

Érica Miranda Damasio Scheidegger

**IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *ENTEROCOCCUS* ISOLADAS DE QUEIJO
MINAS TIPO FRESCAL ATRAVÉS DA ANÁLISE DO POLIMORFISMO DOS
FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO DE PARTE DO GENE 16S rRNA
AMPLIFICADO PELA PCR**

**PPGVS
INCQS / FIOCRUZ
2009**

**IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *ENTEROCOCCUS* ISOLADAS DE QUEIJO
MINAS TIPO FRESCAL ATRAVÉS DA ANÁLISE DO POLIMORFISMO DOS
FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO DE PARTE DO GENE 16S rRNA
AMPLIFICADO PELA PCR**

Érica Miranda Damasio Scheidegger

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

Orientadora: Dra. Paola Cardarelli Leite, Ph.D

Rio de Janeiro
2009

**IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *ENTEROCOCCUS* ISOLADAS DE QUEIJO
MINAS TIPO FRESCAL ATRAVÉS DA ANÁLISE DO POLIMORFISMO DOS
FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO DE PARTE DO GENE 16S rRNA
AMPLIFICADO PELA PCR**

Érica Miranda Damasio Scheidegger

Dissertação 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 Mestre.

Aprovado:

_____(IMPPG/UFRJ)
Prof. Dr. Sérgio Eduardo Longo Fracalanza

_____(INCQS/Fiocruz)
Prof. Dr. Victor Augustus Marin

_____(INCQS/Fiocruz)
Prof. Dra. Maria Helena Simões Villas Bôas

Orientadora _____
Prof. Dra. Paola Cardarelli Leite

Rio de Janeiro
2009

Scheidegger, Érica Miranda Damasio

Identificação de espécies de *Enterococcus* isoladas de queijo Minas tipo frescal através da análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição de parte do gene 16 rRNA amplificado pela PCR. / Érica Miranda Damasio Scheidegger. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2009.

xv, 83 p., fig., tab.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2009. Orientadora: Paola Cardarelli Leite.

1. *Enterococcus* 2. Queijo Minas tipo frescal 3. Identificação 4. PCR-RFLP. I.
Título

Identification of *Enterococcus* spp. isolated from fresh Minas cheese by Restriction Fragment Length Polymorphism of the 16s rRNA gene fragment amplified by PCR.

A Deus seja dada toda a honra, a glória e o louvor.
Ao meu marido, Carlos, pela compreensão e carinho; aos meus pais, Mario e Clarita e meus irmãos pelo apoio constante.

**Que darei eu ao Senhor,
por todos os benefícios
que me tem feito?
Salmos116:12**

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus pela graça infinita, proteção e sustento em todos os momentos.

Ao meu papai e a minha mamãe por tudo que fizeram e fazem por mim. Amo vocês!

Ao meu esposo Carlos pelo apoio, carinho, paciência e compreensão. Obrigado por tudo!

Aos meus irmãos, sogro e sogra, cunhados e cunhadas, sobrinhos e parentes pelo incentivo.

À minha orientadora, Paola Cardarelli Leite, pela inestimável orientação, pela confiança pela atenção e apoio constante.

À amiga especial que fiz durante meus dias no INCQS, Renata Trotta. Obrigada maninha!

A Suely Fracalanza pelos conhecimentos transmitidos e pela colaboração nos experimentos.

A Maria Regina Branquinho, pelo carinho e apoio constante.

A Marília Martins Nishikawa sempre disponível para ajudar e contribuir. Muito obrigada!

À amiga Patrícia Faria, pelo companheirismo e amizade durante o tempo de INCQS. Estagiária exemplar!

A Samara Custódio, pela amizade sincera, incentivo e convívio durante todo tempo de estudo.

À professora Maria Conceição de Oliveira Viana, pela revisão desta dissertação.

Aos colegas de turma, em especial Carla Rosa.

Ao INCQS / FIOCRUZ pela oportunidade de estudo e pela bolsa concedida.

Ao casal de amigos Rubens e Natália Dias, pela credibilidade.

À professora Lucia Martins Teixeira IMPPG/UFRJ, pela doação das cepas de referência e valiosa avaliação deste projeto.

À Dra. Celia Romão, chefe do Depto. de Microbiologia e a todos do Setor de Culturas de Referências, Laboratório de Fungos, Setor de Saneantes, Setor de Microbiologia de Alimentos e ao Setor de Biologia Molecular do Departamento de Microbiologia por todo o apoio na infra-estrutura para a realização da parte prática deste trabalho.

Em especial aos setores de Preparação de Meio de Cultura e de Esterilização de Vidrarias pelo auxílio, pela disponibilidade e pela amizade.

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

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

RESUMO

O gênero *Enterococcus* inclui aproximadamente 30 espécies, algumas das quais muito freqüentemente envolvidas com alimentos e ambientes relacionados, e cuja diferenciação com identificação precisa torna-se muitas vezes problemático, quando estas questões baseiam-se apenas em características fenotípicas que, mesmo assim, permitem separar estes microrganismos em cinco grupos fisiologicamente diferentes. A dificuldade para categorizar inequivocamente as espécies dos enterococos com base somente nas características bioquímicas pode estar relacionado com uma heterogeneidade bastante alta dos aspectos fenotípicos, independentemente da origem dos isolados, devendo ainda ser considerado o fato de haver bastante similaridade das exigências nutricionais entre os enterococos e outras bactérias ácido lácticas. Por estas razões as técnicas moleculares tornaram-se um importante instrumento para caracterização destes microrganismos. Dentre estas, aquelas que se baseiam no uso do 16S rRNA como molécula alvo têm sido consideradas como excelentes opções com propósitos de identificação. A técnica PCR/RFLP fundamenta-se em uma metodologia baseada na amplificação por PCR e nos perfis de restrição obtidos após o uso de enzimas selecionadas com base na sua habilidade de revelar polimorfismo nos fragmentos de DNA ou RNA analisados. Este trabalho tem como objetivo implantar a técnica da PCR/RFLP com as enzimas *DdeI*, *HaeIII* e *HinfI* associada a alguns testes bioquímicos para uma identificação de *Enterococcus* spp. isolados de amostras de queijo Minas tipo frescal. Vinte e uma espécies de referência do gênero *Enterococcus* foram utilizadas para o estabelecimento dos perfis de restrição. Cinquenta e quatro isolados de leite e frango que apresentaram perfis fenotípicos típicos, atípicos e alguns sem identificação quanto à espécie estocados em nosso laboratório foram utilizados para testar a técnica desenvolvida e 21 isolados provenientes do queijo Minas tipo frescal foram utilizados para confirmar a utilidade da técnica. Ao utilizarmos a técnica PCR/RFLP obtivemos 5 perfis de restrição diferentes e, quando associados alguns testes bioquímicos, foi possível obter uma identificação rápida e precisa da maioria das espécies de *Enterococcus*.

ABSTRACT

The genus *Enterococcus* includes about 30 species, some of them very often involved with food and related environments, and whose differentiation with precise identification often becomes problematic when based only on phenotypic characteristics. Anyway this techniques allow to separate these microorganisms in five groups physiologically different. Enterococci are often difficult to clearly categorize in species based only on these phenotypic characteristics. In addition to having a very high diversity of phenotypic aspects, regardless of the origin of the isolates, it must to be considered that there are enough similarities between the nutritional requirements of enterococci and other lactic acid bacteria. For these reasons the molecular techniques have become important tools for characterizing these microorganisms. Among these, those that are based on the use of 16S rRNA as a target molecule have been considered as excellent options for any identification. PCR/RFLP is a method based on the PCR amplification and on the restriction profiles obtained by using restriction enzymes selected based on their ability to reveal polymorphism in fragments of DNA or RNA analysed. This work aims to introduce the technique of PCR/RFLP with the enzymes *Ddel*, *HaeIII* and *HinfI* associated with certain biochemical tests for identification of *Enterococcus* spp. isolated from samples of fresh Minas cheese. Twenty-one reference strains of the genus *Enterococcus* were used to establish the restriction profiles. Fifty-four isolates from milk and chicken that had phenotypic profiles typical, atypical and without some identification, stocked in our laboratory, were used to test the technique developed, and 21 isolates from the fresh Minas cheese were used to confirm the usefulness of the technique. By using the PCR/RFLP we obtained 5 different restriction profiles and, when associated with some biochemical tests, it was possible to obtain a rapid and accurate identification of most species of *Enterococcus*.

LISTA DE ABREVIATURAS

- BAL – Bactérias ácido lácticas
- BHI – Caldo BHI (Brain Heart Infusion)
- DNA – Ácido desoxiribonucleico
- FDA – “Food and Drug Administration”
- HIB – Caldo infusão de coração
- INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
- LAP – L-leucina- β -naftilamida
- MGP – Metil- α -glicopiranosídeo
- MMA – “Motility Medium Agar”
- NaCl – Cloreto de Sódio
- PCR – Reação em cadeia pela polimerase (PCR)
- PYR – L-pirrolidonil- β -naftilamida
- PYRase – Pirrolidoniarilamidase
- RNA – Ácido ribonucleico
- SDS-PAGE – Sodium Dodecil Sulphate – Polyacrilamide Gel Electrophoresis
(Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS - Análise dos perfis de proteínas totais)
- Taq* – Enzima DNA polimerase termoestável
- VREs – “Vancomycin-Resistant Enterococcus”
- UV - Luz ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Foto ilustrativa de gel de agarose exemplificando os produtos da PCR para identificação do gênero *Enterococcus* e da espécie *E. faecalis* obtidos a partir dos isolados dos queijos Minas tipo frescal47
- Figura 2:** Foto ilustrativa da amplificação pela PCR do gene *ddl_{E. faecium}* específico para a identificação de *E. faecium*.....48
- Figura 3:** Foto ilustrativa do gel da amplificação pela PCR espécie - específica dos genes de *E. gallinarum* (VanC1), 822 pb e *E. casseliflavus* (VanC2 – VanC3), 439 pb49
- Figura 4:** Foto ilustrativa de gel de agarose com a presença de produto de amplificação de 275 pb obtido pela PCR do 16S rRNA.....50
- Figura 5:** Foto ilustrativa dos géis de agarose obtidos após a PCR/RFLP representando os 5 diferentes grupos (A a E) obtidos por digestão do fragmento amplificado a partir do gene 16S rRNA de enterococos com as enzimas de restrição *Ddel*, *HaeIII* e *HinI*.....53
- Figura 6:** Utilização da PCR/RFLP aliada a alguns testes bioquímicos para diferenciação de espécies de enterococos.....56
- Figura 7:** Mapa de restrição obtido a partir de algumas sequências de enterococos depositadas no genBank representando os grupos PCR/RFLP..... 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Esquema de identificação de enterococos proposto por Teixeira e Facklam	31
Tabela 2: Descrição das amostras analisadas de Queijo Minas tipo frescal.....	41
Tabela 3: Resultados obtidos com os isolados bacterianos oriundos das amostras de queijo Minas tipo frescal após a utilização dos testes presuntivos para identificação do gênero <i>Enterococcus</i>	43
Tabela 4: Resultados obtidos para os isolados bacterianos oriundos de queijo Minas tipo frescal após caracterização fenotípica das espécies de <i>Enterococcus</i>	44
Tabela 5: Grupos de PCR/RFLP estabelecidos após a digestão das cepas de referências com as enzimas de restrição, onde pode ser observado o número de fragmentos obtidos em cada grupo.....	54
Tabela 6: Resultado da PCR/RFLP dos isolados (Coleção de amostras) do Setor de Biologia Molecular /INCQS.....	57
Tabela 7: Resultado da PCR/RFLP nos isolados bacterianos obtidos de queijo Minas tipo frescal.....	58
Tabela 8: Tamanho dos fragmentos (em pb) obtidos após a digestão das enzimas de restrição.....	65

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Propriedades dos enterococos.....	2
1.2. Habitat	3
1.3. Termotolerância.....	3
1.4. Patogenicidade	4
1.5. Presença de enterococos em alimentos	6
1.6. Queijo Minas tipo frescal.....	9
1.7 Resistência bacteriana.....	12
1. 8 Identificação.....	15
1. 9 Outros tipos de identificação.....	16
1.9.1 PCR (Reação Polimerase em Cadeia).....	19
1.9.2. Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição(RFLP).....	20
2. OBJETIVOS	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1. Coleta das amostras.....	24
3.2. Preparo das amostras de queijo Minas tipo frescal.....	25
3.3. Isolamento de <i>Enterococcus</i> spp.....	25
3.4. Identificação presuntiva de <i>Enterococcus</i> spp.....	26
3.4.1. Caracterização morfo -tintoriais.....	26
3.4.2. Produção de enzima catalase.....	26
3.4.3. Hidrólise da esculina na presença de bile.....	27
3.4.4. Hidrólise da L-Pirrolidonil- β -Naftilamida(PYR) e da Leucina- β -Naftilamida(LAP).....	27
3.4.5.Crescimento em presença de NaCl 6,5%.....	27
3.4.6.Atividade hemolítica.....	28
3.5. Preservação dos isolados bacterianos.....	28
3.6. Identificação de <i>Enterococcus</i> spp. por testes bioquímicos.....	28
3.6.1. Produção de pigmento.....	29
3.6.2 Hidrólise da Arginina.....	29

3.6.3. Motilidade.....	29
3.6.4. Tolerância ao telurito de potássio.....	29
3.6.5. Utilização do piruvato de sódio.....	29
3.6.6. Utilização de carboidratos.....	30
3.7. Caracterização Molecular através de técnicas da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	32
3.7.1. Extração do DNA total dos enterococos.....	32
3.7.1.1. Lise das células.....	32
3.7.1.2. Tratamento com RNase.....	32
3.7.1.3. Precipitação de proteínas.....	32
3.7.1.4. Obtenção do DNA purificado.....	33
3.7.2. Detecção do gênero <i>Enterococcus</i>	33
3.7.3. Detecção de <i>E. faecalis</i>	34
3.7.4. Detecção de <i>E. faecium</i>	34
3.7.5. Detecção de <i>E. casseliflavus</i> e <i>E. gallinarum</i>	35
3.7.6. Análise do 16S rRNA por PCR/RFLP.....	36
3.7.6.1. Tratamento com Endonucleases de restrição.....	37
3.7.6.2. Visualização dos produtos amplificados e digeridos em gel de agarose....	37
3.8. Análise das sequências de DNA das espécies de <i>Enterococcus</i> estudadas, depositadas no GenBank.....	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1. Isolamento de <i>Enterococcus</i> spp do queijo Minas tipo frescal.....	41
4.2. Identificação do gênero.....	42
4.3. Caracterização fenotípica das espécies de <i>Enterococcus</i>	44
4.4. Caracterização molecular.....	46
4.4.1. Caracterização de gênero através de técnicas de PCR.....	46
4.4.2. Caracterização das espécies de enterococos por PCR espécie-específica.....	46
4.4.2.1. Caracterização da espécie <i>E. faecalis</i>	46
4.4.2.2. Caracterização da espécie <i>E. faecium</i>	47
4.4.2.3. Caracterização da espécie <i>E. casseliflavus</i> e <i>E. gallinarum</i>	48

4.4.3. Padronização da técnica da PCR/RFLP	49
4.4.3.1. Amplificação do gene do 16S rRNA por PCR.....	50
4.4.3.2. Número de fragmentos obtidos após digestão do DNA das cepas de referência com as endonucleases de restrição.....	51
4.4.3.3. Resultado da técnica PCR/RFLP associados aos testes bioquímicos com os isolados bacterianos da coleção de enterococos do laboratório de Biologia Molecular.....	54
4.5. Aplicação da técnica PCR/RFLP associada a testes bioquímicos com os isolados do queijo Minas tipo frescal.....	57
4.6. Análise das sequências de DNA das espécies de <i>Enterococcus</i> estudadas depositadas no GenBank.....	59
5. CONCLUSÃO.....	67
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. PROPRIEDADES DOS ENTEROCOCOS

A aplicação de técnicas modernas de classificação envolvendo experimentos de hibridização (DNA/DNA e DNA/RNA) resultou na transferência de alguns membros da bactéria do gênero *Streptococcus*, pertencentes ao grupo D de Lancefield, para um novo gênero denominado de *Enterococcus* (SCHLEIFER & KILPPER - BÄLZ, 1984).

