele descrito por Mannu e colaboradores (2003) entre isolados obtidos de leite e derivados (17,5% de resistência às nitrofurantoínas).

A primeira fluoroquinolona utilizada largamente para uso terapêutico foi a ciprofloxacina. Entretanto, uma rápida disseminação de resistência a fluoroquinilonas tem ocorrido, com aumento significativo nos percentuais de

resistência entre enterococos de origem clínica (Kak et al., 2002). Em relação aos enterococos isolados a partir de alimentos, os padrões de resistência as fluoroquinolonas parece ser diferente. Nossos resultados demonstraram percentuais baixos (0,7%), quando considerado o total de isolados obtidos, e bem menos elevados, quando comparados com os dados de Poeta e colaboradores (2006), que detectaram resistência à ciprofloxacina em 8 a 12% das amostras de *E. faecium* e também com os relatos de Hershberger e colaboradores (2005) descrevendo taxas mais elevadas do que aquelas por nós encontradas.

Os antibióticos pertencentes à classe dos glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina) são utilizados para o tratamento das infecções graves causadas por bactérias Gram positivas resistentes aos antimicrobianos mais comuns. No presente estudo, nenhuma amostra bacteriana apresentou resistência a estes antimicrobianos. Tal observação está de acordo com alguns dados descritos na literatura (Franz et al., 2001; Hayes et al., 2003; Xavier et al., 2006), mas diferentes de outros que detectaram VREs isolados a partir de alimentos (Baumgartner et al., 2001; Aarestrup et al., 2002a; Cortés et al., 2006).

Em relação aos aminoglicosídeos, os percentuais de resistência para a gentamicina foram significativamente mais baixos (1,9%) do que com relação aos resultados obtidos com a estreptomicina (9,2%). As amostras que apresentaram HRL-GE foram identificadas como *E. faecalis* ou *E. casseliflavus* isoladas de carne de frango. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Poeta e colaboradores (2006), que obtiveram percentuais baixos de enterococos exibindo HRL-GE (1 a 7%), mais frequentemente associados a *E. faecalis* e a *E. faecium*. Entretanto, nossos resultados diferem dos obtidos por Mannu e colaboradores (2003) que relataram o isolamento de enterococos com HLR-GE, a partir de leite e derivados. Estão em discordância também com aqueles relatados por Donabedian e colaboradores (2003), que obtiveram altos percentuais de enterococos com HRL-GE a partir de carne de frango (69%) e de carne de suínos (85%).

Entre os isolados deste estudo, 25% daqueles identificados como *E. hirae* e procedentes de leite apresentaram resistência a altos níveis de estreptomicina (HRL-ST), enquanto que entre *E. faecalis* obtidos de carne de frango, 10,6% apresentaram esta característica. Nossos resultados revelaram percentuais mais elevados do que aqueles apresentados por Poeta e

colaboradores (2006) que relataram resultados de 17%, e ainda divergentes dos publicados por Franz e colaboradores (2001), que obtiveram resultados com 46,8% de resistência a altos níveis de estreptomicina entre amostras de *E. faecalis*, e de 4,2% entre amostras de *E. faecium*. No presente estudo, a resistência concomitante a gentamicina e à estreptomicina foi detectada, entre os enterococos da espécie *E. gallinarum* procedentes de carne de frango, e bem como em uma amostra de *E. casseliflavus* (obtida de frango) e uma amostra de *E. durans* procedente de leite pasteurizado. Curiosamente, nenhuma amostra de *E. faecalis* apresentou resistência simultânea aos dois aminoglicosídeos testados.

A ocorrência simultânea de determinantes genéticos de resistência ao cloranfenicol, a tetraciclina e à eritromicina, juntamente com marcadores de resistência à gentamicina, já foi detectada em plasmídeos conjugativos e isto poderia explicar a ocorrência de tantos isolados apresentando características de multirresistência incluindo estes antimicrobianos. Estas características de multirresistência aos antimicrobianos entre os isolados clínicos começaram a representar sérios problemas terapêuticos devido ao progressivo declínio do número de antimicrobianos com eficácia para o tratamento das infecções humanas (Levy, 2002). Entretanto, embora dados da literatura possam sugerir que existe uma expressiva conexão entre a resistência aos antimicrobianos veiculada pelos alimentos de origem animal, a resistência presente nos isolados procedentes de espécimens clínicos e também aquela observada entre os indivíduos saudáveis da comunidade (Eaton et al., 2001) esta correlação permanece muito controversa (Phillipis et al., 2004).

No presente estudo, detectamos 67 isolados que apresentaram o fenótipo de resistência simultânea a dois ou mais antimicrobianos, envolvendo várias espécies identificadas e as duas matrizes analisadas. Os fenótipos de multirresistência incluíram cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, nitrofurantoína, norfloxacin, penicilina, tetraciclina e estreptomicina. A maioria dos enterococos envolvidos com multirresistência aos antimicrobianos neste estudo foi observada na espécie *E. faecalis* e incluía amostras isoladas tanto de carne crua de frango como de leite pasteurizado. Outras espécies associadas a fenótipos de resistência a vários antimicrobianos simultaneamente incluíram *E. casseliflavus*, *E. faecium*, *E. durans* e *E. gilvus*.

Com exceção dos referentes a esta última espécie, nossos dados são semelhantes aos relatos da literatura (Hayes et al., 2003).

O atual significado clínico-epidemiológico do gênero *Enterococcus* torna relevante a busca de uma rápida definição de sua identificação, seus mecanismos de patogenicidade, assim como, um rastreamento mais preciso das infecções por eles causadas. A ocorrência de alterações relevantes em sua biologia, em especial no que se refere à aquisição de resistência aos vários grupos de antimicrobianos e às variações no comportamento fisiológicos, justifica a aplicação de metodologias que permitam uma caracterização mais rápida e com maior precisão das espécies que compõe este gênero.

A maioria das amostras de *Enterococcus* isoladas neste estudo foi identificada através da utilização dos testes fenotípicos convencionais (Facklam et al., 1999), onde foram reveladas características biológicas típicas que permitiram a caracterização das diferentes espécies deste gênero. Entretanto, em alguns casos, a determinação da espécie não foi possível utilizando apenas testes convencionais, uma vez que resultados atípicos indicaram a necessidade de utilização de recursos adicionais para confirmar a suspeita mais provável ou para a efetiva definição da identificação.

Para tanto, foi utilizada a técnica de análise dos perfis de proteínas totais após eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), técnica sensível, e reprodutível para a caracterização de diversas espécies enterocócicas. Os perfis proteômicos totais observados entre amostras de enterococos apresentam altos índices de correlação com os resultados de técnicas de análise do genoma bacteriano. Desta forma, uma vez que os perfis de proteínas representam as características fenotípicas de um isolado, refletem uma excelente aproximação com o genoma deste microrganismo (Merquior et al., 1994).

Entre as amostras submetidas a análise dos perfis de proteínas foram identificados alguns pertencentes as seguintes espécies: *E. faecalis*, *E. gilvus*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. hirae* e *E. faecium*. Tais amostras constituíram variantes atípicas de espécies de ocorrência comum ou amostras de espécies de ocorrência pouco comum, para as quais a técnica de análise dos perfis de proteínas se mostrou como uma ferramenta de muita utilidade.

Com a utilização da PCR espécie-específica foi possível a confirmação do gênero de alguns isolados. Nossos resultados incluem dados positivos para

a caracterização das espécies *E. faecalis* e *E. faecium* utilizando a PCR (Dutka-Malen et al., 1995) detectando os genes *ddl_{E. faecalis}* e *ddl_{E. faecium}*. Nossos dados incluem ainda a identificação, através desta técnica, do gene *vanC2/C3* como método alternativo para a confirmação da espécie *E. casseliflavus* e do gene *vanC1* para confirmação de *E. gallinarum*.

O emprego de métodos de análise de características genéticas de microrganismos tem contribuído significativamente para a abordagem sobre a diversidade e para o rastreamento de sua origem e disseminação.

Nossos resultados revelaram a presença de enterococos isolados a partir de alimentos exibindo resistência à gentamicina devido a expressão do gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*. As espécies envolvidas com tal resistência à gentamicina foram *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* e *E. faecalis*. Observamos ainda presença do gene *aph(3'')-IIIa*, que confere resistência a outros aminoglicosídeos que não a gentamicina, envolvendo *E. faecalis* e *E. casseliflavus* também procedentes de carne crua de frango. Tais resultados estão de acordo com os dados da literatura (Lopes et al., 2005; Poeta et al., 2006) com semelhança nos percentuais obtidos, mas envolvendo espécies diferentes.