Os componentes deste gênero são referidos como cocos Gram-positivos, que geralmente se dispõem isolados, aos pares ou em cadeias curtas. São anaeróbios facultativos, crescem bem a temperatura de 35°C, sendo que a maioria das cepas apresentam capacidade de multiplicação entre 10°C e 45 °C. Eles também podem ser cultivados na presença de altas concentrações de Cloreto de sódio (DOMIG, MAYER e KNEIFEL, 2003 ; TEIXEIRA & FACKLAM.,2003).

Estes microrganismos hidrolisam a esculina em presença de alta concentração de bile. O produto da hidrólise da esculina reagidos com íons ferro presentes no meio de cultura levam à formação de esculetina evidenciada pela presença de halos escuros ao redor das colônias de enterococos (DOMIG, MAYER e KNEIFEL, 2003).

As características descritas acima podem ser utilizadas para distinguir enterococos de outros cocos Gram-positivos, catalase negativo, bem como são necessários alguns testes fenotípicos para diferenciar as espécies de enterococos (FACKLAM, SAHM & TEIXEIRA, 1999).

Esses microrganismos são perfeitamente adaptados à definição geral de bactérias ácido-lácticas (BAL) (KONEMAN et al., 2001), que são classificadas de acordo com suas características fisiológicas, morfológicas, bioquímicas e com suas propriedades funcionais. Elas produzem ácido láctico, possuem tolerância ao oxigênio e a diferentes concentrações de cloreto de sódio, são capazes de produzir compostos aromáticos e voláteis, podem produzir bacteriocina (SIMPSON & TAGUCHI,1995).

1.2. HABITAT

O gênero *Enterococcus* pertence a um grupo de bactérias heterogêneas que inclui mais de trinta espécies, dentre as quais destacamos *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* as mais freqüentemente encontradas em alimentos embora outras espécies como *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae* e *Enterococcus gallinarum* sejam também isoladas, mas com menor freqüência (TEIXEIRA et al., 2007; PANGALLO et al., 2008).

Os enterococos são residentes naturais do trato gastro-intestinal dos seres humanos e animais e muitas espécies são encontradas também no solo, água, plantas, vegetais, pássaros e insetos (GIRAFFA, 2002; TEIXEIRA & FACKLAM, 2003) sendo consideradas, como as bactérias mais comuns encontradas no meio ambiente (KUHN et al., 2000).

São consideradas bactérias autóctones e uma vez liberadas no meio ambiente, são capazes de colonizar diversos nichos, pois possuem excepcional capacidade de resistir e se multiplicar em condições ambientais hostis, com grande potencial para contaminar águas e alimentos. (IVERSEN et al., 2002). Por sua natureza ubíqua, é comum o isolamento deste microrganismo em uma ampla variedade de alimentos (CHINGWARU et al., 2003).

O interesse sobre os enterococos tem aumentado nas últimas décadas, principalmente por algumas de suas características marcantes: são considerados patógenos oportunistas, especialmente em hospedeiros imunocomprometidos, estão envolvidos com resistência aos antimicrobianos de uso clínico, entretanto podem ser utilizados, quando adicionados intencionalmente, como probióticos eficazes em alimentos e medicamentos, bem como amostras iniciadoras em processos de fermentação de alguns tipos de alimentos (PANGALLO et al., 2008).

1.3. TERMOTOLERÂNCIA

Os enterococos são considerados entre as bactérias não-esporuladas mais termotolerantes conhecidas (GORDON & AHMAD, 1991; FRANZ, HOLZAPFEL & STILES, 1999). O *E. faecium*, por exemplo, são capazes de sobreviver ao aquecimento a 65°C durante 30 minutos, 71°C durante 10 minutos e 80°C durante

3 minutos (KEARNS, FREEMAN & LIGHTFOOT, 1995) e, como consequência desta característica é muito importante para a indústria de alimentos, pois pode resistir aos processos de conservação como cozimento, pasteurização e fermentação. Além disto, é capaz de tolerar altas concentrações de cloreto de sódio, nitrito e crescer em temperatura de refrigeração (4°C – 8°C) (TEUBER et al., 1996; FRANZ, HOLZAPFEL & STILES, 1999 ; HOEBEN, 2003).

1.4. PATOGENICIDADE

A incidência das infecções causadas pelos enterococos, sua gravidade e o aumento das dificuldades para o tratamento das infecções devido à resistência múltipla aos antibióticos colocam estes microrganismos entre os mais importantes patógenos oportunistas humanos (JORDENS, BATES & GRIFFITHS, 1994; GORDTS et al., 1995).

Esses microrganismos não possuem os potentes fatores de virulência encontrados em outras bactérias Gram-positivas patogênicas, mas possuem importantes características diferenciais, que contribuem para sua virulência e os tornam efetivos patógenos oportunistas (GIRAFFA, 2002). Embora sejam microrganismos de baixa virulência, eles conseguem atravessar o trato gastrointestinal intacto e disseminam para outros órgãos (JETT et al., 1994).

Os enterococos, sobretudo as espécies *E. faecium* e *E. faecalis*, são consideradas como importantes patógenos oportunistas, ou seja, são microrganismos membros da microbiota normal que não provocam doenças em circunstâncias normais, mas sim, quando são introduzidos em locais não protegidos devidamente pelo sistema imunológico (MURRAY et al., 2004).

As infecções normalmente ocorrem nos ambientes nosocomiais, em pessoas debilitadas, com alguma doença de base, que tenham recebido tratamento com antimicrobianos de largo espectro ou que tenham sido submetidos a intervenções cirúrgicas. (VANCANNEYT et al., 2002).

Quando introduzidos em ambientes nosocomiais, os enterococos apresentam grande capacidade de disseminação, atingindo vários setores e criando um perfil de endemicidade próprio tornando difíceis as tentativas de erradicação posterior (MORRIS et al., 1995).

E. faecalis é a espécie 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 (MURRAY, 1990 ; MUNDY et al., 2000). Outras espécies de menor freqüência como *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus raffinosus*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae* e *Enterococcus mundtii* são mais raramente identificadas em infecções humanas e geralmente estão envolvidas em surtos específicos (JETT et al., 1994; PATTERSON et al., 1995).

De várias partes do mundo são relatados infecções nosocomiais envolvendo amostras de enterococos apresentando resistência simultânea a vários antimicrobianos de uso terapêutico constituindo sérios problemas para os médicos. Nestas circunstâncias as infecções por enterococos se revestem de grande preocupação levando-se principalmente em consideração que estes microrganismos possuem resistência tanto intrínseca como adquirida aos antimicrobianos (PANGALLO et al., 2008).

O principal reservatório humano de enterococos é o trato gastrointestinal, porém eles podem ser encontrados, embora em menor freqüência, na cavidade oral, vesícula biliar, vagina e uretra masculina (KONEMAN et al., 2001). Nos Estados Unidos, os enterococos tornaram-se o segundo microrganismo mais freqüentemente isolado do trato urinário e de feridas cirurgicas e ainda a terceira causa mais comum de bacteremias nosocomiais (MURRAY et al., 2004).

A preocupação entre os pesquisadores é saber se os enterococos possuidores de marcadores de resistência simultânea aos antimicrobianos e de marcadores de virulência podem ser transmitidos através dos alimentos e serem responsáveis por quadros graves nos ambientes hospitalares. A ênfase, no momento, se volta para os enterococos resistentes à vancomicina (VREs), que representam sérios problemas para a Vigilância Sanitária, por ser um dos principais patógenos responsáveis pelas infecções hospitalares, atualmente com presença notável para as infecções urinárias, infecções em sítios cirúrgicos e bacteremias (GOLD, 2001).

O aumento da severidade das infecções causadas por este microrganismo pode estar relacionada ao uso indiscriminado de antibióticos nos ambientes

nosocomiais, e este fato favorece sua persistência e disseminação deste microrganismo. Sabe-se ainda que os enterococos apresentam alta capacidade para adquirir e transferir genes de resistência a antibióticos de uso clínico (VANCANNEYT et al., 2002).

Algumas medidas devem ser tomadas para diminuir a disseminação em ambientes hospitalares. Essas medidas consistem basicamente em precauções como barreiras e orientações quanto ao uso de antimicrobianos, visando à redução no uso principalmente de vancomicina, cefalosporinas e drogas anaerobicidas, como carbapenens, metronidazol e clindamicina (FURTADO et al., 2005).

Por possuírem propriedades que os definem como bactérias ácido-lácticas, esses microrganismos são utilizados com sucesso na tecnologia de produção de alimentos. Existe, porém, a necessidade de uma correta identificação antes da aplicação de cepas específicas na tecnologia de produção (EATON et al., 2001). É necessária, principalmente, a observação das características fisiológicas e comportamentais das cepas que serão utilizadas, como, por exemplo, seu perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e a ausência de marcadores de virulência (KLEIN et al., 2003).

Sua multi-resistência a antibióticos e a falta de conhecimento sobre seus fatores de virulência acabam produzindo certa insegurança no uso destes microrganismos na produção de alimentos, cuja presença acaba representando um risco à saúde do consumido, gerando um problema para a Vigilância Sanitária (GIRAFFA, 2002; MANNU et al., 2003).

Pelos fatos acima citados a presença dos enterococos nos alimentos, torna-se um assunto de grande importância em Vigilância Sanitária, levando à necessidade de se definir um conjunto de ações capazes de prevenir, e reduzir ao máximo esses riscos à saúde (BRASIL, 1990).

1.5. PRESENÇA DE ENTEROCOCOS EM ALIMENTOS

Os enterococos podem ser utilizados nas indústrias alimentícias como culturas iniciadoras dos processos fermentativos ou como probióticos. Devido a sua tolerância a altas concentrações de sal e ácido, eles são utilizados em

determinados grupos de alimentos onde são responsáveis pela formação de sabores únicos (GOMES et al, 2008).

Estes microrganismos são freqüentemente isolados de salsichas fermentadas, queijos, leite e derivados (MANNU et al., 2003).

Entre os produtos de laticínios, os enterococos podem estar envolvidos não somente no processo primário de fermentação como também fazendo parte secundariamente da microbiota contaminante não iniciadora (LEDDA et al., 1994).

Em 2002, Gelsomino e colaboradores afirmaram que os enterococos podem sobreviver e até mesmo se multiplicar em equipamentos e tanques de estocagem de laticínios, possibilitando assim a contaminação direta dos produtos.

Algumas cepas de enterococos associadas com produtos alimentares têm sido mencionadas como possuidoras de atividade biopreservadora, pois são inibidoras do processo deterioração do alimento, através da produção de bacteriocinas. As bacteriocinas dos enterococos são conhecidas como enterocinas que são peptídeos pequenos, hidrofóbicos e termoestáveis produzidas em especial pelas espécies *E. faecalis* e *E. faecium*, que também inibem o crescimento de bactérias patogênicas, como por exemplo, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium* sp. e *Bacillus* sp. (FRANZ, HOLZAPFEL & STILES,1999; SARANTINOPOULOS et al., 2002; GIRAFFA, 2003, THEPPANGNA et al., 2007). Essas bacteriocinas vêm despertando um grande interesse para o seu uso nas indústrias de alimentos como antibióticos naturais (DRIVER et al ., 2006).

A presença dos enterococos em alimentos é questionada, uma vez que pode ser responsável por muitas infecções nosocomiais. Durante a década passada, o gênero *Enterococcus* tornou-se um patógeno emergente, tanto nas infecções hospitalares, como nas adquiridas na comunidade (MORRISON, WOODFORD & COOKSON.,1997.; LOW et al., 2001).

Por muito tempo, os enterococos foram considerados bactérias comensais. Porém, o aumento da severidade das infecções nosocomiais causadas por enterococos multi-resistentes a antibióticos e a falta de conhecimento sobre seus fatores de virulência geraram insegurança na utilização dessas cepas na produção de alimentos. Ainda não é claramente definida a diferença entre um enterococo com potencial patogênico e uma cepa de enterococo seguro. Também não se

sabe qual a probabilidade de uma cepa aparentemente segura adquirir fatores de virulência (GOMES, 2007). Giraffa e colaboradores (2003) relataram a presença em alimentos de enterococos resistentes a antibióticos e portadores de genes de virulência.

É importante observar, porém, que a presença de enterococos no leite pode, muitas vezes, não estar relacionada à contaminação fecal direta. Certamente, estes microrganismos podem chegar à esta matriz diretamente pelo contato de fezes humanas ou de animais, mas também podem chegar indiretamente através de fontes contaminadas, tais como água utilizada no processamento, os equipamentos de ordenha e tanques de estocagem. (FRACALANZZA, 2007).

Em função de sua natureza psicotrófica, sua resistência ao calor e adaptabilidade a diferentes substratos e condições de crescimento, a contagem das células viáveis de enterococos pode aumentar durante a refrigeração e, algumas vezes, estas células podem sobreviver após a pasteurização (GIRAFFA, 2003).

Portanto, de alguma forma, os enterococos fazem parte da microflora, tanto do leite cru, como do pasteurizado, sendo que diferentes espécies podem ser encontradas em produtos de laticínios. Todavia, *E. faecalis* e *E. faecium* são as espécies mais freqüentemente isoladas para este tipo de alimento (FRANZ, HOLZAPFEL & STILES, 1999; GELSOMINO et al., 2001).

Amostras selecionadas de enterococos são utilizadas com sucesso como integrantes principais das composições iniciadoras de uma variedade de queijos artesanais (CASALTA & ZENNARO, 1997) e sua utilização no leite “in natura” como culturas iniciadoras, fazendo parte do composto termofílico de bactérias ácido-lácticas, é uma prática comum em tecnologia de produção de queijos (GIRAFFA & CARMINATI, 1997).

A emergência de amostras de enterococos resistentes a importantes antimicrobianos de uso terapêutico, inclusive aos glicopeptídeos, e a possibilidade de encontrar cepas com marcadores de virulência em alimentos tornam a presença desses microrganismos neste tipo de alimento um fato, no mínimo, questionável (GIRAFFA, 2003).

A segurança dos alimentos que contêm enterococos é um problema sério para as indústrias de alimentos e autoridades sanitárias, uma vez que, ora estes microrganismos são considerados úteis, ora são indesejáveis por seu potencial papel na deterioração e ainda podem carregar genes de resistência aos antibióticos, além de possíveis fatores de virulência, que constituem um risco à saúde humana (FRANZ, 2003).

Vale ressaltar que, em amostras de água, os enterococos são utilizados como indicadores de poluição fecal (TEJEDOR, 2001).

O Brasil é considerado como um dos países líderes em exportação de alimentos e, com isto, vários esforços institucionais têm sido realizados para garantir a segurança alimentar, como por exemplo, o programa nacional de monitoramento da prevalência e da resistência bacteriana de *Salmonella* e *Enterococcus* em carcaças de frango (PREBAF), coordenado pela Agência Nacional de Saúde - ANVISA (BRASIL, 2006). Esses programas são importantes para as avaliações de riscos, sendo hoje considerado como um pré-requisito para o comércio internacional de produtos alimentares (GOMES et al., 2008)

1.6. QUEIJO MINAS TIPO FRESCAL

O queijo Minas tipo frescal é um dos queijos mais populares do Brasil, sendo produzido em larga escala e consumido por grande parte da população. É um queijo para consumo imediato e de curta vida de prateleira, devendo ser comercializado logo após a sua fabricação (FURTADO et al., 2005).

Dentre os queijos consumidos no Brasil, o queijo Minas tipo frescal está em terceiro lugar, representando 9 % de consumo pela população nacional dos consumidores de queijo, perdendo apenas para os queijos do tipo mussarela, 33% e o prato, 24% (MARCHIORI, 2004).

De acordo com a Portaria nº352 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento (BRASIL, 1997), o queijo Minas tipo frescal é definido como um queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementadas ou não com bactérias lácticas específicas.

O queijo Minas tipo frescal apresenta vários pontos críticos durante a fabricação que podem conduzir a alterações no produto final. Dentre eles,

destacam-se a alta contaminação microbiológica da matéria-prima, a recontaminação do leite pós-pasteurizado e temperaturas inadequadas de fabricação e armazenamento (SANTOS, NOGUEIRA & CUNHA, 1995).

Quando este produto é fabricado de forma artesanal, por pessoas não treinadas, pode ocorrer a contaminação por diversos microrganismos, comprometendo tanto a sua qualidade como a segurança da saúde do consumidor. Por este motivo, as práticas higiênicas devem ser observadas com rigor, para prevenir uma possível contaminação ou recontaminação do produto (LOGUERCIO, 2001).

A segurança alimentar que deve ser obtida para este tipo de alimento inclui o conjunto de condições e medidas necessárias para garantir a segurança e salubridade dos produtos alimentares, incluindo a movimentação pelos consumidores a partir do momento em que os alimentos comprados em um ponto de venda até que seja preparado e consumido (DELGADO & TORRES., 2003).

O queijo Minas tipo frescal apresenta grande susceptibilidade a contaminações microbianas, que podem ocorrer a partir do leite utilizado como matéria-prima ou por contaminações cruzadas durante ou após o processamento. As contaminações, aliadas às alterações decorrentes, podem, em poucos dias, tornar o queijo inaceitável ou até mesmo impróprio para o consumo (ROCHA, BURITI & SAAD, 2006).

O surgimento de enterococos em queijos pasteurizados, na grande maioria das vezes, é devida à recontaminação, mas quando o fato ocorre antes do tratamento com calor e se mantém, está associado com a termo-tolerância deste microrganismo, sendo a presença em leite e derivados considerada como uma indicação de condições higiênico-sanitárias insuficientes durante a ordenha e/ou o processamento (GIRAFFA et al., 1997).

Estes microrganismos podem ainda, quando necessário, participar dos processos de produção e maturação de alguns tipos específicos de queijos, os quais vão possibilitar o desenvolvimento de aromas e sabores característicos (LEDDA et al., 1994).

E. faecalis, *E. faecium* e *E. durans* são as espécies mais freqüentemente encontradas em queijos (GELSOMINO et al., 2001).

A gravidade dos problemas que podem ser gerados pela presença dos enterococos neste tipo de alimento depende: da extensão da contaminação do leite, do tipo de queijo, da amostra iniciadora utilizada e ainda da tecnologia de produção aplicada, isto é, da capacidade de sobrevivência e crescimento dos microrganismos nas condições particulares da produção e no amadurecimento dos diferentes tipos de queijos (GIRAFFA, 2003).

Entretanto é importante destacar uma contribuição positiva, quando a presença de determinadas cepas de enterococos em alguns tipos de queijo atua no desenvolvimento de alguns componentes flavorizantes. Estes compostos típicos são aldeídos, acetoínas e diacetilas, que possuem atividades lipolíticas e proteolíticas importantes para o amadurecimento de determinados tipos de queijos, nos quais estes microrganismos são utilizados intencionalmente como amostras iniciadoras, sendo responsáveis pela transformação da lactose em ácido láctico durante a preparação do queijo (CENTENO et al., 1999; SARANTINOPOULOS et al., 2002 ; MANNU et al., 2003;).

Muitas vezes, enterococos que são isolados da própria microflora essencial do leite *in natura* podem ser utilizados como culturas iniciadoras na elaboração de tipos especiais de queijos como, por exemplo, queijo tipo Muzzarela, que é produzido por tecnologia tradicional, a partir de leite cru, bem como outros tipos de queijos como Manchego, Armada, Cebreiro, Feta, Serra, Venaco e Comté, cuja presença é considerada necessária, tanto para a produção como para o amadurecimento (VILLANI e COPPOLA, 1994).

Parece, portanto, haver evidências positivas da utilização de cepas específicas de enterococos em queijos.

Contudo, a presença dos enterococos nos queijos pode ser considerada benéfica ou não, e isto é bastante discutível, pois, uma vez presentes em altos níveis, estes microrganismos passam a ser considerados como iniciadores do processo de deterioração de algumas características organolépticas em determinados tipos de queijos, além de traduzirem condições higiênico-santárias insatisfatórias durante o processamento do produto (LOPEZ-DIAZ et al., 1995). Sendo assim há necessidade de determinar a sua origem no alimento (GELSOMINO, 2002).

A legislação em vigor sobre alimentos em nosso país é a RDC 12 de 02 de Janeiro de 2001, que estabelece o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos, preconiza que em queijos de alta umidade (em torno de 55%) incluindo os queijos coalho, minas frescal e outros, devem ser pesquisados os seguintes microrganismos: coliformes a 45°C (5×10^2 UFC/g), estafilococos coagulase positivo (5×10^2 UFC/g), *Salmonella* sp (ausência em 25g) e *Listeria monocytogenes* (ausência em 25g).

A Resolução RDC nº275 (ANVISA, 2005), estabelece o Regulamento Técnico de características microbiológicas para água mineral natural e água natural que inclui o gênero *Enterococcus*, juntamente com os coliformes termo-tolerantes, coliformes totais, *Pseudomonas aeruginosas* e *Clostrídios* sulfito-redutores. Esses microrganismos são utilizados como critério microbiológico na avaliação da qualidade microbiológica da água mineral.

Estudos realizados por pesquisadores demonstraram a presença de *Enterococcus* sp isolados de amostras de alimentos apresentando resistência aos principais antibióticos de uso terapêutico e também possuidores de marcadores de virulência (GELSOMINO et al., 2001, FRACALANZZA et al, 2007, GOMES et al, 2008).

Observa-se então a grande necessidade de uma maior vigilância sobre a epidemiologia destes microrganismos e também a necessidade da inclusão dos enterococos na legislação sobre alimentos uma vez que há grandes evidências de que eles podem ser transmitidos através cadeia alimentar.

1.7. RESISTÊNCIA BACTERIANA

O gênero *Enterococcus* apresenta resistência intrínseca a vários antimicrobianos e também progressiva resistência adquirida a antimicrobianos comumente utilizados para tratar infecções enterocócicas (ex. ampicilina, aminoglicosídeos) (ELIOPOULOS, 1998).

A resistência à vancomicina (MMWR, 2002) ocorre basicamente pela produção de precursores do peptidoglicano da parede celular que se ligam fracamente à vancomicina, impedindo assim sua ação no bloqueio da síntese da parede celular (LAI,1998).

A colonização ou infecção por enterococos resistentes à vancomicina (VRE) tem sido associada a uma variedade de fatores, incluindo tempo de internação hospitalar, doenças de base e particularmente entre indivíduos transplantados (BOYCE, 1997).

Pacientes colonizados por VRE carregam o microrganismo em sua flora intestinal e estes podem permanecer colonizados por períodos prolongados (até dois anos). A resistência à vancomicina pode ser caracterizada pela presença de cinco fenótipos diferentes (vanA a vanE) sendo que apenas o fenótipo vanC é intrinsecamente relacionado com duas espécies (*E. gallinarum* e *E. casseliflavus*), todos os outros são encontrados nas duas espécies principais (*E. faecalis* e *E. faecium*) (GOLD, 2001)

A preocupação maior está em saber se os VREs, originários dos ambientes hospitalares, podem ser disseminados para comunidade. Alguns autores afirmam que sim (KLARE et al., 1995; DAS, FRAISE e WISE, 1997), enquanto outros propõem o oposto, pois acreditam que as fontes externas de VREs podem ser de animais de fazenda, que são tratados com a avoparcina. Avoparcina é um glicopeptídeo, como a vancomicina, utilizado para promover crescimento rápido em frangos e porcos; possui estrutura química análoga à vancomicina, mas ainda não se têm conclusões explícitas sobre a direta relação entre o uso da avoparcina e os VREs (BONTEN, WILLEMS e WEISTEIN, 2001).

Chadwick e colaboradores (1996) isolaram VREs em amostras de carnes de bovinos, aves e suínos, sugerindo que os genes de resistência *vanA* podem ser introduzidos na comunidade via cadeia alimentar. Os VREs foram também isolados de produtos cárneos crus, em animais de fazenda sendo demonstrada também a presença de amostras com o mesmo padrão de ribotipagem em sangue e urina de diferentes pacientes hospitalizados (BATES et al., 1994). Estes achados sugeriram fortemente, que a transmissão por via cadeia alimentar ocorre, e em decorrência disto, a Alemanha e a Dinamarca baniram o uso da avoparcina (MORRISON, WOODFORD & COOKSON, 1997).

Nos Estados Unidos, há indícios de que a situação com respeito às infecções nosocomiais por VREs parece diferir consideravelmente da situação na Europa, onde a avoparcina não é licenciada para uso. Na América do Norte, há evidências de que os alimentos não estão envolvidos na transmissão destes

microrganismos da comunidade para os ambientes nosocomiais (MAC DONALD et al., 1997).

Outra questão importante a ser considerada é saber se os enterococos originários de diferentes fontes (alimentos, ambiental e comunidades) possuem igual potencial de patogenicidade e resistência aos antimicrobianos.

Através de ensaios de caracterização molecular para pesquisa dos marcadores de resistência aos antimicrobianos nos enterococos isolados de produtos cárneos processados e queijos, Teuber e colaboradores (1996) demonstraram haver similaridade e, algumas vezes, identidade entre certos determinantes de patogenicidade em amostras isoladas de alimentos e de espécimes clínicos.

Por outro lado, algumas investigações foram realizadas com o objetivo de observar a presença de potenciais fatores de virulência, particularmente as proteases, bem como determinar possíveis diferenças ou semelhanças nos padrões de resistência aos antibióticos em amostras de enterococos isoladas, tanto de portadores nas comunidades como em alimentos e a partir de materiais clínicos.

Arihara e colaboradores (1993) e também Giraffa (1995), descreveram o isolamento de amostras de enterococos a partir de produtos de laticínios que não produziam hemolisina, e sugeriram que a ausência de atividade hemolítica pode definir um critério a ser utilizado, quando da seleção de amostras iniciadoras utilizadas em derivados de leite. Entretanto acredita-se que a atividade hemolítica não está presente em muitas amostras de origem clínica e, portanto, a ausência desta atividade entre os enterococos isolados de alimentos não significa que a bactéria não seja virulenta e a associação destes microrganismos com alimentos, pode não ser considerada segura.

A terapia antimicrobiana para as infecções causadas por enterococos vem se complicando cada vez mais. Dessa forma, as infecções enterocócicas graves, como endocardites, são comumente tratadas com um agente que atue na parede celular (um betalactâmico, como a ampicilina, ou um glicopeptídeo, como a vancomicina) e um aminoglicosídeo (usualmente gentamicina ou estreptomicina). Esses agentes atuam sinergicamente para promover a ação bactericida. Entretanto, a resistência aos aminoglicosídeos, à ampicilina, à penicilina e à

vancomicina tem se tornado um problema cada vez maior, fato que reduziu o número de opções de tratamento das infecções enterocócicas graves (HORNER et al., 2005)

Algumas medidas devem ser tomadas para diminuir a disseminação deste microrganismo nos contatos em ambientes hospitalares. Essas medidas consistem basicamente em precauções de barreira e orientações quanto ao uso de antimicrobianos, visando a redução do uso indiscriminado particularmente de vancomicina, cefalosporinas e drogas anaerobicidas, como carbapenens, metronidazol e clindamicina (FURTADO et al., 2005).