O emprego em larga escala dos antimicrobianos em medicina humana e veterinária é responsável pelo aumento do interesse e atenção sobre este grupo de medicamentos e seu relacionamento com os microrganismos (Turnidge, 2004). Agentes antimicrobianos foram utilizados como promotores de crescimento por pelo menos, cinquenta anos na Europa e na América do Norte, mas provavelmente acabaram contribuindo para o aumento da resistência aos antimicrobianos entre as bactérias que circulam entre os seres humanos. A descontinuação da utilização dos antimicrobianos com este objetivo tem levado ao decréscimo da resistência aos antimicrobianos entre bactérias associadas a animais, alimentos e seres humanos, na Europa. A transferência dos genes de resistência para as bactérias patogênicas e também para as oportunistas colocou sérios problemas para serem administrados, uma vez que estes microrganismos podem estar envolvidos com infecções não tratáveis com os antimicrobianos comuns (Phillipis et al., 2004).

Os macrolídeos constituem um grupo dos antimicrobianos com extensivo uso em medicina veterinária, especialmente em rebanhos confinados (Butaye

et al., 2001). Os genes de resistência aos macrolídeos mais comuns são os *erm* (erythromycin ribosome methylation). Em nossa amostragem, entre os isolados caracterizados como multirresistentes submetidos a análise para evidenciação dos genes *ermA*, *ermB*, *ermC*, foi possível detectar apenas a presença do gene *ermB*, que codifica para a resistência à eritromicina. Neste grupo a grande maioria dos resultados coincide com os resultados da disco-difusão. Apenas em cinco deles a presença do gene *ermB* foi detectado, mas o fenótipo da resistência não foi expresso. A frequência da detecção do gene *ermB* em nossos relatos coincidem com os dados da literatura (Garofalo et al., 2007; Hummel et al., 2007).

A resistência à tetraciclina está presente em aproximadamente 65% dos enterococos procedentes de espécimens clínicos. Nos enterococos, dois grandes grupos de genes *tet* são mais frequentemente associados com a resistência a esse antimicrobiano (Choppra et al., 2001). O primeiro grupo confere resistência através da proteção ribossomal e inclui os genes *tetM*, *tetO* e *tetS*, e o segundo grupo de genes que conferem resistência à tetraciclina mediado por efluxo energia-dependente é representada nos enterococos pelos genes *tetK* e *tetL*. Nos 57 isolados procedentes de carne crua de frango, que foram submetidos aos ensaios para pesquisa dos genes de resistência à tetraciclina, 50 apresentaram o gene *tetK*, envolvendo as espécies *E. faecalis*, *E. casseliflavus* e *E. gallinarum*. Também em percentuais elevados foram detectados os genes *tetL* envolvendo as mesmas espécies, com exceção entre *E. gallinarum*. O gene *tetO* foi detectado neste estudo em 16 isolados. Nossos resultados estão de acordo com a literatura com relação aos resultados envolvendo o *tetK* e *tetL* (Wilks et al., 2005; Hummel et al., 2007), ou para os resultados evidenciando a presença do gene *tetM* (Huys et al., 2004).

Nossos resultados para a pesquisa dos genes de resistência à tetraciclina entre os isolados procedentes de leite pasteurizado evidenciaram que o gene *tetM* foi o mais frequentemente detectado, seguido pelo gene *tetL* e apenas dois isolados possuidores do gene *tetO* foram encontrados. Deste grupo apenas três isolados apresentaram o fenótipo de resistência à tetraciclina quando submetidos aos ensaios através da disco-difusão.

Embora os enterococos pareçam apresentar um potencial cada vez maior como agentes das infecções graves, pouco se sabe a respeito dos fatores que condicionam a virulência dos mesmos. Esta falta de informações

pode estar relacionada ao fato de que os enterococos, que vivem normalmente como comensais na microbiota intestinal em indivíduos saudáveis, possuem características de virulência, que muitas vezes são de difícil evidênciação (Shankar et al., 1999). Entretanto, numerosos fatores são associados ao risco de aquisição de infecções enterocócicas. Estes fatores incluindo resistência aos antimicrobianos e a expressão dos fatores de virulência associados com cepas de *E. faecalis* derivadas de infecções podem cooperar para que estes microrganismos atuem como um dos principais patógenos oportunistas nos ambientes nosocomiais (Marques et al., 2004).

Nossos resultados documentam a presença de genes que codificam para a virulência entre os amostras procedentes tanto de carne crua de frango envolvendo as espécies *E. faecalis*, *E. casseliflavus* e *E. gallinarum*, e entre amostras procedentes de leite envolvendo *E. faecalis* e *E. casseliflavus*. Na maioria dos relatos da literatura sobre a detecção de genes de virulência entre os enterococos, a partir de fontes variadas de isolamento, as espécies mais envolvidas são *E. faecalis* e *E. faecium* (Eaton et al., 2001; Shankar et al., 2002; Mannu et al., 2003; Semedo et al., 2003; Lopes et al., 2005).

Há evidências de que os *E. faecalis*, além de adquirirem genes conferindo resistência aos antimicrobianos através de trocas genéticas, adquirem também genes de virulência. Entre nossos isolados detectamos a presença do gene *gelE* entre amostras da espécie *E. faecalis* seguidas por *E. casseliflavus* procedentes de carne de frango. Já entre os isolados obtidos de leite pasteurizado, o gene *gelE* foi detectado apenas em amostras de *E. faecalis*. Estes resultados estão em concordância com os dados da literatura, que apontam *E. faecalis* frequentemente albergando o gene *gelE* (Eaton et al., 2001; Mannu et al., 2003; Semedo et al., 2003a; Lopes et al., 2005).

A presença do gene que codifica para a substância de agregação (*asa1*) foi por nós detectada entre amostras da espécie *E. faecalis*, assim como *E. casseliflavus* e *E. gallinarum*. Estes resultados estão em acordo com a literatura relatando a presença deste gene entre *E. faecalis* (Eaton et al., 2001), embora não seja comumente detectado entre os enterococos isolados a partir de alimentos. Em relação a amostragem dos isolados procedentes de leite pasteurizado também detectamos presença do gene *asa1* entre *E. faecalis* e *E. casseliflavus*.

Entre os isolados procedentes de carne crua de frango não foram detectados os genes de virulência *esp*, *cylA* e *hyl*. Entretanto, dados anteriores relatam a presença desses marcadores em *E. faecalis* e *E. faecium* procedentes de alimentos de origem animal (Eaton et al., 2001; Shankar et al., 2002; Mannu et al., 2003; Semedo et al., 2003b). Por outro lado, nossos resultados indicam genes de virulência *esp* e *cylA* entre os *E. faecalis* procedentes de leite.

Entre nossos isolados caracterizados como *E. faecium* não detectamos nenhum dos marcadores de virulência pesquisados.

Nossos resultados sugerem que as amostras isoladas de alimentos (leite principalmente) tenham potencial de patogenicidade mais baixo do que os isolados clínicos.

A análise dos perfis do DNA cromossômico através da eletroforese em gel de agarose submetido a um campo pulsado (PFGE) tem se revelado como um instrumento valioso na tipagem dos enterococos e é apontada como a técnica molecular mais adequada para este tipo de ensaios. Em nossos estudos, o DNA cromossômico de 54 isolados caracterizados como *E. faecalis* carreadores de multirresistência aos antimicrobianos foram analisados através do PFGE.

Foram detectados 39 perfis de fragmentação do DNA cromossômico distribuídos em 9 diferentes “clusters” ou constituindo perfis isolados. A análise dos padrões de restrição obtidos através do PFGE demonstrou uma alta diversidade genética entre os isolados analisados. Dados semelhantes demonstrando altos níveis de diversidade genética foram relatados nas espécies *E. faecalis* e *E. faecium* isolados a partir de amostras ambientais e em animais criados em fazendas no Reino Unido (Garcia-Migura et al., 2005).

Nossos resultados relatam a presença de muitos isolados apresentando diferentes perfis de fragmentação do DNA cromossômico portadores dos genes *ermB*, *tetL*, *tetM* e *tetO*. O número relativamente alto de enterococos portadores do gene de resistência à eritromicina (*erm B*) e a tetraciclina (*tet L*, *tet M* e *tet O*) expressos nesta amostragem apresentando grande diversidade genética, provavelmente se relaciona ao uso extensivo desses antimicrobianos em animais domésticos (Phillipis et al., 2004). Uma vez que os genes que codificam para a resistência à eritromicina, tetraciclina e cloranfenicol são frequentemente localizados nos “clusters” de genes de multirresistência e a

seleção de um ou mais desses elementos genéticos pode explicar os diferentes padrões de multirresistência (Weaver et al., 2002).