1.8. IDENTIFICAÇÃO

O gênero *Enterococcus* inclui mais de 30 espécies, algumas das quais muito freqüentemente envolvidas com alimentos e ambientes relacionados, e cuja diferenciação com identificação precisa torna-se muitas vezes problemática, quando se baseiam apenas nas características fenotípicas que permitem separar estes microorganismos em cinco grupos fisiologicamente diferentes (FACKLAM e TEIXEIRA, 1997; TEIXEIRA, 2007).

A identificação completa destes microrganismos, quando recuperados de alimentos, constitui uma situação bastante complexa e o significado dos isolados variará de acordo com a fonte de isolamento. A identificação quanto à espécie é importante, para ajudar a traçar esquemas adequados para definir se a origem da contaminação 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 (KNUDTSON et al., 1993).

De acordo com Facklam e colaboradores (1999) a identificação presuntiva do gênero *Enterococcus* pode ser confirmada através dos resultados positivos dos testes da hidrolise do Pirrolidonil - β - Naftilamina (PYR) e da Leucina - β - Naftilamina (LAP), bem como do crescimento em presença de altas concentrações de cloreto de sódio (6,5%) e na temperatura de 45°C.

As propriedades fisiológicas das bactérias como, por exemplo, sua capacidade de degradar carboidratos, o metabolismo fermentativo (resultando na produção de ácido lático como produto principal da fermentação da glicose) e particularmente suas atividades enzimáticas, entre outras, têm sido tradicionalmente utilizadas com propósitos de identificação. E dentro destas premissas, a maioria das bactérias de importância clínica vem sendo isolada e identificada pelas técnicas convencionais (DOMIG, MAYER e KNEIFEL, 2003).

Entretanto, observou-se que entre os enterococos existe uma heterogeneidade muito alta entre os aspectos fenotípicos das cepas de origem ambiental (GIRAFFA, 1999). Essas cepas muitas vezes permanecem sem identificação quando esta se baseia apenas nos testes fenotípicos (GIRAFFA, 2003). Além disto, o fato de haver bastante similaridade nas exigências nutricionais entre os enterococos e outras bactérias ácido-láticas torna-se difícil a identificação inequívoca entre as espécies, baseada apenas nas características fenotípicas (DOMIG, MAYER e KNEIFEL, 2003).

O uso de métodos automatizados tem freqüentemente levado a falhas na identificação do gênero *Enterococcus* em laboratórios de microbiologia clínica, sendo os mais utilizados o Vitek, o MicroScan e o Pasco (TSAKRIS et al., 1998).

De acordo com Facklam e colaboradores em 1999, os testes rápidos, comercialmente disponíveis, para a identificação de enterococos, devem ser utilizados com algumas ressalvas porque muitos destes testes identificam corretamente somente a espécie de *E. faecalis*.

1.9. OUTROS TIPOS DE IDENTIFICAÇÃO

Tradicionalmente, a detecção e a identificação de bactérias eram realizadas baseadas nos principais meios de obtenção de carbono e energia, das exigências nutricionais e dos meios de cultivo para seu crescimento, além da observação direta ao microscópio. Porém, a utilização dessas metodologias forneciam informações limitadas com necessidade de maior refinamento. Foram então desenvolvidas várias metodologias, dentre as quais destacam-se aquelas baseadas nos ácidos nucleicos (JUNIOR et al., 2002).

Alguns estudos comprovaram, em determinadas situações, que o uso do método automatizado pode levar a identificações errôneas, havendo a

necessidade de serem esclarecidos pelo uso de métodos moleculares como da análise dos perfis de proteínas totais (SDS-PAGE), a que demonstrou ser um método reprodutível e bastante útil para diferenciar as espécies de enterococos (MERQUIOR et al. ,1994).

Nas últimas décadas estudos utilizando o DNA como molécula - alvo emergiram apresentando excelentes possibilidades com propósitos de identificação além de permitir bastante acurácia e maior rapidez na obtenção dos resultados.

As técnicas moleculares tornaram-se, então, importantes instrumentos para caracterização de bactérias. Dentre estas, as que se baseiam no uso do rRNA como molécula alvo têm sido consideradas como excelentes opções com propósitos de identificação (KLIJN, WEERKAMP & DE VOS ,1991).

Estudos sobre a diversidade microbiana e análises das comunidades deram um grande salto desde o advento do DNA e seu subsequente sequenciamento, e estes fatos, então, revolucionaram os estudos da filogenia microbiana (WOESE, 1987).

Entre as bactérias existe uma suficiente diversidade genética que permite a identificação de diferentes clones ou grupos clonais (cepas com alto grau de relacionamento genético) dentro da mesma espécie, mesmo os coletados de diferentes fontes, em lugares e épocas diferentes. Pode-se dizer que, o maior celeiro de genes no planeta reside na fração microbiana da biodiversidade. As limitações dos métodos tradicionais, aliados ao avanço tecnológico na área de biologia molecular, fazem com que as técnicas moleculares sejam muito utilizadas para o estudo da diversidade microbiana (ELSAS et al., 1998).

Os métodos de tipagem molecular são baseados na caracterização física das moléculas (ácidos graxos, proteínas, carboidratos, ácidos nucléicos e outras) produzidas pelas bactérias e são universalmente utilizados (SWAMINATHAN & GHASSAN, 1993).

Com o desenvolvimento das técnicas moleculares disponíveis para isolamento, separação e amplificação de ácidos nucléicos, que permitem a comparação direta das seqüências do DNA genômico, passaram a ser

importantes instrumentos para determinação das similaridades ou diferenças entre as cepas.

O sequenciamento do gene 16S rRNA tem sido utilizado com sucesso, pois os aspectos distintivos deste alvo molecular, que são observados quando da análise da seqüência deste gene, disponibilizam um poderoso instrumento de identificação de bactérias representando grandes avanços na filogenia. Trata-se de um alvo importante, porque além do fato de que o gene 16S rRNA está presente em todas as bactérias, ele é grande o suficiente (em torno de 1500 pares de bases) para conter informações em sua seqüência que sejam estatisticamente significantes, possuindo aproximadamente 50 domínios funcionais em sua estrutura. O número de domínios funcionais é bastante importante porque a introdução de trocas selecionadas em um domínio não afeta de maneira significativa as seqüências em outros domínios. Com um número de domínios maior, as trocas selecionadas têm menor impacto sobre o relacionamento genético sendo, por estas características, denominado de “cronômetro molecular” (WOESE, 1987). Além disto, as funções deste alvo universal têm permanecido constantes por longo período. Portanto, as trocas na seqüência provavelmente refletem mais trocas randômicas do que trocas selecionadas que viriam a alterar as funções da molécula.

Outros estudos revelaram ainda que a utilização desta seqüência é bastante útil, pois permite a identificação das bactérias de crescimento lento, as fastidiosas bem como aquelas com problemas na identificação pelos métodos convencionais. Além disto, a metodologia baseada no sequenciamento do 16S rRNA pode ser utilizada para identificação diretamente a partir de espécimes clínicos, sobretudo de sítios estéreis. Conclui-se, portanto, que análises da seqüência da região dentro da porção 5' do gene 16S rRNA têm sido utilizadas com sucesso para identificação de espécies (PATEL, 2001) e importantes para esclarecer afinidades taxonômicas (BAKER, BEEBEE & RAGAN, 1999), além de serem um poderoso instrumento para avaliação da diversidade genética de amostras ambientais, incluindo-se aqui aquelas bactérias que habitam ambientes extremos, onde as condições de crescimento são difíceis de mimetizar em laboratórios (BAKER et al., 2001).

As vantagens das técnicas moleculares consistem, pois, em sua sensibilidade, especificidade e segurança (MURRAY et al., 2004).

1.9.1. PCR (Polymerase Chain Reaction)

Os métodos moleculares receberam grande impulso com o desenvolvimento da técnica conhecida como PCR, em português Reação em Cadeia da Polimerase. A PCR tem sido definida, em diagnósticos microbiológicos, como uma valiosa alternativa para os métodos convencionais. Rapidez, bom limite de detecção, seletividade e potencial para otimização são as maiores vantagens deste método. Entretanto, existem algumas variáveis a serem consideradas no uso da PCR, como o custo do alto investimento tecnológico, a necessidade de aprovação oficial, regulamentos e instruções padronizadas (MALORNY et al., 2003).

É possível analisar segmentos curtos do DNA em combinação com a PCR para amplificar os fragmentos do DNA genômico (FERRE, 1992). A técnica ou método da reação em cadeia da polimerase (PCR) permite a amplificação enzimática “in vitro” de fragmentos específicos de DNA, usando 2 iniciadores que se hibridizam com as fitas opostas, em regiões que flanqueiam o segmento a ser amplificado. Isto acontece em progressão geométrica, visando à produção de milhões de cópias desta seqüência. Nesta técnica, uma amostra é incubada com dois oligômeros curtos de DNA, denominados iniciadores (*primers*), que são complementares às extremidades de uma seqüência genética conhecida do DNA, uma enzima DNA polimerase termoestável (Taq), nucleotídeos e tampões. Os oligômeros se hibridizam com a seqüência apropriada de DNA e podem atuar como iniciadores da polimerase que copia aquele segmento de DNA. A amostra então é aquecida para desnaturar o DNA e resfriada para permitir a hibridização dos iniciadores com o novo DNA. Cada cópia de DNA se torna um novo molde (MURRAY et al., 2004). Os produtos da PCR podem ser observados através da técnica de eletroforese em gel de agarose. O fragmento de DNA, após a separação em gel de agarose, é corado com o brometo de etídio, corante fluorescente que se intercala entre os nucleotídeos na dupla hélice do DNA, e visualizado através de luz ultravioleta (UV).

1.9.2. POLIMORFISMO DE COMPRIMENTO DE FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO (RFLP)

Cepas específicas de microrganismos podem ser diferenciadas tomando-se por base seu DNA ou RNA, ou pelos fragmentos de DNA produzidos quando o DNA é clivado por endonucleases de restrição específicas (enzimas de restrição) (MURRAY et al., 2004)

Os sítios do DNA reconhecidos pelas endonucleases de restrição diferem em sua seqüência, comprimento e freqüência de ocorrência. Como resultado, diferentes endonucleases de restrição clivam o DNA de uma amostra em diferentes locais, produzindo fragmentos de diferentes comprimentos. A clivagem de diferentes amostras de DNA com uma endonuclease de restrição pode produzir fragmentos de vários comprimentos diferentes. Denomina-se de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP) as diferenças no comprimento dos fragmentos de DNA entre as diferentes cepas de um microrganismo específico produzidas através da clivagem com uma ou mais endonuclease de restrição (MURRAY et al., 2004)

O tratamento do amplicom com endonucleases de restrição possibilita a análise do perfil de restrição do DNA cromossomal. Este método permite a comparação do número e do tamanho dos fragmentos produzidos pela digestão do DNA com as endonucleases, que cortam em posições constantes em sítios específicos de reconhecimento, normalmente compostos de 4 a 6 pares de bases. Em função da alta especificidade das enzimas, a digestão completa do DNA permite a reprodutibilidade dos fragmentos em ordem. Estes fragmentos podem ser separados por eletroforese em gel de agarose e visualizados quando corados com brometo de etídio.

As variações na ordem dos fragmentos gerados pelas endonucleases de restrição podem resultar de rearranjos nas seqüências de inserções ou deleções no DNA ou de substituição de uma base dentro dos sítios de clivagem da enzima (SWAMINATHAN & GHASSAN, 1993).

OBJETIVOS

2. OBJETIVO GERAL

Considerando os aspectos acima mencionados, foram realizados estudos com o objetivo de implantar a técnica PCR/RFLP para ser utilizada na identificação de espécies de enterococos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Padronizar a técnica PCR/RFLP com as cepas de referência;
- Observar a especificidade da técnica PCR/RFLP com os isolados bacterianos da coleção de enterococos do laboratório de Biologia Molecular do INCQS;
- Avaliar a ocorrência de enterococos em queijo Minas tipo frescal;
- Identificar as espécies de enterococos isoladas de queijo Minas tipo frescal por testes fenotípicos e moleculares (especie-especifica e PCR/RFLP).

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Microbiologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde na Fundação Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro.

3.1. COLETA DAS AMOSTRAS

Foram estudadas 96 isolados bacterianas pertencentes ao gênero de *Enterococcus*, sendo:

→ 21 isolados a partir de queijo Minas tipo frescal. Dessas amostras 5 apresentaram perfis fisiológicos típicos e 16 apresentaram perfis fisiológicos atípicos .

→ 54 amostras isolados a partir de carne de frango e leite pasteurizado pertencentes à Coleção de Cultura do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Microbiologia do INCQS. Dessas amostras bacterianas, 20 possuidoras de perfis fisiológicos típicos, 23 com perfis fisiológicos atípicos e 11 pertencentes ao gênero *Enterococcus*, porém sem identificação quanto à espécie.

→ Foram também utilizadas 21 cepas de referência, como controle dos diferentes testes empregados ao longo do estudo. Essas cepas de referência foram cedidas pela Professora Lucia Martins Teixeira do Laboratório de Apoio Biotecnológico, do Departamento de Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

As amostras de Queijo Minas tipo frescal foram transportadas para o laboratório sob refrigeração (bolsa plástica contendo gelo), sendo refrigeradas até serem submetidas à análise, respeitando-se os prazos para consumo dos produtos.

Todas as amostras de alimento em suas embalagens originais (lacradas) traziam o carimbo de ciência, responsabilidade e fiscalização do Ministério da Agricultura, órgão governamental responsável pelo controle destes tipos de produtos.

Foram analisadas 5 amostras de Queijo Minas tipo frescal denominadas de Q1 a Q5, de diferentes marcas, distribuidoras e lotes. Estes produtos foram obtidos em supermercados no estado do Rio de Janeiro, dispostos à venda em

balcões frigoríficos nas embalagens originais dos fabricantes. Destas 5 amostras de queijo Minas tipo frescal obteve-se 21 isolados bacterianos.

3.2. PREPARO DAS AMOSTRAS DE QUEIJO MINAS TIPO FRESCAL

Com o objetivo de obter o isolamento de enterococos as matrizes foram analisadas segundo a metodologia preconizada por Andrews e June (1998).

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

Alíquotas de 25g da amostra de queijo Minas tipo frescal (parte interna e parte externa) foram retiradas, e homogeneizadas em 225mL de água peptonada 0,1% (Oxoid Limited, Hampshire, Reino Unido) em agitador mecânico do tipo “Stomacher” (Seward Limited; Londres, Reino Unido), durante 2 minutos a 230 rpm em sacos plásticos flexíveis, estéreis (diluição 10^{-1}).

3.3. ISOLAMENTO DE *ENTEROCOCCUS*

A partir da diluição 10^{-1} foram realizadas as diluições 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} e alíquotas de 0,1 mL da diluição 10^{-4} foram distribuídas em 5 placas de Petri e, sobre o inóculo, foram colocados 30 mL Agar 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 removidas, com auxílio de alça bacteriológica (até 05 colônias negras sugestivas de enterococos). 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 submetidas aos testes preliminares de caracterização fenotípica para a identificação quanto ao gênero.

3.4. IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA DE *ENTEROCOCCUS SPP*

Os isolados bacterianas do queijo Minas tipo frescal 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). Como controle para os testes realizados foi utilizada cepa de referência *E.faecalis* SS1273.

3.4.1. CARACTERÍSTICAS MORFO – TINTORIAIS

Os isolados bacterianos foram inoculados em meio Brain Heart Infusion (Brain Heart Infusion agar; Becton Dickinson Microbiology Systems), incubados a 37°C durante 24h, e após este período foram preparadas suspensões em salina fisiológica (NaCl 0,85%, Merck, Microbiology, Darmstadt, Alemanha) e preparados esfregaços em lâminas de microscópio. 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*.

3.4.2. PRODUÇÃO DA ENZIMA CATALASE

A observação da produção da enzima catalase foi verificada pela metodologia convencional, em lâmina de vidro. A partir de um crescimento recente (24h a 37°C) em Agar BHI, foi retirada uma colônia e 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 indicativa de reação negativa característica dos enterococos.

3.4.3. HIDRÓLISE DA ESCULINA EM PRESENÇA DE BILE

Os isolados foram inoculados em agar 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 esculetina.

3.4.4. HIDRÓLISE DA L-PIRROLIDONIL-B-NAFTILAMIDA (PYR) E DA L-LEUCINA-B-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 mm contendo 0,2 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 (1989). 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.

3.4.5. CRESCIMENTO NA PRESENÇA DE NaCl 6,5%

Foi observada a capacidade de multiplicação dos *enterococos* em caldo BHI (Heart Infusion Broth; Becton Dickinson Microbiology Systems) contendo 6,5 % de NaCl. A turvação dos meios, após incubação por 24 horas a 37 °C, era indicativa de teste positivo.

3.4.6. ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Para investigação da produção de hemolisina foi utilizado o meio de cultura Agar sangue suplementado com 5% de sangue de carneiro (DOMIG, MAYER e KNEIFEL, 2003). Culturas puras provenientes do ágar BHI (24h/37°C) foram semeadas em agar sangue. Os resultados foram obtidos após incubação das placas a 37°C/24h e a observação da formação de zonas claras ao redor da colônia indicativa da produção de α - hemólise (EATON E GASSON, 2001).

3.5. PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS

Após a caracterização quanto ao gênero *Enterococcus*, os isolados bacterianos foram inoculados 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 1,5 mL da solução de Skim Milk (Difco) a 10% e glicerol (Merck) a 10% (v/v) e conservadas em freezer a -20° C.

3.6. IDENTIFICAÇÃO DE *ENTEROCOCCUS* SPP POR TESTES BIOQUÍMICOS

Quando as amostras bacterianas apresentaram-se como cocos Gram-positivos, catalase negativos, com crescimento em presença de NaCl 6,5%, PYRase e LAPase positivos foram consideradas como pertencentes ao gênero *Enterococcus* (presuntivamente) e estes foram submetidos aos testes para identificação em nível de espécie.

Para a identificação dos enterococos quanto à espécie utilizamos o esquema de identificação proposto por Teixeira & Facklam (2003) (**Tabela 1**).

Para a identificação em nível de espécie foram utilizados testes bioquímicos que incluíram: produção de pigmento; motilidade; hidrólise da arginina; utilização de piruvato; fermentação de açúcares: manitol, arabinose, metil- α -D-glicopiranosídeo, rafinose, sacarose, sorbitol e sorbose. Estes testes foram realizados segundo metodologia baseada nas recomendações de FACKLAM & COLLINS, 1989; FACKLAM, SAHM & TEIXEIRA, 1999; TEIXEIRA & FACKLAM, 2003. Foram utilizadas como controles para os testes cepas padrão de *E. faecalis* SS 1273, *E. faecium* SS 1274, *E. casseliflavus* SS 1229 e *E. gallinarum* SS 1228.

3.6.1. PRODUÇÃO DE PIGMENTO

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

3.6.2. HIDRÓLISE DA ARGININA

Para a verificação da hidrólise da arginina foi utilizado o meio de cultura Descarboxylase Base Moeller (Becton Dickinson Microbiology Systems), acrescido de 1% de L-arginina (Sigma), distribuído em alíquotas de 3,0 mL em tubos 13x100 mm. Foram inoculadas 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.

3.6.3. 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° C por até sete dias.

3.6.4. 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 24 horas a 37° C por até 07 dias, o aparecimento de colônias negras na superfície do meio indicou reação positiva para o teste.

3.6.5. 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.

3.6.6. 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) em 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.

TABELA 1: Esquema de identificação de enterococos proposto por Teixeira e Facklam (TEIXEIRA & FACKLAM, 2003).

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. cacaе</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	(c)
<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

3.7. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR ATRAVÉS DE TÉCNICAS DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

3.7.1. EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL DOS ENTEROCOCOS

As amostras bacterianas foram semeadas em ágar BHI e incubadas a 37° C durante 24h. A partir desta cultura foi realizada a extração do DNA, seguindo-se as recomendações de Cardarelli-Leite e colaboradores (1996) onde foi utilizado o kit *Genomic isolation - Puregene Genra System* (MINNEAPOLIS, MN, USA)

3.7.1.1. LISE DAS CÉLULAS

As amostras bacterianas cultivadas em ágar BHI, durante 24 h a 37°C, foram removidas da superfície do ágar com auxílio de alça bacteriológica e transferidas para microtubo (2.0 ml) contendo 300µl da solução específica para preparação de suspensão (tampão TE; Bio Rad), pH 8,0. Após homogeneização, adicionou-se 1,5µl de solução de enzima lítica e invertidos os tubos por 25 vezes e incubados a 37° C durante 30 minutos em banho seco. Depois da incubação, os tubos foram centrifugados durante 1 minuto (13000Xg), o sobrenadante foi desprezado e ao sedimento foi adicionado de 300µl de solução de lise celular e em seguida os tubos foram aquecidos durante cinco minutos a 80°C.

3.7.1.2. TRATAMENTO COM RNase

Foram adicionados aos tubos 1,5µl de solução de RNase (4 mg/ml) que após homogeneização foram 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 específica para precipitação de proteínas, seguido de agitação em vortex, durante 20 segundos. Em seguida os tubos foram incubados em banho de gelo durante 1h. Após este período os tubos foram centrifugados durante 3 minutos (13000Xg) e o sobrenadante transferido para novo tubo microtubo de 2,0 ml.

3.7.1.4. OBTENÇÃO DO DNA PURIFICADO

Ao sobrenadante adicionou-se, então, 300µl de isopropanol (Merck), homogeneizado 50 vezes e a mistura foi centrifugada durante 2 minutos (14000Xg). Após desprezar o sobrenadante com cuidado o tubo foi invertido em papel filtro para secar. O DNA foi ressuspensão com 50µl de água purificada e guardado em geladeira.

3.7.2. DETECÇÃO DO GÊNERO *ENTEROCOCCUS*.

Os iniciadores utilizados foram descritos por DEASY et al., (2000), a partir de regiões conservadas do 16S rRNA:

	Seqüência Iniciadora (5'- 3')	Produto (pb)
<i>Enterococcus</i> spp.	EntE1 = 5' TCA ACC GGG GAG GGT 3' 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 3µM (240µM); 0,5µL de desoxinucleotídeos (Gibco) 10mM (200µM); 0,25µL de Taq DNA Polimerase (Gibco) 5U/µL (1,25U) e 12,75µL de H₂O destilada. 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 por 4 minutos, 95°C por 30 segundos, 52° C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, num total de 30 ciclos e uma temperatura final de extensão de 72° C por 7 minutos.

Em todas os casos, foi utilizado também um controle negativo, "branco" (todos os reagentes, exceto o DNA), com o objetivo de assegurar que não houve contaminação das amostras.

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 horas 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 minutos, e descorados em água Milli-Q (2 vezes / 30 minutos), e posteriormente, fotografados utilizando o sistema digital EDAS-120 (Eastman Kodak, New Haven, CT, EUA).(GELSOMINO et al., 2001).

3.7.3. DETECÇÃO DE *E. faecalis*

Os iniciadores utilizados foram descritos por DUTKA-MALEN et al., (1995), a partir do gene codificadores da D-alanina: D-alanina (D-Ala: D-Ala) ligase (*ddl_{E. faecalis}*):

Gene	Seqüência Iniciadora (5'- 3')	Produto (pb)
<i>ddl_{E. faecalis}</i>	DDE1 = 5' ATC AAG TAC AGT TAG TCT 3' DDE2 = 5' ACG ATT CAA AGC TAA CTG 3'	941

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

As misturas foram levadas ao termociclador e submetidas ao seguinte programa: 1º ciclo de desnaturação inicial a 95°C durante 4 minutos, 95 °C durante 30 segundos, 52°C durante 1 minuto, 72°C durante 1 minuto, num total de 30 ciclos e uma temperatura final de extensão de 72°C durante 7 minutos. Os produtos da amplificação foram visualizados em trans-iluminador, sob luz UV, após eletroforese em gel de agarose (Sigma) a 1,5% durante 2 horas sob corrente constante de 90V esperando-se encontrar um amplicom de 941 pb para *E. faecalis*. O tampão utilizado na corrida eletroforética foi TBE 1X, o gel foi corado com brometo de etídeo, descorado em água Milli-Q e posteriormente, fotografado utilizando o sistema digital.

3.7.4. DETECÇÃO DE *E. faecium*

Os iniciadores utilizados foram descritos por DUTKA-MALEN et al., (1995), a partir dos genes codificadores da D-alanina:D-alanina (D-Ala:D-Ala) ligase (*ddl_{E. faecium}*):

Gene	Seqüência Iniciadora (5'- 3')	Produto (pb)
<i>ddl_{E. faecium}</i>	DDF1 = 5'GCA AGG CTT CTT AGA GA 3' DDF2 = 5'CAT CGT GTA AGC TAA CTT C 3'	550

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

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

3.7.5. DETECÇÃO DE *E. casseliflavus* e *E. gallinarum*

Para a detecção dos genes de *E. casseliflavus* e *E. gallinarum* foi utilizada a metodologia preconizada por Dutka-Malen et al. (1995), para detectar a presença dos genes *van C1* para *E.gallinarum* (822 pb), *van C2* e *van C3* para *E. casseliflavus* (439 pb).

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>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 µLde MgCl₂.

Depois de preparadas todas as reações em tubos microtubos(1,0 mL), estas misturas foram levadas ao termociclador e submetidas ao seguinte programa: um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 30 ciclos a 94°C por 1 minuto, 54°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e um ciclo na temperatura final de extensão de 72° C por1 minuto.

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 Cepas padrão *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 cepa padrão *E. faecalis* 29212 foi utilizada como controle negativo.

3.7.6. ANÁLISE DO 16S rRNA POR PCR/RFLP.

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) foi realizada segundo recomendações de Cardarelli-Leite e colaboradores, 1996.

Foram pesquisadas as seqüências específicas do gene 16S rRNA com os seguintes iniciadores (Sintetizados no *Applied Biosystems Synthesizer pela Biotechnology Core Facility Branch, Centers for Disease Control and Prevention-CDC, Atlanta, Ga, EUA*) que amplificam uma região conservada do 16S rRNA:

Forward - PLO6: 5'- GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC-3'

Reverse - CAMPC5: 5'-GGCTGATCTACGATTACTAGCGAT-3'

Para a mistura da reação, foram utilizados 100µl contendo 2µl DNA purificado e 98µl do coquetel de amplificação: 240 µM de cada iniciador, 200 µM de cada um dos 4 desoxirribonucleotídeos, 10 µl do tampão PCR Gene Amp e 2,5U da enzima *Taq* DNA polimerase).

Para a amplificação foi utilizado o termociclador GeneAmp PCR System 2400, Applied Biosystems, programado para 96°C por 2 minutos, 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 72°C durante 1 minuto, por 30 ciclos seguido

de 72°C durante 10 minutos para a extensão final. Os produtos de reação foram mantidos a 4°C até serem testados.

O produto da reação amplificado foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose 1 % em tampão de TBE 1 X, contendo brometo de etídio (10mg/ml) utilizando o marcador de peso molecular de 100 pb.

Para a corrida eletroforética foi utilizada uma corrente de 70 V por 30 minutos e 90 V por 1 hora em tampão TBE 1 X e os fragmentos obtidos foram visualizados em transiluminador de luz U.V, onde foi observado a presença do fragmento de 275 pb do gene 16S RNA.

3.7.6.1. TRATAMENTO COM ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO

Em trabalho previamente realizado pelo nosso grupo foram testadas 16 endonucleases de restrição: *Apal*, *Aspl*, *Clal*, *Ddel*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HincI*, *Hinfl*, *HpaI*, *Mbol*, *MluI*, *NstI*, *Sall*, *SmaI*, *XbaI* e *XhoI* com as cepas padrão de *E. casseliflavus* SS229, *E. dispar* SS1295, *E. durans* SS661, *E. faecalis* SS1273, *E. faecium* SS1274, *E. gallinarum* SS1228 e *E. hirae* SS1227. Das 16 endonucleases de restrição testadas apenas 3 enzimas (*Hinfl*, *Ddel* e *HaeIII*) foram selecionadas para este trabalho (resultados não publicados).

Após a observação da obtenção do produto amplificado do gene 16S rRNA de 275 p.b. em gel de agarose a 1 %, o produto amplificado foi submetido ao tratamento com as endonuclease de restrição.

Neste trabalho, foram utilizados de 10 a 20µl do produto amplificado digeridos com as endonucleases de restrição *Hinfl*, *Ddel* e *HaeIII* (utilização segundo recomendações do fabricante).

Resumidamente, para um volume final de 25µl de reação foram utilizados 2,5µl de tampão de enzima, 2,5 µl de enzima e 20 µl do produto amplificado. As misturas foram submetidas a 37°C em banho-maria por 16h a 18h.