A legislação sobre alimentos em vigor no Brasil é a RDC 12 de 02 de janeiro de 2001. Foi deliberada pela diretoria colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que considera como meta importante a necessidade do constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área dos alimentos visando a proteção da saúde da população e a regulamentação dos padrões microbiológicos relacionados com os alimentos.

Este regulamento técnico sobre padrões microbiológicos dos alimentos se aplica aos critérios a serem observados para os alimentos destinados ao consumo humano e quando se refere a “carnes e produtos cárneos” contempla parâmetros apenas para coliformes termo-tolerantes e permite a não obrigatoriedade da pesquisa de *Salmonella* sp em frangos.

Com a entrada em vigor da RDC nº 13 de 02 de janeiro de 2001 a mesma diretoria colegiada da ANVISA reconsidera a necessidade de regulamentação sobre a presença de *Salmonella* sp em aves e miúdos crus, refrigerados ou congelados. Esta resolução contém regulamento técnico com instruções para o uso, preparo e conservação de carnes de aves que podem conter *Salmonella* sp.

A presença dos *Enterococcus* sp foi considerada pela Anvisa na RDC 275 de 22 de setembro de 2005, que delibera sobre a necessidade de regulamentação técnica das características microbiológicas para água mineral natural e água natural onde este gênero foi considerado junto com os coliformes termo-tolerantes, coliformes totais, *Pseudomonas aeruginosa* e clostrídios sulfito-redutores.

Diante dos resultados por nós obtidos, principalmente, em relação à diversidade ecológica e genética, a presença de significantes percentuais de resistência aos principais antimicrobianos, que constituem as opções terapêuticas e também de marcadores de virulência entre os enterococos isolados de amostras de alimentos de origem animal, sugerimos uma maior vigilância sobre a epidemiologia destes microrganismos. Além disto, a inclusão dos enterococos na legislação sobre alimentos de uma maneira mais efetiva, uma vez que sua transmissão via cadeia alimentar parece evidente.

6 CONCLUSÃO

A importância dos enterococos como causadores de infecções vem aumentando significativamente, principalmente com os novos modelos e mecanismos de resistência adquirida aos antimicrobianos. Este fato, alerta para a importância da cadeia alimentar na disseminação e expansão da resistência aos antimicrobianos dentro e fora dos ambientes nosocomiais.

Detectamos nos alimentos analisados, em concordância com a literatura, a predominância no isolamento da espécie *E. faecalis*, considerada, em geral, como representante do gênero mais frequentemente envolvida com infecções graves nos ambientes nosocomiais.

Entre os isolados obtidos a partir de leite pasteurizado detectamos uma frequência ainda maior no isolamento de *E. faecalis*. Tal observação reveste-se de particular importância, pois este tipo de alimento é submetido a um processamento térmico e portanto a carga microbiana presente deveria ser menor.

A presença de *E. gilvus*, foi detectada em carne de frango. Que seja de nosso conhecimento, até o momento, esta espécie foi isolada somente a partir de espécimens clínicos de origem humana.

Espécies com *E. casseliflavus*, isolada com bastante frequência nesta amostragem são esporadicamente associadas a problemas de origem clínica, com isolamento pouco frequente envolvidos em infecções. Entretanto, nossos isolados são portadores de fenótipos de resistência principalmente ao cloranfenicol e a eritromicina.

A caracterização fenotípica dos *Enterococcus* isolados, evidenciou uma variabilidade fisiológica significativa de algumas espécies, com resultados pouco comuns ou atípicos o que pode ser devido, pelo menos em parte, a adaptação metabólica aos substratos oferecidos pelos diferentes alimentos.

A maioria dos enterococos isolados a partir dos alimentos analisados apresentou resultados de sensibilidade a vários antimicrobianos testados, representantes dos esquemas terapêuticos convencionais.

Entretanto, um número considerável de isolados apresentou fenótipo de resistência a 2 ou mais antimicrobianos simultaneamente, envolvendo todas as espécies identificadas, principalmente as duas mais frequentes (*E. faecalis* e *E. casseliflavus*).

Enterococos isolados de carne de frango e de leite pasteurizado apresentaram fenótipo de resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos (gentamicina e estreptomicina), envolvendo principalmente *E. faecalis*. Este fato se reveste de grande importância, quando se considera o esquema terapêutico sinérgico representado pela associação dos β -lactâmicos com aminoglicosídeos na terapia de escolha nas infecções enterocócicas graves.

Nenhum dos isolados caracterizados como *E. gilvus* e *E. faecium* apresentaram resistência a níveis elevados de aminoglicosídeos.

Os enterococos apresentando características de multirresistência aos antimicrobianos foram isolados tanto de carne crua de frango como de leite pasteurizado.

Neste estudo, isolados pertencentes às espécies *E. faecalis*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* e *E. durans* eram portadores de genes de resistência à eritromicina (*ermB*) e de genes associados a resistência a níveis elevados de gentamicina, aminoglicosídeos (*aac(6')-Ie-aph(2'')*-Ia e *aph(3')-IIIa*).

Foi possível observar, também, que amostras *E. faecalis* multirresistentes obtidas de alimentos neste estudo, albergaram genes de virulência, *gelE* e *asa1*.

A diversidade genética de um grupo de isolados apresentando fenótipo de resistência a dois ou mais antimicrobianos simultaneamente procedentes de carne de frango e de leite pasteurizado foi avaliada. A análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico através de eletroforese em campo pulsado, revelou uma elevada diversidade genética entre os isolados analisados. Foram detectados diferentes perfis de fragmentação do DNA cromossômico divididos em grupos clonais distintos, ou perfis isolados. O presente estudo permitiu a caracterização de espécies de enterococos frequentemente envolvidas com graves problemas nosocomiais, portadoras de fenótipos de resistência a antimicrobianos, expressando marcadores de virulência, isoladas a partir de alimentos. Diante disto, e considerando-se a emergência de amostras com estas características em nosso meio, bem como as evidências de que tais amostras de enterococos servem de reservatório, podendo atuar na manutenção e disseminação destes genes, consideramos a necessidade e importância do monitoramento destes microrganismos assim como a representatividade da cadeia alimentar como veículo de disseminação para os microrganismos de importância em saúde pública.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F. M. Monitoring of antimicrobial resistance among food animals: principles and limitations. **J. Vet. Med. B S** 1: 380 – 388, 2004.

AARESTRUP, F. M., BUTAYE, P. & WITTE, W. Nonhuman reservoirs of enterococci. P. 55 – 99. In. M. S. Gilmore, D. B. Clewell, P. M., Courvalin, G. M., Dunny, B. E. Murray, & L. B. Rice (eds.). *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance*. American Society for Microbiology, Washington, DC, 2002a.

AARESTRUP, F. M., HASMAN, H., JENSEN, L. B., MORENO, M., HERRERO, I. A., DOMÍNGUEZ, L. & FRANKLIN, A. Antimicrobial resistance among enterococci from pigs in three European countries. **Appl. Environ. Microbiol.**, 68: 4127 – 4129, 2002b.

AARESTRUP, F. M. Characterization of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* (GRE) from broilers and pigs in Denmark: genetic evidence that persistent of GRE in pig herds is associated with coselection by resistance to macrolides. **J. Clin. Microbiol.**, 38: 2774 – 2777, 2000.

ALBUQUERQUE, V. S. *Enterococcus* resistentes a níveis elevados de gentamicina (HLRG): caracterização fenotípica, detecção de genes de resistência e diversidade genética 2001.il. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), RJ, Brasil.

ALBUQUERQUE, V. S., SILVA, C. M. F., MARQUES, E. A., TEIXEIRA, L. M. & MERQUIOR, V. L. C. Occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in Rio de Janeiro, Brazil: strains showed genetic relationships with a high-level gentamycin resistant (HLRG) endemic clone. Abstracts of 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy.,107, 2000, Toronto, Canada.

AMBÚR, O. H., REYNOLDS, P. E. & ARIAS, C. A. D-Ala:D-Ala ligase gene flanking the vanC cluster: evidence for presence of three ligases genes in vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* BM 4174. **Antimicrob. Agents Chemother.** 46: 95 -100, 2002.

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.), 1998. AOAC International, Gaithersburg, MD.

ANTALECK, M. O., MYLLOTE, J. M., LESSE, A. J. & SELICK JR., J. A. Clinical and molecular epidemiology of *Enterococcus faecalis* bacteremia, with special reference to strains with high-level resistance to gentamicin. **Clin. Infect. Dis.** 20:103 – 109, 1995.

ARTHUR, M., COURVALIN, P. Genetics and mechanisms of glycopeptides resistance in Enterococci. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 37:1563 – 1571,1993.

BATES, J., JORDENS, J. & GRIFFITHS, D. T. Farm animals as a putative reservoir for vancomycin-resistant enterococcal infection in man. **J. Antimicrob. Chemother.**, 34: 507 – 516, 1994.