3.7.6.2. VISUALIZAÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS E DIGERIDOS EM GEL DE AGAROSE

Para visualização dos fragmentos amplificados pela PCR e digeridos com as endonucleases de restrição, todo o volume obtido foi submetido à eletroforese em

gel de agarose a 4% (2 % GIBCO + 2 % NuSive) em tampão TBE 1X, contendo brometo de etídio (10 mg/ml) utilizando o marcador de peso molecular de 50 pb.

Para a corrida eletroforética foi utilizada uma corrente de 90 V durante 210 minutos em tampão TBE1X e os fragmentos obtidos foram visualizados em transiluminador de luz UV. Foi utilizado um controle negativo (sem corte) composto pelo produto amplificado sem as enzimas de restrição.

3.8. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DE DNA DAS ESPÉCIES DE *ENTEROCOCCUS* ESTUDADAS DEPOSITADAS NO GenBank

Através das informações depositadas no banco de sequências nucleotídicas GenBank - National Center for Biotechnology Information (NCBI), (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), foram analisadas as sequências do gene 16S rRNA das seguintes espécies de enterococos:

Cepa bacteriana	Número de acesso no GenBank
<i>Enterococcus asini</i>	Y11621
<i>Enterococcus avium</i> strain LMG 10744	AJ301825
<i>Enterococcus canis</i> strain LMG 21553	AY156090
<i>Enterococcus casseliflavus</i> strain ELS3	EF199997
<i>Enterococcus columbae</i> strain LMG 11740	AJ301828
<i>Enterococcus dispar</i> LMG 1352	AJ301829
<i>Enterococcus durans</i> strain K22-24	EU333895
<i>Enterococcus faecalis</i> HN-S7	FJ378704
<i>Enterococcus faecium</i> strain HN-F22	FJ378707
<i>Enterococcus gallinarum</i> strain 22B	EF025908
<i>Enterococcus gilvus</i> strain 2366	EF535229
<i>Enterococcus haemoperoxidus</i>	AF286832
<i>Enterococcus hirae</i> strain RS-1	FJ378895
<i>Enterococcus malodoratus</i> strain P7	DQ223886
<i>Enterococcus moraviensis</i>	AF286831
<i>Enterococcus mundtii</i>	Y18340
<i>Enterococcus pallens</i> strain ATCC BAA-351	DQ411812
<i>Enterococcus raffinosus</i> strain P6	DQ223885
<i>Enterococcus saccharolyticus</i> strain ATCC 43076	DQ411816
<i>Enterococcus sulfureus</i> strain ATCC 49903	DQ411815
<i>Enterococcus ratti</i> strain ATCC 700914	AF539705

O programa CLUSTAL 2.0.10 multiple sequence alignment, disponível em <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>, foi utilizado para o alinhamento das sequências dos genes do 16SrRNA das diferentes espécies de enterococos utilizadas neste trabalho e as disponíveis no GenBank.

A pesquisa dos sítios de restrição das enzimas *Ddel*, *HaeIII* e *HinfI* presentes na sequência do fragmento de 275pb do gene do 16SrRNA nestas sequências do GenBank foi realizada utilizando-se o programa NEBCutter2.0 (VINCZE, POSFAI, & ROBERTS, 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ISOLAMENTO DE *ENTEROCOCCUS* SPP DO QUEIJO MINAS TIPO FRESCAL

De Agosto de 2007 a Janeiro de 2008 foram analisadas **5** amostras de queijos Minas Tipo Frescal de marcas diferentes, pesando no mínimo 500 g cada, compradas aleatoriamente em supermercados da cidade do Rio de Janeiro/RJ, adquiridas dentro do prazo de validade para consumo. Essas amostras permitiram a obtenção de 21 isolados bacterianos com características indicativas do gênero de *Enterococcus*, selecionadas em ágar Enterococcosel. Na **tabela 2** podemos observar as denominações atribuídas ao queijo Minas tipo frescal e o número de isolados.

As amostras foram denominadas pela letra Q, seguida por um número de identificação de 1 a 5. Essas amostras de alimentos são de distribuidoras diferentes, compradas em diferentes supermercados do Rio de Janeiro/R.J, entretanto a identidade e origem dos produtos permaneceram em sigilo.

Tabela 2: Descrição das amostras analisadas de queijo Minas tipo frescal .

Produto	N . Isolados
Q1	5
Q2	2
Q3	4
Q4	5
Q5	5

Legenda: Produto: denominação atribuída às amostras de queijo Minas tipo frescal; **N. isolados:** Numero de isolados coletados em cada amostra.

Estes isolados bacterianos foram incluídos neste trabalho com o intuito de se obter enterococos sem nenhuma identificação previa quanto à espécie, para testar a técnica PCR/RFLP associada a alguns testes bioquímicos para a identificação destas bactérias.

A presença de enterococos em queijo pode ser considerada como indicador de contaminação fecal ou de baixas condições de higiene sanitária durante a fabricação do queijo. Sua presença em queijos pasteurizados é geralmente devida à recontaminação após tratamento térmico ou à sua termoresistência. No entanto, muitos autores sugerem que a presença de certas espécies de enterococos podem em alguns queijos, ser desejável em função do seu atributo positivo para o desenvolvimento de aroma durante a maturação do queijo (GELSOMINO et al., 2002).

SUMRU ÇITAK e colaboradores (2004) analisaram a presença de *Enterococcus* spp em amostras de queijo branco turco. Neste estudo, foi observada a presença de enterococos resistentes à vancomicina, indicando pobres condições sanitárias durante a produção e o tratamento dos queijos e o risco significativo para a saúde do consumidor.

4.2. IDENTIFICAÇÃO DO GÊNERO

Em todas as amostras analisadas dos queijos Minas tipo frescal foram detectados isolados bacterianos caracterizados como pertencentes ao gênero *Enterococcus*.

Todos apresentaram – se como cocos Gram positivos, catalase negativos, capazes de hidrolisar a bile em presença de esculina, produtores das enzimas PYRase e LAPase e apresentaram crescimento na presença de 6,5% de NaCl.

A avaliação dos dados obtidos revela uma alta especificidade, pois todos os isolados do queijo Minas tipo frescal apresentaram-se positivos para os testes presuntivos para o gênero *Enterococcus*. Estes resultados podem ser observados na tabela 3.

Tabela 3: Resultados obtidos com os isolados bacterianos oriundos das amostras de queijo Minas tipo frescal após a utilização dos testes presuntivos para identificação do gênero *Enterococcus*

ISOLADOS BACTERIANOS	ABEA	GRAM	PIG	CAT	NaCl	HEM	PYR	LAP	
Q 1 / 1	+	CG	+	-	-	+	α	+	+
Q 1 / 2	+	CG	+	-	-	+	α	+	+
Q 1 / 3	+	CG	+	-	-	+	α	+	+
Q 1 / 4	+	CG	+	-	-	+	α	+	+
Q 1 / 5	+	CG	+	-	-	+	α	+	+
Q 2 / 2	+	CG	+	+	-	+	α	+	+
Q 2 / 3	+	CG	+	+	-	+	α	+	+
Q 3 / 1	+	CG	+	-	-	+	α	+	+
Q 3 / 2	+	CG	+	-	-	+	α	+	+
Q 3 / 4	+	CG	+	-	-	+	α	+	+
Q 3 / 5	+	CG	+	-	-	+	α	+	+
Q 4 / 1	+	CG	+	-	-	+	α	+	+
Q 4 / 2	+	CG	+	-	-	+	α	+	+
Q 4 / 3	+	CG	+	-	-	+	α	+	+
Q 4 / 4	+	CG	+	-	-	+	α	+	+
Q 4 / 5	+	CG	+	-	-	+	α	+	+
Q 5 / 1	+	CG	+	-	-	+	α	+	+
Q 5 / 2	+	CG	+	-	-	+	α	+	+
Q 5 / 3	+	CG	+	-	-	+	α	+	+
Q 5 / 4	+	CG	+	-	-	+	α	+	+
Q 5 / 5	+	CG	+	-	-	+	α	+	+

Legenda: **ABEA:** Agar Bile Esculina azida, **PIG:** pigmento, **CAT:** catalase, **NaCl:** Crescimento na presença de NaCl 6,5%, **HEM:** hemólise, **PYR:** Produção das enzimas PYRase e **LAP:** Produção das enzimas LAPase.

Fracalanza e colaboradores (2007) realizaram um estudo com amostras oriundas de frango e leite, pesquisando enterococos multiresistentes aos antimicrobianos. Ao utilizarem os testes presuntivos, todos os seus 294 isolados bacterianos obtidos em seu estudo foram caracterizados fenotipicamente ao nível de gênero.

Gomes e colaboradores (2008) estudaram a prevalência e a caracterização de *Enterococcus* spp. isolados em alimentos (carnes, queijos, leite e vegetais), onde utilizaram os mesmos testes citados neste estudo para a identificação presuntiva destes microrganismos e obtiveram excelentes resultados para a identificação quanto ao gênero.

4.3. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS ESPÉCIES DE *ENTEROCOCCUS*

Todos os isolados bacterianos oriundos do queijo Minas tipo frescal foram identificados em nível de espécie através de testes fenotípicos classificados dentro dos grupos fisiológicos propostos por Teixeira e Facklam (2003).

Das 21 amostras bacterianas isoladas a partir do queijo Minas tipo frescal, 12 (57,1%) pertenciam à espécie *E. faecalis*; 6 (28,6%) à espécie *E. faecium*, 2 (9,5) à espécie *E. casseliflavus* e 1 (4,8) à espécie *E. gallinarum*.

Entre os 21 isolados bacterianos, 5 (28,6%) apresentaram perfis fenotípicos clássicos, enquanto 16 (71,4%) apresentaram perfis fisiológicos com atípicas. Estes resultados podem ser observados na tabela 4.

Tabela 4: Resultados obtidos para os isolados bacterianos oriundos de queijo Minas tipo frescal após caracterização fenotípica das espécies de *Enterococcus*.

ISOLADOS BACTERIANOS	MAN	SOR	ARG	ARA	SBL	RAF	TEL.K	MOT	SAC	PIRUV	MGP	Identificação	ATIPIAS
Q 1 / 1	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	<i>E. faecalis</i>	MGP (+)
Q 1 / 2	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	<i>E. faecalis</i>	MGP (+)
Q 1 / 3	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	<i>E. faecalis</i>	MGP (+)
Q 1 / 4	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	<i>E. faecalis</i>	MGP (+)
Q 1 / 5	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	<i>E. faecalis</i>	MGP (+)
Q 2 / 2	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	<i>E. casseliflavus</i>	-
Q 2 / 3	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	<i>E. casseliflavus</i>	-
Q 3 / 1	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	<i>E. faecalis</i>	-
Q 3 / 2	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	<i>E. faecium</i>	Tel.K. (+)
Q 3 / 4	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	<i>E. faecalis</i>	-
Q 3 / 5	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	<i>E. faecium</i>	Tel.K. (+)
Q 4 / 1	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	<i>E. gallinarum</i>	Tel.K. (+)
Q 4 / 2	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	<i>E. faecium</i>	Tel.K. (+)
Q 4 / 3	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	<i>E. faecium</i>	-
Q 4 / 4	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	<i>E. faecium</i>	Tel.k. (+)
Q 4 / 5	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	<i>E. faecium</i>	Tel.K. (+)
Q 5 / 1	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	<i>E. faecalis</i>	MGP (+)
Q 5 / 2	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	<i>E. faecalis</i>	MGP (+)
Q 5 / 3	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	<i>E. faecalis</i>	MGP (+)
Q 5 / 4	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	<i>E. faecalis</i>	MGP (+)
Q 5 / 5	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	<i>E. faecalis</i>	MGP (+)

Legenda: MAN:manose, SOR:sorbose, ARG:arginina, ARA:arabinose, SBL:sorbitol, RAF:rafinose, TEL.K:telurito de K, MOT:motilidade, SAC:sacarose, PIRUV:piruvato, MGP:metilglicopironosídeo.

Ao utilizarmos a tabela (Tabela 1) dos testes fisiológicos propostos por Teixeira e Facklam (2003) para identificação quanto à espécie, obtivemos 12 isolados (57,1%) caracterizados como *E. faecalis*, destes, 2 isolados apresentaram perfis fisiológicos típicos e 10 perfis fisiológicos atípicos; 6 (28,6 %) isolados foram caracterizados como *E. faecium* e destes, apenas 1 isolado apresentou perfil fisiológico típico; 2 (14,28 %) isolados foram caracterizados como *E. cassiliflavus* sendo que todos apresentaram perfil fisiológico típico e 1 (4,8) isolado *E.gallinarum* apresentou perfil atípico.

Dentre os 12 isolados bacterianos caracterizados como *E. faecalis*, 10 apresentaram atípicas quanto a produção de ácido a partir do MGP. Dentre os isolados caracterizados como *E. faecium*, 5 deles apresentaram-se positivos frente ao teste de tolerância à presença do telurito de potássio resultando em uma atípica para este microrganismo e ocorrendo o mesmo para a mostra de *E. gallinarum*.

Entre os isolados identificados a partir das amostras de queijo Minas tipo frescal houve uma predominância da espécie *E. faecalis* seguido por *E. faecium*, confirmando os dados da literatura onde estas espécies são as mais freqüentemente envolvidas com produtos de laticínios (GELSOMINO et al., 2001).

D'azevedo e colaboradores (2004) fizeram uma comparação destes testes bioquímicos convencionais com métodos automatizados para identificação de *Enterococcus* spp. As amostras que obtiveram resultados discordantes entre o método convencional e o sistema automatizado foram identificadas pela análise do seu perfil de proteínas totais seguindo recomendações de Merquior et al (1994) para confirmar os resultados discordantes entre as duas metodologias empregadas.

Fracalanza e colaboradores (2007) utilizaram testes bioquímicos convencionais para identificação de seus isolados bacterianos quanto à espécie de enterococos. Através da utilização dos testes bioquímicos, propostos por Teixeira e Facklam (2003), eles obtiveram resultados com perfil bioquímico típicos, atípicos e alguns isolados sem identificação quanto à espécie.

4.4. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

4.4.1. CARACTERIZAÇÃO DE GÊNERO ATRAVÉS DA TÉCNICA DA PCR

A técnica foi realizada conforme descrito no item 3.7.2. Todas as amostras testadas apresentaram resultados positivos quando submetidas à técnica da PCR direcionado para região conservada do gene 16S rRNA do gênero *Enterococcus* gerando um amplicon de 733 pb. O resultado pode ser observado conforme ilustrado na figura 1.