BAUNGARTNER, A., KUEFFER, M. & ROHNER, P. Occurrence and antibiotic resistance of enterococci in various ready-to-go-eat foods. **Arch. Lebensm. Hyg.**, 52: 1 – 24, 2001.

BEN OMAR, N., CASTRO, A., LUCAS, R., ABROUEL, H., YOUSIF, N. M. K. L., FRANZ, C. M. A. P., PÉREZ-PULIDO, R., MARTINEZ-CAÑAMERO, M. & BOGAARD, VAN DEN, A. E. & STOBBERINGH, E. E. Epidemiology of resistance to antibiotics – links between animal and humans. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, 14: 327 – 335, 2000.

BONILLA, H. F., ZERVOS, M. J., LYONS, M. J., BRADLEY, S. F., HENDERWICK, S. A., RAMSEY, M. A., PAUL, L. K. & KAUFFMAN, C. A. Colonization with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: comparison of a long-term care unit with an acute-care hospital. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, 8: 333 – 33,1997.

BOUNTEN, H. F., WILLEMS, R. & WEINSTEIN, R. A. Vancomycin-resistant enterococci: Why are they here, and where do they come from? **Lancet Infect. Dis.**, 1: 314 – 325, 2001.

BOSLEY, J. M., OPAL, S. M., POTTER-BYNOE, G., LAFORGE, R. G. ZERVOS, M. J., FURTADO, G., VICTOR, G. & MEDEIROS, A. A. Rapid identification of enterococci. **J. Clin. Microbiol.** 18: 275 – 1277, 1983..

BOYCE, J. M., OPAL, S. M., CHOW, J. W., ZERVOS, M. J., POTTER-BYNOE, G., SHERMAN, C. B., ROMULO, R. L. C., FORTUNA, S. & MEDEIROS, A. A. Outbreak of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* with transferable van B class vancomycin resistant. **J. Clin. Microbiol.** 32: 1148 – 1153, 1994.

BOYCE, J. M., OPAL, S. M., POTTER-BYNOE, G., LA-FORGE, R. G., ZERVOS, M. J., FURTADO, G., VICTOR, G. & MEDEIROS, A. A. Emergence and nosocomial transmission of ampicillin-resistance enterococci. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 36:1032 – 1039,1992.

BRASIL, 2001. RDC 12 de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial [da] **República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 de janeiro de 2001.

BRASIL, 2001. RDC 13 de 2 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico para instruções de uso, preparo e conservação na rotulagem de carne de aves e seus miúdos crus, resfriados ou congelados. Diário Oficial [da] **República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 de janeiro de 2001.

BRASIL, 2005. RDC 275 de 22 de setembro de 2005. Regulamento Técnico de características microbiológicas para água mineral natural e água natural. Diário Oficial [da] **República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 de setembro de 2005.

BUTAYE, P., DEVRIESE, L. A. & HAESBROUCK, F. Differences in antibiotic resistance patterns of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains isolated from farm and pet animals. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 45:1374 – 1378, 2001.

CARIAS, L. L., RUDIN, S. D., DONSKEY, C. J. & RICE, L. B. Genetic linkage and cotransfer of a novel VanB-containing transposon (*Tn 5382*) and a low-affinity penicillin-binding protein 5 gene in a clinical vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolate. **J. Bacteriol.**, 180: 4426 – 4434, 1998.

CARVALHO, M. G. S., TEIXEIRA, L. M. & FACKLAM, R. R. Use of tests for acidification of methyl- α -D-glucopyranoside and susceptibility to efrotomycin for differentiation of strains of *Enterococcus* and some related genera. **J. Clin. Microbiol.**, 36:1584 – 1587, 1998.

CARVALHO, M. G. S., VIANNI, M. C. E., ELIOT, J. A., REEVES, M., FACKLAM, R. R. & TEIXEIRA, L. M. Molecular analysis of *Lactococcus garviae* and *Enterococcus gallinarum* isolated from water buffalo with sub-clinical mastitis. **Adv. Exp. Med. Biol.**, 418: 401 – 404, 1997.

CARVALHO, M. G. S., ALVES, E. M., FERREIRA, R. M. C., MELLO, M. S., SUASSUNA, I. R. & TEIXEIRA, L. M. 1995. Ocorrência de resistência a níveis elevados de antimicrobianos entre amostras de *Enterococcus* isoladas no Hospital Clementino Fraga Filho HU-UFRJ. Resumos do Congresso Brasileiro de Microbiologia, pág. 101, 1995, Brasil.

CERCENADO, E., ÜNAL, S., ELIOPOULOS, C. T., ISENBERG, H. D., MOELLERING, R. C. & ELIOPOULOS, G. M. Characterization of vancomycin resistance in *Enterococcus durans*. **J. Antimicrob. Chemother.**, 36: 821 – 825, 1995.

CHENOWET, C. & SCHABERG, D. Epidemiology of enterococci. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 9 : 80 – 89, 1990.

CHOPRA, I & ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics : mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 65 : 232 – 260, 2001.

CHOW, J. W. Aminoglycoside resistance in enterococci. *Clin. Infect. Dis.*, 31 : 586 – 593, 2000.

CHIRURGI, V. A., OSTER, S. E., GOLDBERG, A. A. & MACCABE, R. E. Nosocomial acquisition of β -lactamase-negative, ampicillin-resistant enterococcus. *Arch. Intern. Med.*, 152: 1457 – 1461, 1992.

CLARK, C. N., COOKSEY, R. C., HILL, B. C., SWENSON, J. M. & TENOVER, F. C. Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from U. S. Hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 37: 2311 – 2317, 1993.

CLEVELAND, J., MONTEVILLE, T. J., NES, I. F. & CHIKINDAS, M. L. Bacteriocins: safe natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 71: 1 – 20, 2001.

CLEWELL, D.B. Movable genetic elements and antibiotic resistance in enterococci. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 9: 90 – 102, 1990.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE – CLSI / NCCLS Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved Standard M2 – A9 vol. 20 n^o 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

COLLINS, M. D., RODRIGUES, U. M., PIGOTT, N. E. & FACKLAM, R. R. *Enterococcus dispar* sp. Nov. a new *Enterococcus* species from human sources. **Lett. Appl. Microbiol.**, 12: 95 -98, 1991.

COQUE, T. M., ARDUINO, R. C. & MURRAY, B.E. High-level resistance to aminoglycosides: comparison of community and nosocomial faecal isolates of enterococci. **Clin. Infect. Dis.**, 20: 1048 – 1051, 1995.

CORTÈS, C. DE LA FUENTE, R., CONTRERAS, A., SANCHEZ, A., CORRALES, J. A., RUIZ-SANTA-QUITÈRIA, J. A. & ORDEN, J. A. Occurrence and preliminary study of antimicrobial resistance of enterococci isolated from dairy goats in Spain. **Int. J. Food Microbiol.**, 110: 100 – 103, 2006.

COURVALIN, P. Resistance of enterococci to glycopeptides. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 34: 2291 – 2296, 1990.

DAHL, K. H., SIMONSEN, G. S., OLSVIK, O. & SUNDSFORD, A. Heterogeneity in the *vanB* gene cluster of vancomycin-resistant enterococci. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 43: 1105 – 1110, 1999.

DALLA COSTA, L. M., SOUZA, D. C., MARTINS, L. T. F., ZANELLA, R. C., BRANDILEONE, M. C., BOKERMANN, S., SADER, H. S. & SOUZA, A. P. H. M. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: first case in Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, 2: 160 – 163, 1998.

DAVIES, R. & ROBERTS, T. A. Antimicrobial susceptibility of enterococci recovered from commercial swine carcasses: effect of feed additives. **Lett. Appl. Microbiol.**, 29: 327 -333, 1999.

d'AZEVEDO, P. A., DIAS, C. C. & TEIXEIRA, L. M. Genetic diversity of high-level aminoglycoside resistant enterococcus strains isolated in the southern region of Brazil. P. 470, 2001. In: Abstract of 101st General Meeting of American Society for Microbiology (Orlando, Florida), American Society for Microbiology, Washington, DC.

D'AZEVEDO, P., DIAS, C. A., GONSALVEZ, A. L., ROWE, F. & TEIXEIRA, L. M. Evaluation of automated system for the identification and antimicrobial susceptibility testing of *Enterococcus*. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, 40: 157 – 161, 2001.

D'AZEVEDO, P., DIAS, C. A. G., BITTENCOURT, J. A., LEMOS, S. K., SCHDWITZ, C. L. & TEIXEIRA, L. M. Species distribution and antimicrobial susceptibility of *Enterococcus* isolated in the Southern region of Brazil. Abstracts of 99th American Society for Microbiology General Meeting, p. 21, 1999.

DEASY, B. M., REA, M. C., FITZGERALD, G. F., COGAN, T. M. & BERESFORD, T. P. A rapid PCR based method to distinguish between *Lactococcus* and *Enterococcus*. **System. Appl. Microbiol.**, 23: 510 - 522, 2000.

DEMBRY, L. M., UZOKWE, K. & ZERVOS, M. J. Control of endemic glycopeptide-resistant enterococci. **Infect Control Hospital Epidemiol.**, 17: 287–292, 1996.

DEVRIESE, L. A., POT, B., VAN DAMME, L., KERSTERS, K. & HAESEBROUCK, F. Identification of *Enterococcus* species isolated from foods of animal origin. **Intern. J. Food Microbiol.**, 26: 187 – 197, 1995.

DEVRIESE, L. A., DE HEARDT, P. & HAESEBROUK, F. Enterococcal and Streptococcal species isolated from faeces of calves, young cattle and dairy cows. **J. Appl. Bacteriol.**, 72: 29 – 31, 1992.

DEVRIESE, L. A., HOMMEZ, J., WIFFLES, R. & HAESNBROUCK, F. Composition of the enterococcal and streptococcal intestinal flora of poultry. **J. Appl. Bacteriol.**, 71: 46 – 50, 1991.

DEVRIESE, L. A., CEYSSENS, K., RODRIGUES, U. M. & COLLINS, M. D. *Enterococcus columbae*, a species from pigeon intestines. **FEMS Microbiol. Lett.**, 71: 247 – 252, 1990.

DE VUYST, L., AVOUNTS, L. & NAKRAS, E. Probiotics, prebiotics and gut health (Chap 17). Remade, C., Rensens, B. (eds.), **Functional Foods, Ageing and Degenerative Disease**. Woodhead Publishing Ltd. Cambridge, United Kingdom, 416 – 482, 2004.

DE VUYST, L. & VAN DAMME, E. J. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In: De Vuyst, L., Van Damme, E. J. (eds.), *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetic and Applications*, Blackie Academic & Professional, London, United Kingdom, 91 – 142, 1994.

DONABEDIAN, S. M., THAL, L. A., HERSHBERGER, E., et al. Molecular characterization of gentamicin-resistant enterococci in the United States: evidence of spread from animals to humans through food. **J. Clin. Microbiol.**, 4: 1109 – 1113, 2003.

DUTKA-MALEN. S., EVERS, S. & COURVALIN, P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant Enterococci by PCR. **J. Clin. Microbiol.**, 33: (1) 24-27, 1995.

EATON, T. J. & GASSON, M. J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. **Appl. Environ. Microbiol.**, 67: 4385 – 4389, 2001.

EDMOND, M. B., OBER, J. F., WEINBAUM, D. L., PFALLER, M. A., HWANG, T., SANFORD, M. D. & WENZEL, R. P. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia: risk factors for infection. **Clin. Infect. Dis.**, 23: 1234 – 1239, 1995.

EDWARDS, D. D.. Enterococci attract attention of concerned microbiologists. **ASM News**, 66: 540 545, 2000.

FRANZ, C. M. A. P., STILES, M. E., SCHLEIFER, K. H. & HOLZAPFEL, W. H. Enterococci in foods – a conundrum for food safety. Intern. **J. Food Microbiol.**, 88: 105 – 122, 2003.

FRANZ, C. M. A. P., MUSCHOLL-SILBERHORN, A. B., YOUSIF, N. M. K., VANCANNEYT, M., SWINGS, J. & HOLZAPFEL, W. H. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. **Appl. Environ. Microbiol.**, 67: 4385 – 4389, 2001.

FRANZ, C. M. A. P., HOLZAPFEL, W. H. & STILES, M. E. Enterococci at the crossroads of food safety? **Int. J. Food Microbiol.**, 47: 1 – 24, 1999.

FONTANA, R., CERINI, R., LONGONI, P., GROSSATO, A. & CAMPARI, P. Identification of a Streptococcal penicillin-binding protein that reacts very slowly with penicillin. **J. Bacteriol.**, 155: 1343 – 1350, 1983.

FURUMURA, M. T., CARBONELL, G. V., LEMES-MARQUES, E. G., DARINI, A. L. C. & YANO, T. Características de hemolisina termo-estável produzida por *Enterococcus faecalis* provenientes de infecção hospitalar. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, XXI, Foz do Iguaçu, Brasil, p. 113, MH-226, 2001.

GAMBAROTTO, K., PLY, M. C., DUPRON, F., GIANGIOBRE, M. & FRANÇOISE, D. Occurrence of vancomycin-resistant enterococci in pork and poultry products from a cattle-rearing area of France. **J. Clin. Microbiol.**, 39: 2345 -1355, 2001.

GARCIA-MIGURA, L., PLEYDELL, E., BARNES, S., DAVIES, R. H. & LIEBANA, E. Characterization of vancomyci-resistant *Enterococcus faecium* isolates from broiler poultry and pig farms in England and Wales. **J. Clin. Microbiol.**, 43: (7) 3283 – 3289, 2005.

GARNIER, J., TAOURIT, S., GLASER, P., COURVALIN, P. & GALIMAND, M. Characterization of transposon *Tn 1549* conferring VanB type resistance in *Enterococcus* spp. **Microbiology**;146: 1481 – 1489, 2000.

GAROFALO, C., VIGNAROLI, C., ZANDRI, G., AQUILANTE, L., BORDONI, D., OSIMANI, A., CLEMENTI, F. & BIAVASCO, F. Direct detection of antibiotic resistance genes in specimens of chicken and pork meat. **Int. J. Food Microbiol.**, 113: 75 – 83, 2007.

GELSOMINO, R., VANCANNEYT, M., COGAN, T. M., CONDON, S. & SWINGS, J. Source of enterococci in a farm house raw-milk cheese. **Appl. Environ. Microbiol.**, 68: 3560 – 3565, 2003.

GELSOMINO, R., VANCANNEYT, M., COGAN, T. M., CONDON, S. & SWINGS, J. Source of enterococci in a farmhouse raw milk cheese. **Appl. Environ. Microbiol.**, 68: 3560 – 3565, 2002.

GELSOMINO, R., VANCANNEYT, M., CONDON, S., SWINGS, J., COGAN, T. M. Enterococcal diversity in the cheesemaking environment of an Irish Cheddar – type cheesemaking factory. **Int. J. Food Microbiol.**, 71:177 – 188, 2001.

GILMORE, M. S., COBURN, P. S., NALLAPAREDDY, S. R. & MURRAY, B. The Enterococci Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance. Michael S. Gilmore et al. (eds.), 2002. ASM Press, Washington, DC.

GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. **Intern. J. Food Microbiol.**, 88: 215 – 222, 2003.

GIRAFFA, G. Enterococci from foods. **FEMS Microbiol. Reviews**, 26: 163 – 171, 2002.

GIRAFFA, G., CARMINATI, D. & NEVINE, F. Enterococci isolated from dairy products: a review of risk and potential technological use. **J. Food Prot.**, 60: 732 – 738, 1997.

GORDON, C. L. A. & AHMAD, M. H. Thermal susceptibility of *Streptococcus faecium* strains isolated from frankfurters. **Can. J. Microbiol.**, 37: 609 – 612, 1991.

GRAHAM, J. C. & GOULD, F. K. Role of aminoglycosides in the treatment of bacterial endocarditis. **J. Antimicrob. Chemother.**, 49: 437 – 444, 2002.

HACKER, J. & KAPER, J. B. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. **Annu. Rev. Microbiol.**, 54: 641 – 679, 2000.

HANCOCKE, L. E. & GILMORE, M. S. Pathogenicity of enterococci p. 251 258, In: V. A. Fishetti, R. P., Novick, J. J., Ferreti, D. A. Portnoy & J. I. Road. (ed.), 2000, Gram positive Pathogens. ASM press, Washington, D. C.

HANRAHAN, J., HOYEN, C. & RICE, L.B. Geographic distribution of a large mobile element that transfer ampicillin and vancomycin resistance between *Enterococcus faecium* strains. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 44: 1349 – 1351, 2000.

HARRINGTON, S. M., ROSS, T. L. & MERZ, W. G. Prevalence of *esp* in enterococcal bacteremia isolates. 103rd Gen Meet ASM. Abstract C – 414 - 194, 2003.

HARTMAN, P. A., DIEBEL, R. H. & SIEVERDING, L. M. Enterococci. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 3th Edition. Vanderzant, C. & Splittstoesser, D. F. (Eds.), 1992. American Public Health Association.