4.4.2. CARACTERIZAÇÃO DAS ESPÉCIES DE ENTEROCOCOS POR PCR ESPÉCIE-ESPECÍFICA

A PCR espécie-específica foi utilizada para a confirmação das espécies identificadas após caracterização fenotípica como *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus* e *E. gallinarum*.

4.4.2.1. CARACTERIZAÇÃO DA ESPÉCIE *E. faecalis*

A técnica foi utilizada conforme descrito no item 3.7.3. Para a confirmação dos isolados caracterizados como *E. faecalis* foi pesquisado o gene codificador *ddl_{E. faecalis}*. Nestes casos os resultados foram considerados positivos, quando confirmada a amplificação do fragmento de DNA com 941 pb.

O gene *ddl_{E. faecalis}* foi detectado em 12 dos isolados bacterianos obtidos dos queijos Minas tipo frescal testados. A figura 1 demonstra a confirmação da identificação da espécie *E. faecalis* para os isolados de queijo Minas tipo frescal da amostra de numero 5.



Figura 1: Foto ilustrativa de gel de agarose exemplificando os produtos da PCR para identificação do gênero *Enterococcus* e da espécie *E. faecalis* obtidos a partir dos isolados dos queijos Minas tipo fresco. Para gênero: **1:** controle positivo de *E. faecalis* (SS1273); **2:** controle negativo de *Lactococcus* (A6/1 com amplicom de 900 pb); **3:** Q5/1; **4:** Q5/2; **5:** Q5/3; **6:** Q5/4; **7:** Q5/5; **8:** Peso molecular 100 bp Ladder; Para espécie *E. faecalis*: **9:** Padrão *E. faecalis* (SS1273); **10:** controle negativo *Lactococcus* (A6/1); **11:** Q5/1; **12:** Q5/2; **13:** Q5/3; **14:** Q5/4; **15:** Q5/5.

4.4.2.2. CARACTERIZAÇÃO DA ESPÉCIE *E. faecium*

A técnica foi utilizada conforme descrito no item 3.7.4. Para a identificação dos isolados caracterizados como *E. faecium* foi pesquisado o gene codificador *ddl_{E.faecium}*. O resultado foi considerado positivo, quando confirmada a amplificação do fragmento de DNA com 550 pb.

O gene *ddl_{E.faecium}* foi detectado em 6 dos isolados bacterianos a partir dos queijos Minas tipo fresco testados, confirmando o resultado para *E. faecium*. A figura 2 ilustra a identificação das espécies *E. faecium* encontradas nas amostras bacterianas isoladas.

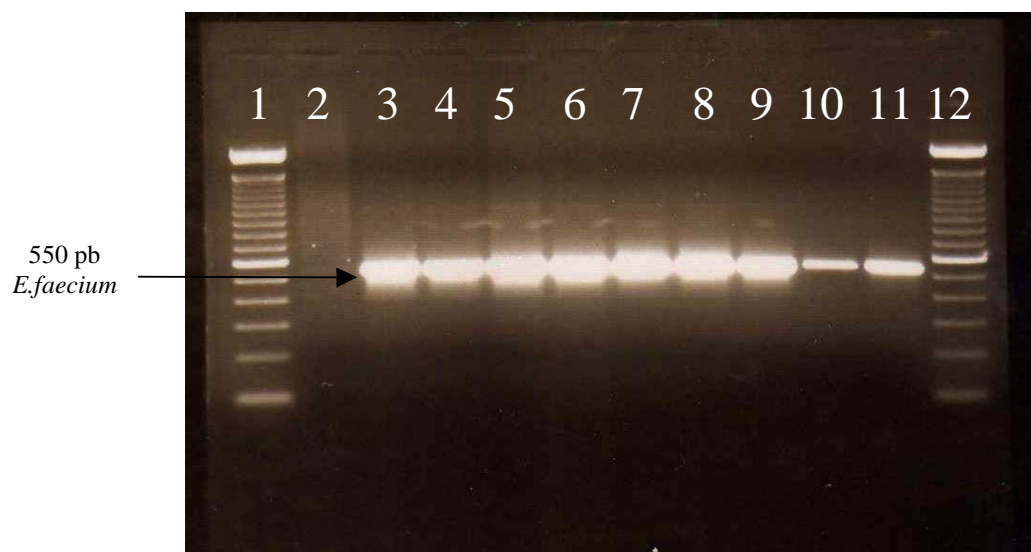


Figura 2: Foto ilustrativa da amplificação pela PCR do gene *ddl_{E.faecium}* específico para a identificação de *E.faecium*. 1: Peso molecular 100 bp Ladder; 2 : controle negativo *E. faecalis* (SS1273); 3: controle positivo cepa padrão *E. faecium* (SS1274); 4: Controle positivo *E. faecium* (A14/2); 5: controle positivo *E. faecium* (A17/5); 6: Q3/2; 7: Q3/5; 8: Q4/2; 9: Q4/3; 10: Q4/4; 11: Q4/5 e 12: Peso molecular 100 pb.

4.4.2.3. CARACTERIZAÇÃO DA ESPÉCIE *E. casseliflavus* e *E. gallinarum* (DUTKA-MALEN et al., 1995)

Foi realizada também 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 dos fragmentos de DNA com 439 pb para *E. casseliflavus* e com 822 pb para *E. gallinarum*. Os genes *vanC2/vanC3* foram detectados em todas as amostras de *E. casseliflavus* testadas. Este resultado pode ser observado na figura 3.

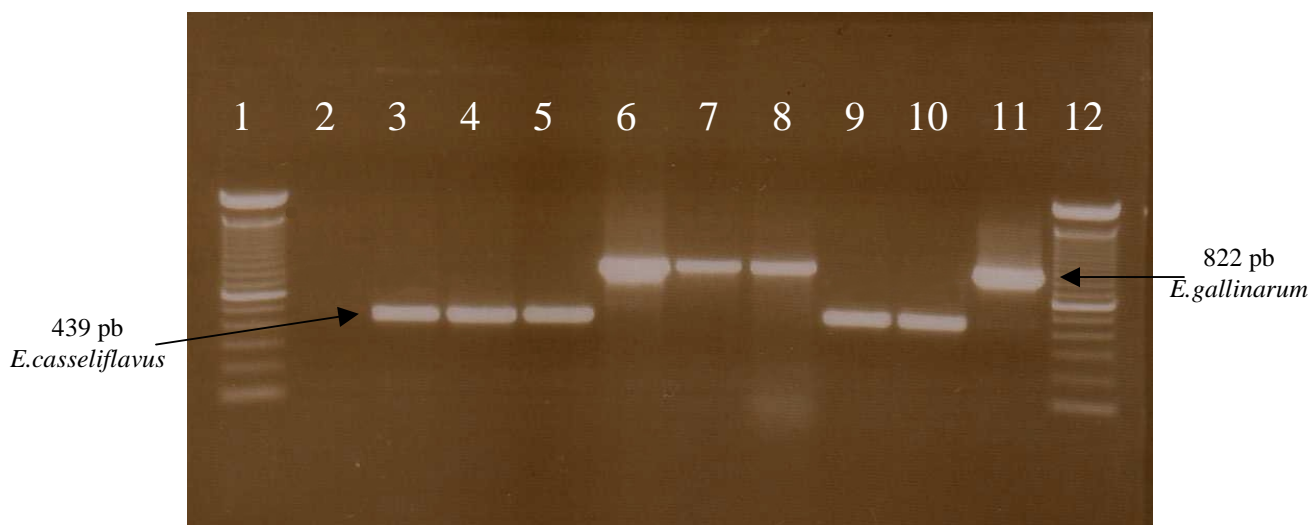


Figura 3: Foto ilustrativa do gel da amplificação pela PCR espécie-específica dos genes de *E. gallinarum* (VanC1), 822 pb e *E. casseliflavus* (VanC2 – VanC3), 439 pb. **1:** Peso molecular 100 bp Ladder; **2:** controle negativo (*E. faecalis* - A15/4); **3 :** controle positivo *E. casseliflavus* (SS229); **4:** controle positivo *E. casseliflavus* (A 5/1); **5:** controle positivo de *E. casseliflavus* (SS1229); **6:** controle positivo *E. gallinarum* (SS1228); **7:** controle positivo *E. gallinarum* (A2/ 4); **8:** controle positivo *E. gallinarum* (A 5/ 7); **9:** Q 2/ 2; **10:** Q 2/ 3; **11:** Q4/ 1 ; **12:** Peso Molecular 100 pb.

Fracalanza e colaboradores (2007) utilizaram os mesmos métodos de caracterização molecular, citados no item 4.4, para a caracterização de genes espécie-específicos de *Enterococcus* spp., entre eles: *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*. Esta metodologia permitiu a identificação molecular de 100 % destes isolados.

4.4.3. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA PCR/RFLP

A técnica foi realizada conforme descrito no item 3.7.6.

As cepas de referência *E. asini* SS1501, *E. avium* SS559, *E. canis* SS1724, *E. casseliflavus* SS229, *E. columbae* SS1310, *E. díspar* SS1295, *E. durans* SS661, *E. faecalis* SS1273, *E. faecium* SS1274, *E. gallinarum* SS1228, *E. gilvus* SS1651, *E. haemoperoxidus* SS1690, *E. hirae* SS1227, *E. malodoratus* SS1226, *E. moraviensis* SS1689, *E. mundtii* SS1232, *E. pallens* SS1665, *E. raffinosus* SS1278, *E. ratti* SS1494, *E. saccharolyticus* SS1297 e *E. sulfureus* SS1314 foram utilizadas com o objetivo de observar o perfil das cepas de referência frente às enzimas de restrição com o intuito de padronizar a técnica PCR/RFLP para

identificação das espécies de enterococos utilizadas neste projeto. Nos testes realizados com as cepas de referência foi possível obter através da utilização das 3 enzimas de restrição (*DdeI*, *HaeIII* e *HinfI*) perfis específicos que, quando comparadas com os já disponíveis na literatura, permitiu traçar perfis de 5 grupos diferentes (A,B,C,D e E).

4.4.3.1. AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16 S rRNA POR PCR

A técnica foi utilizada conforme descrito no item 3.7.6. Foram amplificados por PCR as seqüências que codificam para o 16S rRNA com iniciadores específicos (PLO6 e CAMPC5) para regiões conservadas do gene.

O resultado foi considerado positivo, quando confirmada a amplificação do fragmento do gene 16S rRNA de 275 pb. A figura 4 exemplifica a amplificação dos fragmentos do gene 16S rRNA de isolados obtidos das amostras de queijo Minas tipo frescal.

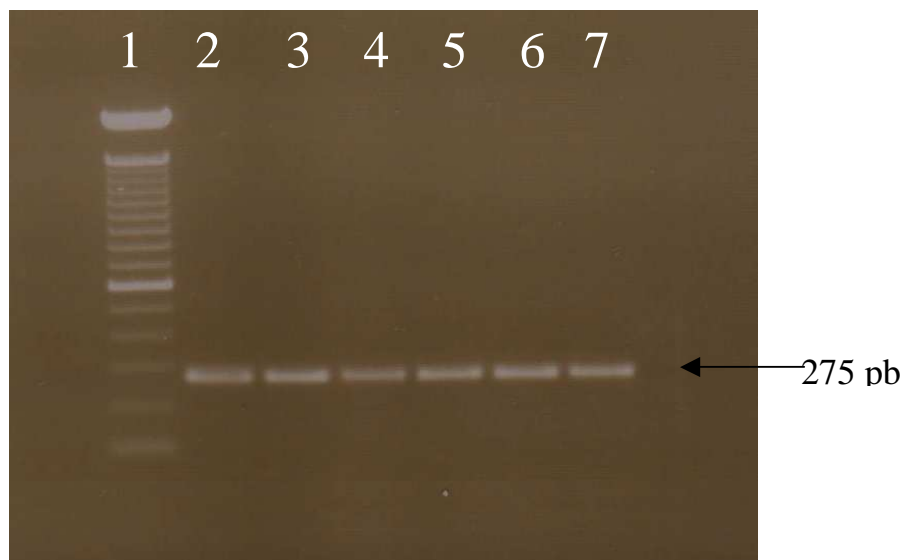


Figura 4: Foto demonstra a presença de produto de amplificação de 275 pb. obtido pela PCR do 16S rRNA. 1: Peso molecular 100 bp Ladder; 2: *E. faecalis* (SS 1273); 3: Q1/1; 4: Q1/2; 5: Q1 /3; 6: Q1/4 e 7: Q 1/ 5.

O desenvolvimento das metodologias baseadas na análise de ácidos nucléicos tais como PCR e a análise do 16S rRNA resultaram em novos métodos que podem ser utilizados para a análise genotípica bacteriana.

Rodrigues & Collins (1990), baseando-se na análise da seqüência do gene do 16S rRNA sugeriu que a espécie *Streptococcus saccharolyticus* deveria ser transferido para o gênero *Enterococcus*.

O iniciador PLO6 foi descrito pela primeira vez por GREISEN e colaboradores (1994) que o utilizaram entre outros, com o objetivo de desenvolver uma PCR do gene 16S rRNA para a identificação de diversas espécies de bactérias patogênicas, incluindo a maioria das espécies bacterianas encontradas no líquido cefalorraquidiano. O iniciador CAMPC5 foi desenvolvido por BLOM e colaboradores (1995) para a identificação de *Campylobacter fetus* através da hibridização com sonda específica após amplificação por PCR. Cardarelli-Leite e colaboradores (1996) utilizaram este par de iniciadores com o mesmo objetivo deste trabalho, para a identificação rápida de espécies de *Campylobacter* por PCR/RFLP do gene do 16SrRNA.

4.4.3.2. NÚMERO DE FRAGMENTOS OBTIDOS APÓS DIGESTÃO DO DNA DAS CEPAS DE REFERÊNCIA COM AS ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO.

O resultado dos perfis das cepas de referência, separados em grupos que apresentaram perfis idênticos, pode ser observado na tabela 5.

O **Grupo A** é representado pela espécie *E. faecalis* onde a digestão com as enzimas de restrição apresentou um perfil de 2 fragmentos para a enzima *Ddel*, 1 fragmento para a enzima *HaeIII* e 3 fragmentos para a enzima *Hinf I*.