HAYES, J. R., ENGLISH, L. L., CARTE, P. J., PROECHOLDT, T., LEE, K. Y., WAGNER, D. D. & WHITE, D. G. Prevalence, and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from retail meat. **Appl. Environ. Microbiol.**, 69: (12) 7153 – 7160, 2003.

HERSHBERGER, E., OPREA, S. F. & DONABEDIAN, S. M. et al., Epidemiology of antimicrobial resistance in enterococci of animal origin. **J. Antimicrob. Chemother.**, 55: 127 – 130, 2005.

HILL, M. J., DRASAR, B. S., ARIES, V., CROWTHER, J. S., HAWKSWORTH, G. & WILLIAMS, R. E. O. Bacteria, and aetiology of cancer in large bowel. **Lancet** , 1: 95 – 100, 1971.

HOLZAPFEL, W. R. & WOOD, B. J. B. Lactic-acid bacteria in contemporary perspective, IN: Wood, B. J. B., Holzapel, W. H. (Eds.). The genera of Lactic Acid Bacteria, vol. 2. Chapman & Hall, London, p. 1 – 6, 1999.

HOLZAPFEL, W. H., HABERER, P., SNEL, J., SCHILLINGER, V. & HUIS, J. H. J. Overview of gut flora and probiotics. **Int. J. Food Microbiol.**, 41: 84 – 101, 1998.

HOSPITAL INFECTION CONTROL PRACTICES ADVISORY COMMITTEE - HICPAC. Recommendation of preventing the spread of vancomycin resistance. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, 16: 105 – 113, 1995.

HUGAS, M., GARRIGA, M. & AYMERICH, M. T. Functionality of enterococci in meat products. **International J. Food Microbiol.**, 88: 223 – 233, 2003.

HUGAS, M. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of a meat and meat products. **Meat Sci.**, 49: 139 – 150, 1998.

HUMMEL, A., HOLZAPFEL, W. H. & FRANZ, C. M. A. P. Characterization and transfer of antibiotic resistance genes from enterococci isolated from food. **System. Appl. Microbiol.**, 30: (1), 1 – 7, 2007.

HUYCKE, M. M., SAHN, D. F. & GILMORE, M. J. Multiple-drug Resistant Enterococci: The nature of the problem and agenda for the future. **Emerg. Infect. Dis.**, 4: (2), 239 – 249, 1998.

HUYS, G., D'HAENE, K., COLLAND, J-M. & SWINGS, J. Prevalence and molecular characterization of Tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from food. **Appl. Environ. Microbiol.**, 70: (3), 1555 – 1562, 2004.

IVERSEN, A., KÜHN, I., FRANKLIN, A. & MÖLBY, R. High prevalence of vancomycin resistant enterococci in Swedish sewage. **J. Clin. Microbiol.**, 68: 2838 – 2842, 2000.

IKE, Y. & CLEWELL, D. B. 1992. Evidence that the hemolysin, bacteriocin phenotype of *Enterococcus faecalis* subsp. *Zymogenes* can be as well as by the chromosome. **J. Bacteriol.**, 174: 8172 – 8177, 1992.

IKE, Y., CLEWELL, D. B., SEGARRA, R. A. & GILMORE, M. S. Genetic analysis of the hemolysin determinant in *Enterococcus faecalis*: TN 917 insertional mutagenesis and cloning. **J. Bacteriol.**, 172: 155 – 163, 1990.

JETT, B. D., HUYCKE, M. M. & GILMORE, M. S. Virulence of enterococci. **Clin. Microbiol. Rev.**, 7: 462 – 478, 1994.

JOHNSON, A. P. The pathogenicity of enterococci. **J. Antimicrob. Chemother.**, 33: 1083 – 1089, 1994.

JONES, R. N., BEACH, M. L., PFALLER, M. A. & DOERN, G. V. Antimicrobial activity of gatifloxacin tested against 1676 strain of ciprofloxacin-resistant Gram positive cocci isolated from patient infections in North and South America. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, 32: 247 – 252, 1998.

KAK, V. & CHOW, J. W. Acquired antibiotic resistance in enterococci, In: The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance. M S. Gilmore, ed. **ASM Press**, Washington, 355, 2002.

KAO, S. S., CLEWELL, D. B., DONABEDIAN, S. M., ZERVOS, M. J., PETRIM, J., SHAW, K. J. & CHOW, J. W. Detection of high-level aminoglycoside resistance gene *aph(2'')-Ib* in *Enterococcus faecium*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 44: 2876 – 2879, 2000.

KAYSER, F. H. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. **Intern. J. Food Microbiol.**, 88: 255 – 262, 2003.

KOWALECK, M., GNIADWSKI, M., ZELESKA, M., OZOROWSKI, T., KONOPLA, L. & HRYNIEWICZ, W. Outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* of the phenotype VanB in a hospital in Warsaw, Poland: Probable transmission of resistance determinants into an endemic vancomycin-susceptible strain. **J. Clin. Microbiol.**, 39: 1781 – 1787, 2001.

KEARNS, A. M., FREEMAN, R. & LIGTH-FOOT, A. M. Nosocomial enterococci: resistance to heat and sodium hypochlorite. **J. Hosp. Infect.**, 30: 193 – 199, 1995.

KLARE, I., KONSTABEL, C., BADSTUBNER, D., WERNER, G. & WITTE, W. Occurrence and spread of antibiotic resistance in *Enterococcus faecium*. **Int. J. Food Microbiol.**, 88: 269 – 290, 2003.

KLARE, I., HEIER, H., CLAUS, R., REISSEBROD, T. & WITTE, W. *vanA*-mediated high-level glycopeptides resistance in *Enterococcus faecium* from animal husbandry. **FEMS Microbiol. Lett.**, 125: 165 – 172, 1995.

KLEIN, G. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. **Int. J. Food Microbiol.**, 88: 123 – 131, 2003.

KNUDTSON, L. M. & HARTMAN, P. A. Enterococci in pork processing. **J. Food Prot.**, 56: (1), 6 – 9, 1993.

KÜHN, I., IVERSEN, A., BURMAN, L. G., OLSON-LILJEQUIST, B., FRANKLIN, A., FINN, M., AARESTRUP, F., SEYFARTH, A-M., BLANCH, A. R., TAYLOR, H., CAPLIN, J., MORENO, M. A., DOMINGUEZ, L. & MOLBY, R. 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. **Intern. J. Antimicrob. Agents**, 14: 337 – 342, 2000

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. **Nature**, 227: 680 – 685, 1971, 1970.

LANCEFIELD, R. C. A serological differentiation of human and other group of hemolytic streptococci. **J. Exp. Med.**, 57: 571 -595, 1933.

LAUKOVA, A., CZIKKOVA, S., DOBRANSKY, T. & BURDOVA, O. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by enterocin CCM 4231 in milk products. **Food Microbiol.**, 16: 93 – 99,1999.

LEAVIS, H., TOP, J., SHANKAR, N., BORGAN, K., BONTEN, M., EMBDEN, J. & WILLEMS, R. J. L. A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the esp virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. **J. Bacteriol.**, 186: 672 – 682, 2004.

LECLERCQ, R. Enterococci acquire new kinds of resistance. **Clin. Infect. Dis.**, 24: (Suppl. 1) S80 –S84, 1997.

LECLERCQ, R. & COURVALIN, P. Mechanisms of resistance to macrolides and functionally related antibiotics. In: A. J. Bryskier, J. P., Butzler, H. C. Neu, and P. M. Tulkens (ed.), 1993. Macrolides – chemistry, pharmacology and clinical uses. Aenette, Blackwell, Paris, France.

LOPES, M. F. S., RIBEIRO, T., ABRANTES, M., MARQUES, J. J. F., TENREIRO, R & CRESPO, M. T. B. Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci. **Int. J. Food Microbiol.**, 103: 191 – 198, 2005.

LOPES, M. F., RIBEIRO, T., MARTINS, M. P., TENREIRO, R. & CRESPO, M. T. Gentamycin resistance in dairy and clinical enterococcal isolates and in reference strains. **J. Antimicrob. Chemother.**, 52: 214 – 219, 2003.

MCKESSAR, S. J., BERRY, A. M., BELL, J. M., TURNIDGE, J. D. & PATON, J. C. Genetic characterization of *vanG* genes, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 44: 3224 – 3228, 2000.

McMURRY, L. M., PARK, B. H., BURDETT, V. & LEVY S. B. Energy-dependent efflux mediated by class L (TetL) tetracycline resistance determinant from streptococci. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 31: 1641 – 1650, 1987.

MANNU, L., PABA, A., DAGA, E., COMUNIAN, R., ZANNETTI, S., DUPRE, I. & SECHI, L. A. 2003. Comparison of incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy animal and clinical origin. **Int. J. Food Microbiol.**, 88: 291 – 304, 2003.

MARQUES, E. B. & SUZART, S. Occurrence of virulence-associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina Brazil. **J. Med. Microbiol.**, 53: 1069 – 1073, 2004.

MARTINEZ-MURCIA, A. J. & COLLINS, M. D. *Enterococcus sulfureus*, a new yellow pigmented *Enterococcus* species. **FEMS Microbiol. Lett.**, 80: 69 – 74, 1991.

MERQUIOR, V. L. C., NETZ, D. J. A., CAMELLO, T. C. F. & TEIXEIRA, L. M. Characterization of enterococci strains isolated from nosocomial and community infections in Brazil. **Adv. Exp. Med.**, 418: 281 – 283, 1997.

MERQUIOR, V. L. C., PERALTA, J. M., FACKLAM, R. R. & TEIXEIRA, L. M.. Analysis of electrophoretic whole-cell protein profiles as a tool for characterization of *Enterococcus* species. **Cur. Microbiol.**, 28:149-153, 1994.

MOELLERING Jr., R. C. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. **Clin. Infect. Dis.**, 14: 1173 – 1178, 1992.

MONDINO, S. S. B., CASTRO, A. C. D., MONDINO, P. J. J., CARVALHO, M. G. S., SILVA, K. M. F. & TEIXEIRA, L. M. Phenotypic and genotypic characterization of clinical and intestinal enterococci isolated from inpatients and outpatients in two Brazilian hospitals . **Microb. Drug Resist.**, 9(2), 167 – 174, 2003 .

MORRISON, D., WOODFORD, N. & COOKSON, B. Enterococci as emerging pathogens of humans. **J. Appl. Microbiol. Symp.**, Suppl., 83: 89S – 99S, 1997.

MUNDY, L. M., SAHN., D. F. & GILMORE, M. S. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance in enterococci. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, 9: 90 – 102, 2000.

MURRAY, B. E. Diversity among multidrug-resistant enterococci. **Emerg. Infect. Dis.**, 4: 37 – 47, 1998.

MURRAY, B.E. The life and times of *Enterococcus*. **Clin. Microbiol.**, 3: 46 – 65, 1990.

NALLAPAREDDY, S. R., SINGH, K. U., DUH, R-W., WEINSTOCK, G. M. & MURRAY, B. E. Diversity of *ace*, a gene encoding a microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules, from different strains of *Enterococcus faecalis* and evidence for production of *Ace* during human infections. **Infect. Immun.**, 68: 5210 – 5217, 2000.

NAUCHUERTZ, W. F., TREVINO, S. B., HARRISON, L. S., LONGFIELD, R. N., FLETCHER, L. & WORTHAM, W. G. *Enterococcus casseliflavus* as an agent of nosocomial bloodstream infections. **Med. Microbiol. Lett.**, 2: 102 – 108, 1993.

NG, L-K, MARTIN, I., ALFA, M. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. **Mol. Cel. Probes**, 15: 209 – 215, 2001.

O'SULLIVAN, M. G., THORNTON, G., O'SULLIVAN, G. C. & COLLINS, J. K. Probiotic Bacteria: Myth or reality? **Trends Food Sci. Technol.**, 3: 309 – 314, 1992.

OKAMOTO, T.T., AKAISE, M., TANASE, S., HORIE, H., MIYAJIMA, S., ANDO, M., ICHINOSE, Y. & MAEDA, H. Activation of human matrix metalloproteinases by various bacteria proteinases. **J. Biol. Chem.**, 272: 6059 – 6066, 1997.

PERL, M. T. The threat of vancomycin resistance. **Am. J. Med.**, 106 (SA), 26S – 37S, 1999.

PATTERSON, J. E., SWEENEY, A. H., SIMMS, M., CARLEY, N., MANGI, R., SALETTA, J. & LYONS, R. W. 1995. **Analysis Medicine**, 74: 191 – 200, 1995.

PATTERSON, J.E. & ZERVOS, M.J., High-level gentamicin resistance in *Enterococcus*. Microbiology, genetic basis and epidemiology. **Rev. Infect. Dis.**, 12: 644 – 652, 1990.

PEGUES, D. A., PEGUES, C. F., HIBBERD, P. L., FORD, D. S. & HOOPER, D. C. Emergence and dissemination of a high vancomycin-resistant vanA of *Enterococcus faecium* at a large teaching hospital. **J. Clin. Microbiol.** 35: 1569 – 1570.

PERICHON, B., REYNOLDS, P. & COURVALIN, P. Van-type glycopeptides-resistant *Enterococcus faecium* BM 4339. **Antimicrob. Agents Chemother.** 41: 2016 – 2018, 1997.

PERL, T. M. The threat of vancomycin resistance. **Am. J. Med.** 106 (5A), 26S-37, 1999.

PETERS, J., MAC, K., WILCHMANN-SCHAUER, H., KLEIN, G. & ELLERBROEK, L. Species distribution and antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from food of animal origin in Germany. **Int. J. Food Microbiol.**, 88: 311 – 314, 2003.

PHILLIPIS, I., CASEWELL, M., COX, T. et al. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. **J. Antimicrob. Chemother.**, 53: 28 -52, 2004.

POETA, P., COSTA, D., RODRIGUES, J. & TORRES, C. Antimicrobial resistance and the mechanisms implicated in faecal enterococci from healthy humans, poultry and pets in Portugal. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, 27: 131 – 137, 2006.

QUINTILIANI, R. & COURVALIN, P. Characterization of *Tn1547*, a composite transposon flanked by the *IS256-like* elements, that confers vancomycin resistance in *Enterococcus faecalis* BM 4281. **Gene**, 172 – 180, 1996.

REINHERT, R. R., CONRADS, G., SCHLAERGER, J. J., WERNER, G., WITT, W., SUTTICHEN, R. & KLARE, I. Survey of antibiotic resistance among enterococci in North Rhine-Westphalia, Germany. **J. Clin. Microbiol.**, 37: 1638 – 1641, 1999.

RICE, E. W., MESSER, J. W., JOHNSON, C. H. & REASONER, D. J. Occurrence of high-level aminoglycoside resistance in environmental isolates of enterococci. **Appl. Environ. Microbiol.**, 61: 374 – 376, 1995.

RIDENHOUR, M. B., FETCHER, H. M., MORTENSEN, J. E. & DANEO-MOORE, L. A novel tetracycline-resistant determinant, *tet(U)*, is encoded on the plasmid pKQ 10 in *Enterococcus faecium*. **Plasmid**, 35: 71 – 80, 1996.

RILEY, M. A. & WERTZ, J. E. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. 84: 357 – 364, 2002.

SALMINEN, S., ISOLAURI, F. & SALMINEN, E. Clinical uses of probiotics for stabilizing gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. **Antoine van Leeuwenhoek**. 70: 347 – 358, 1996.

SARANTINOPOULOS, P., ANDRIGHETTO, C., GEORGALAKI, M. O., REA, M. C., LOMBARDI, A., COGAN, T. M., KALNTZOPOULOS, G. & TSAKALIDOU, E. Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physiological and sensory characteristics of Greek Feta Cheese. **Int. J. Food Microbiol.**, 76: 93 – 105, 2002.

SARANTINOPOULOS, P., ANDRIGHETTO, C., GEORGALAKI, M. O., REA, M. C., LOMBARDI, A., COGAN, T. M., KALANTZOPOULOS, G. & TSAKALIDOU, E. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. **Int. Dairy.**, J11: 621 – 647, 2001.

SEMEDO, T., SANTOS, M. A., LOPES, M. F. S., MARQUES, J. J. F., CRESPO, M. T. B. & TENREIRO, R. Virulence factors in food, clinical and reference enterococci: A common trait in the genus? **System. Appl. Microbiol.**, 26: 13 – 22, 2003a.

SEMEDO, T., SANTOS, M. A. LOPES, M. F. S., MARQUES, J. J. F., TENREIRO, R. & CRESPO, M. T. B.. Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in enterococci. **J. Clin. Microbiol.**, 41: 2569 – 2576, 2003b.

SCHLEIFER, R. H. & KILPPER-BÄLZ, R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. Rev. as *Enterococcus faecalis* com. Nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 34: 31 -34,1984.

SCHOUTEN, M., HOOBKAMP-KORSTANJE, J., MEIS, J. & VOSS, A. Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Europe. **Europ. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, 19: 812 – 822, 2000.

SEPPÄLÄ, H., SKURNIK, M., SOINI, H., ROBERTS M.C. & HUOVINEN, P. A Novel Erythromycin resistance methylase gene (*ermTR*) in *Streptococcus pyogenes*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 42: 257 – 262, 1998.

SHANKAR, V., BAGHDAYAN, A. S. & GILMORE, M. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. **Nature.**, 417: 746 – 750, 2002.

SHANKAR, V., BAGHDAYAN, A. S., HUYKE, M. M., LINDAHAL, G. & GILMORE, M. S. Infection derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. **Infect. Imm.**, 67: 193 – 200, 1999.

SIMJEE, S. & Gill. M. G. Gene transfer, gentamycin resistance and enterococci. **J. Hosp. Infect.**, 36: 249 – 259, 1997.

SINGER, R. S. Antibiotic resistance – the interplay between antibiotic use in animals and human beings. **The Lancet Infect. Dis.**, 3: 47, 2003.

STERN, C. S., CARVALHO, M. G. S. & TEIXEIRA, L. M. Characterization of enterococci isolated from humans and nonhuman sources in Brazil. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, 20: 61–67, 1994.

STILES, M. Safety aspects of enterococci from food point of view. Symposium on Enterococci in foods-functional and safety aspects. **Abstract Book.**, 30 – 31 May, 2002..

SUTCLIFFE, J., GREBE, T., TAIT-KAMRADT, A. & WONDRACK, L. Detection of Erythromycin-resistant determinants by PCR. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 40: 2562 – 2566, 1996b.

SUZZI, G., LOMBARDI, A., LANORTE, M. T., CARUSO, M., ANDRIGHETTO, C. & GARDINI, F. Characterization of autochthonous enterococci isolated from Semicotto Caprino Cheese, a traditional cheese produced in Southern Italy. **J. Appl. Microbiol.**, 89: 267 – 274, 2000.

STRAUT, M., CESPIDIS, G. & HORAUD, T. Plasmid-borne high-level resistance to gentamycin in *Enterococcus hirae*, *Enterococcus avium*, and *Enterococcus raffinosus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 40: 1263 – 1265, 1996.

TAVARES, W. Problem Gram-positive bacteria: resistance in staphylococci, enterococci, and pneumococci to antimicrobial drugs. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 33 (3), 1 – 35, 2000.

TAYLOR, D. E., HIRATSUKA, K., RAY, H. & MANAVATHU, E. K. Characterization and expression of a cloned tetracycline resistance determinant from *Campylobacter jejuni* plasmid pUA466. **J. Bacteriol.**, 16: 2984 – 2989, 1987.

TEIXEIRA, L. M., CARVALHO, G.M.S & FACKLAM, R. R. *Enterococcus*. P.430 – 442. In: Murray, P. R., Baron, J. E., Jorgensen, J. H., Landry, L. M. & Pfaller, M. A. (Eds.) **Manual of Clinical Microbiology**, 9 ed., v.1, American Society for Microbiology, Washington, DC, 2007.

TENOVER, F. C., ARBEIT, R. D., GOERING, R. V., MICKELSEN, P. A., MURRAY, B. E., PERSING, D. H. & SWAMINATHAM, B. Interpreting chromosomal DNA electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J. Clin. Microbiol.**, 33: 2233 – 2239, 1995.

TIECCO, G. Microbiologia degli alimenti di origine animale. Edagricole – **Edizione Agricole**, Bologna, 51 – 87, 1992.

TOLEDO-ARANA, A., VALLE, J., SOLANO, C., ARRIZUBIETA, M. J., CUCARELLA, C., LAMATA, M., AMORENA, B., LEIVA, J., PENEDES, J. R. & LASA, I. The enterococcal surface protein, *esp*, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. **Appl. Environ. Microbiol.**, 67: 4538 – 4545, 2001.

TURNIDGE, J. Antibiotic use in animals-prejudices, perceptions and realities. **J. Antimicrob. Chemother.**, 53: 26 – 27, 2004.

TURTURA, G. C. & LORENZELLI, P. Gram – positive cocci isolated from slaughtered poultry. **Microbiol. Res.**, 149: 203 – 213, 1994.

TYRREL, G. J., TURNBULL, L. A., TEIXEIRA, L. M., LEFBVRE, J., CARVALHO, M. G. S., FACKLAM, R. R. & LOVGREM, M. *Enterococcus gilvus* sp. Nov. and *Enterococcus pallens* sp. Nov. isolated from human Clinical specimens. **J. Clin. Microbiol.**, 40, (4), 1140 – 1145, 2002.

ULRICH, A. & MÜLLER, T. Heterogeneity of plant associated streptococci as characterized by phenotypic and restriction analyses of PCR amplified 16S rRNA. **J. Applied Microbiol.**, 84: 293 – 303, 1998.

UTTLEY, A. H. C., GEORGE, R. C., NAIDOO, J., WOODFORD, N., JOHNSON, A. P., COLLINS, C. H., MORRISON, D., GILFILLAN, A. J., FITCH, L. E. & HEPTONSTALL, J. High-level vancomycin resistant enterococci causing hospital infections. **Epidemiol.**, 103: 173 – 181, 1988.

Van den BOGAARD, A. E., N. BRUINSMA & E. E. STOBBERING. The effect of banning avoparcin on VRE carriage in The Netherlands. **J. Antimicrob. Chemother.** 46: 146 -147. 2000.

VANKERCKHOVEN, V., VAN AUTGAERDEN, T., VAEL, C., LAMMENS, C., CHAPELLE, S., ROSSI, R., JABES, D. & GOOSSENS H. Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cyIA* and *hyl* genes in Enterococci and survey for virulence determinants among European Hospital isolates of *Enterococcus faecium*. **J. Clin. Microbiol.**, 42 (10), 4473 – 4479, 2004.

VAKULENKO, S. B., DONABEDIAN, S. M., VOSKRESENSKIY, A. M., ZERVOS, M. J., LERNER, S. A. & CHOW, J. W. Multiplex PCR for detection of aminoglycoside resistance genes in enterococci. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 47: 1423 – 1426, 2003.

VILLANI, F. & COPPOLA, S. Selection of enterococcal strains for water-buffalo Mozzarella cheese manufacture. **Ann. Microbiol. Enzimol.**, 44: 97 – 105, 105, 1994.

XAVIER, D. B., BERNAL, F. E. M. & TITZE-DE-ALMEIDA, R. Absence of vanA- and vanB-containing enterococci in poultry raised on nointensive production farms in Brazil. **Applied Environ. Microbiol.**, 72, (4), 3072 – 3073, 2006.

WARSA, U. C., NONOYAMA, M., IDA, T., OKAMOTO, R., OKUBO, T., SHIMAUCHI, C., KUGA, A. & INOUE, M. Detection of *tet(K)* and *tet M*) in *Staphylococcus aureus* of Asian countries by the polymerase chain reaction. **J. Antibiotics.**, 49: 1127 – 1132, 1996.

WEAVER, K. E., RICE, L. B. & CHURCHWARD, G. Plamids and transposons. In: Gilmore, M. S. ed. The enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance. Washington, DC: American Society for Microbiology, 219 – 265, 2002.

WEINSTEIN, M. P., MIRRET, S., KANNANGARA, S., MONAHAN, J., HARRELL, L. J., WILSON, A. C. & RELLER BARTH, J. Multicenter evaluation of use of penicillin and ampicillin as surrogates for in vitro testing as susceptibility as enterococci to imipenem. **J. Clin. Microbiol.**, 52, (8), 3747 – 3751, 2004.

WILKS, A., ANDERSEN, S. R. & LICHT, T. R. Characterization of transferable tetracycline resistance genes in *Enterococcus faecalis* isolated from food . **FEMS Microbiol.**, 243: 15 – 19, 2005.

WILLEY, B. M., MCGERR, A. S., OSTROWSKI, M. A., KREISWIRTH, B. N. & LOW, D. E. The use of molecular typing techniques in the epidemiologic investigation of resistant enterococci. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, 15: 548 – 556, 1994.

WILSON, W. R., WILLKWSKE, C. J., WRIGTH, A. J., SANDE, M. A. & GERACI, J. E. Treatment of streptomycin-sensible and streptomycin-resistant enterococcal endocardites. **Ann. Int. Med.**, 100: 816 – 823, 1984.

ZANELLA, R. C., VALDETARO, F., LOUNGREN, M., BOKERMANN, S., ALMEIDA, S. C. G., VIEIRA, V. S. D. & BRANDILEONE, M. C. C. First confirmed case of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* with vanA phenotype from Brazil: isolation from a meningitis case in São Paulo. **Microb. Drug Res.**, 2: 159 -162, 1999.

ZERVOS, M. J., DEMBINSKI, S.; MIKESELL, T., SCHABERG, D. R.. High-level resistance to gentamycin in *Streptococcus faecalis*: risk factors and evidence for exogenous acquisition of infection. **J. Infect. Dis.**, 153: 1075 -1083, 1986.