O **Grupo B** é representado pelas espécies *E. Haemoperoxidus* e *E. moraviensis* onde a digestão com as enzimas de restrição apresentou um perfil de 2 fragmentos para a enzima *Ddel*, 2 fragmentos para a enzima *HaeIII* e 3 fragmentos para a enzima *Hinf I*.

O **Grupo C** é representado pelas espécies *E. avium*, *E. durans*, *E. gilvus*, *E. hirae*, *E. malodoratus*, *E. mundtii*, *E. pallens* e *E. raffinosus*, onde a digestão com

as enzimas de restrição apresentou um perfil de 3 fragmentos para a enzima *Ddel*, 1 fragmento para a enzima *HaeIII* e 3 fragmentos para a enzima *Hinf I*.

O **Grupo D** é representado pelas espécies *E. Asini*, *E.canis*, *E.casseliflavus*, *E. columbae*, *E. sulfureus*, *E. díspar*, *E. faecium*, *E. gallinarum* e *E. saccharolyticus*, onde a digestão com as enzimas de restrição apresentou um perfil de 3 fragmentos para a enzima *Ddel*, 1 fragmento para a enzima *HaeIII* e 2 fragmentos para a enzima *Hinf I*.

O **Grupo E** é representado pela espécie *E. rattii* onde a digestão com as enzimas de restrição apresentou um perfil de 3 fragmentos para a enzima *Ddel*, de 1 fragmento para a enzima *HaeIII* e de três fragmentos para a enzima *Hinf I*.

Na figura 5 podemos observar os 5 diferentes perfis obtidos, representados por cada grupo (A a E).

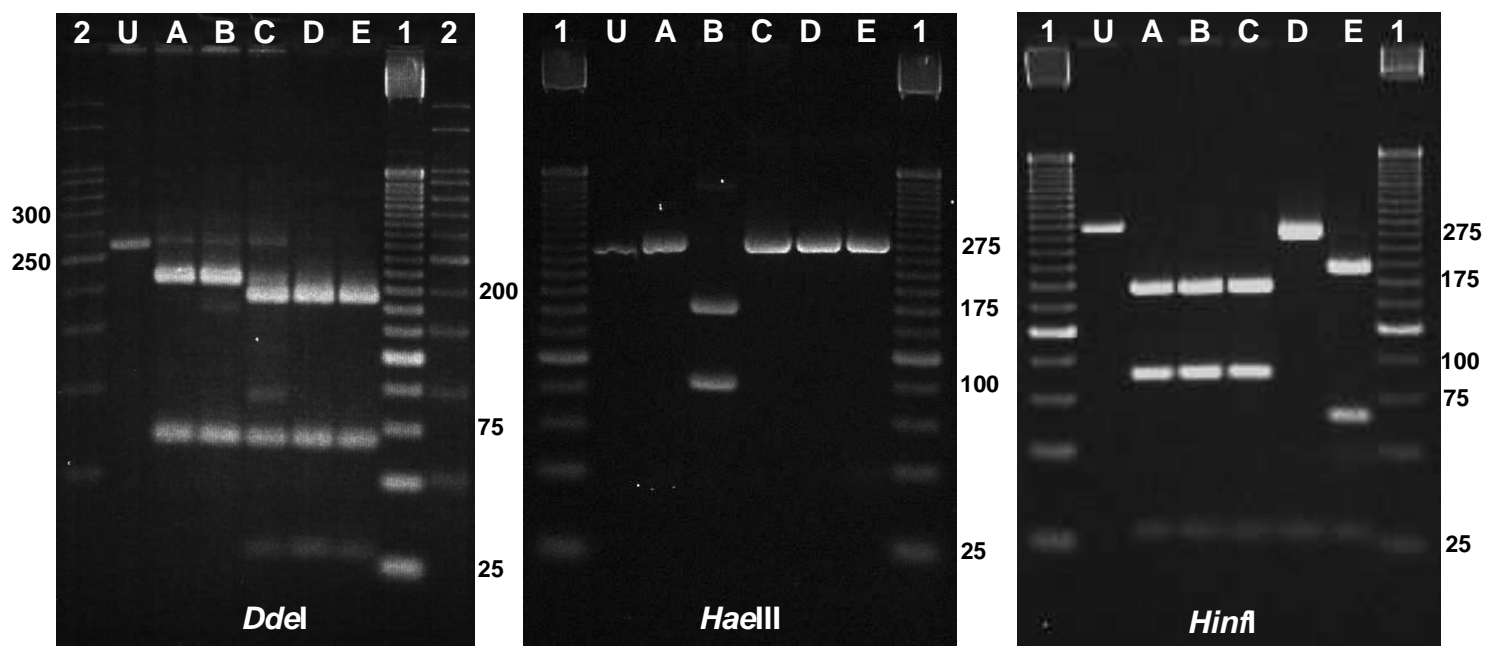


Figura 5: Foto ilustrativa dos géis de agarose obtidos após a PCR/RFLP representando os 5 diferentes grupos (A a E) obtidos por digestão do fragmento amplificado a partir do gene 16S rRNA de enterococos com as enzimas de restrição *Ddel*, *HaeIII* e *HinfI*.

1: Peso Molecular 25bp Ladder; 2: Peso Molecular 50bp Ladder; U: Fragmento amplificado de 275 pb não digerido; **A:** *E. faecalis* (SS1273) representando o grupo A; **B:** *E. haemoperoxidus* (SS1690) representando o grupo B; **C:** *E. avium* (SS559) representando o grupo C; **D:** *E. faecium* (SS1274) representando o grupo D; **E:** *E. ratti* (SS1494) representando o grupo E.

A partir dos fragmentos de restrição observados para as diferentes espécies de enterococos analisadas por PCR/RFLP foram estabelecidos os grupos representados na tabela 5.

Tabela 5: Grupos de PCR/RFLP estabelecidos após a digestão das cepas de referência com as enzimas de restrição, onde pode ser observado o número de fragmentos obtidos em cada grupo.

Grupo	Nº de fragmentos			Cepas de Referência
	<i>Ddel</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HinI</i>	Identificação PCR/RFLP
A	2	1	3a	<i>E. faecalis</i>
B	2	2	3a	<i>E. haemoperoxidus</i> <i>E. moraviensis</i>
C	3	1	3a	<i>E. avium</i> <i>E. durans</i> <i>E. gilvus</i> <i>E. hirae</i> <i>E. malodoratus</i> <i>E. mundtii</i> <i>E. pallens</i> <i>E. raffinosus</i>
D	3	1	2	<i>E. asini</i> <i>E. canis</i> <i>E. casseliflavus</i> <i>E. columbae</i> <i>E. sulfureus</i> <i>E. dispar</i> <i>E. faecium</i> <i>E. gallinarum</i> <i>E. saccharolyticus</i>
E	3	1	3b	<i>E. rattii</i>

4.4.3.3. RESULTADO DA TÉCNICA PCR/RFLP ASSOCIADA AOS TESTES BIOQUÍMICOS COM OS ISOLADOS BACTERIANOS DA COLEÇÃO DE ENTEROCOCOS DO LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR

Alem das cepas de referências foram também utilizados 54 isolados identificados através de testes fenotípicos como *Enterococcus* spp. pertencentes à coleção de amostras do Laboratório de Biologia Molecular / INCQS, sendo que neste grupo de isolados, “alguns” foram identificados ao nível de espécie apresentando perfis fisiológicos típicos e atípicos, bem como outros não apresentaram identificação pelo métodos convencionais utilizados.

A utilização desse isolados teve como objetivo certificar a especificidade da técnica PCR/RFLP aliada a algumas provas bioquímicas. Tanto os isolados com perfis típicos como os atípicos, e aqueles sem identificação, se encaixaram nos grupos estabelecidos pelas cepas de referência através da técnica PCR/RFLP e quando foram aliados aos testes bioquímicos específicos utilizados em cada grupo, chegou-se à identificação da espécie.

A identificação de todos os isolados utilizados neste estudo pela técnica PCR/RFLP associada com testes bioquímicos foi realizada de acordo com o esquema proposto na figura 6 .

Os resultados obtidos com os isolados da coleção de amostra do Laboratório de Biologia Molecular pode ser visto pela tabela 6.

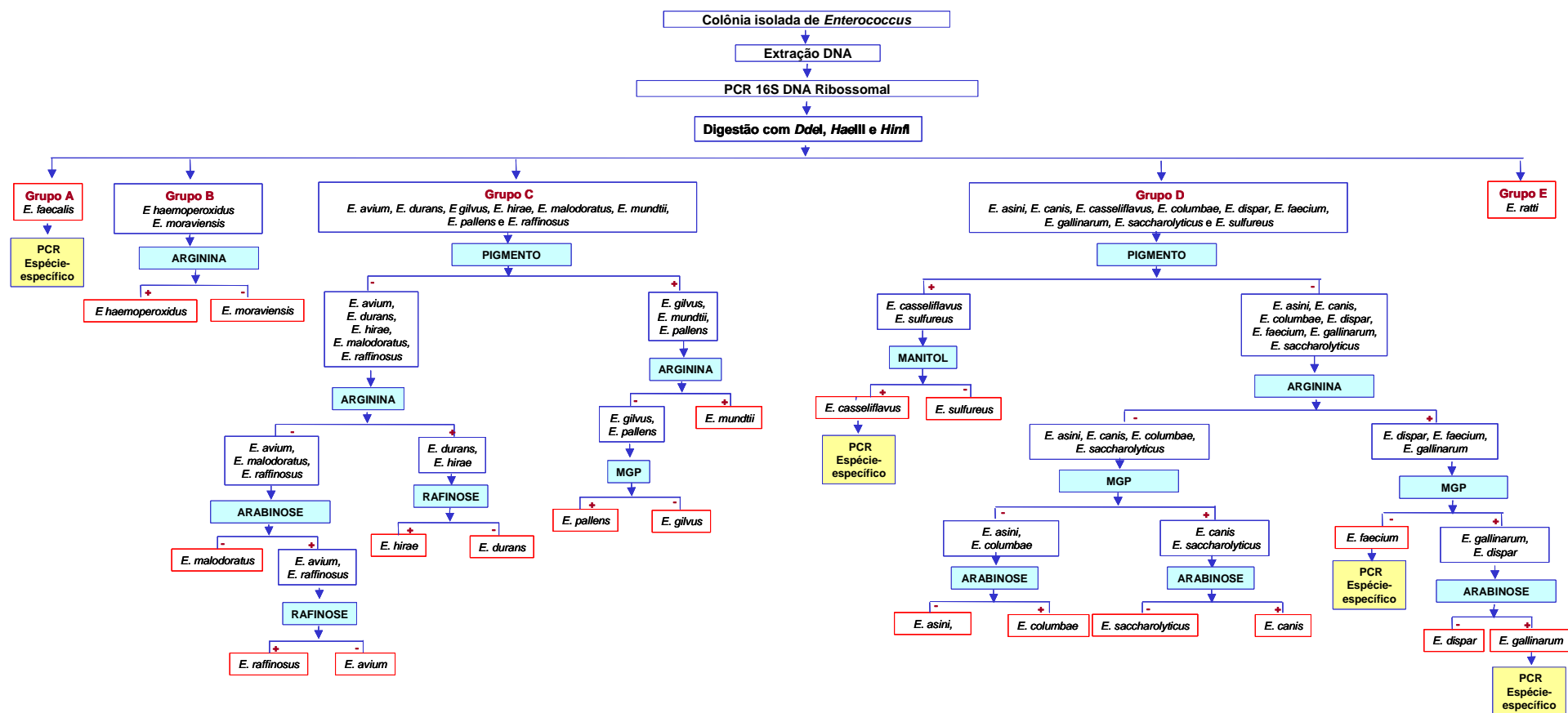


Figura 6: Utilização da PCR e PCR/RFLP aliada a alguns testes bioquímicos para diferenciação de espécies de enterococos.

* A PCR espécie-específica poderá ser utilizada para identificar *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus* e *E. gallinarum*

Tabela 6: Resultado da PCR/RFLP dos isolados (coleção de amostras) do setor de Biologia Molecular/INCQS.

GRUPO	ISOLADOS BACTERIANOS	IDENTIFICAÇÃO PCR/RFLP	IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA*
A	A2/2, A4/3, A4/8, A4/10, A11/8, A12/9, A22/5 e LPB3/2	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i> (perfil típico)
	A24/3 e LPB4/10.	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i> (perfil atípico)
	LPC24/1	<i>E. faecalis</i>	Sem identificação
B	A3/5 e A3/7	<i>E. haemoperoxidus</i>	<i>E. haemoperoxidus</i> (perfil atípico)
	A19/3, A20/2P e A20/5	<i>E. haemoperoxidus</i>	Sem identificação
C	A1/5	<i>E. gilvus</i>	<i>E. gilvus</i> (perfil típico)
	A1/3, A1/10, A5/1, A7/5, A7/6, e A13/2	<i>E. gilvus</i>	<i>E. gilvus</i> (perfil atípico)
	A14/3, A14/4 e A21/5	<i>E. hirae</i>	<i>E. hirae</i> (perfil atípico)
	A1/7, A3/3 e A7/3	<i>E. malodoratus</i>	Sem identificação
	LPC7/8	<i>E. pallens</i>	Sem identificação
	A8/3	<i>E. hirae</i>	Sem identificação
D	A2/4 e A5/7	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. gallinarum</i> (perfil típico)
	A5/7 e LPC6/2	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. gallinarum</i> (perfil atípico)
	A4/6, A5/2, A5/4, A5/10, A5/1, A5/8 e LPC10/9	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. casseliflavus</i> (perfil típico)
	A2/6, A12/5, A21/1G e A21/3	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. casseliflavus</i> (perfil atípico)
	A3/6	<i>E. durans</i>	<i>E. durans</i> (perfil atípico)
	A3/9A, A3/10 e A20/1G	<i>E. sulfureus</i>	<i>E. sulfureus</i> (perfil atípico)
	A2/10 e A4/7	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i> (perfil típico)
	A3/9B e A20/4	<i>E. sulfureus</i>	Sem identificação

*Os resultados da identificação fenotípica dos isolados de enterococos foram obtidos através do banco de dados do Laboratório de Biologia Molecular do departamento de Microbiologia / INCQS.

4.5. APLICAÇÃO DA TÉCNICA PCR/RFLP ASSOCIADA A TESTES BIOQUÍMICOS COM OS ISOLADOS DO QUEIJO MINAS TIPO FRESCAL

Após a padronização da técnica utilizando-se as cepas de referência, bem como os isolados de *Enterococcus* pertencentes à coleção de amostras do

Laboratório de Biologia Molecular/INCQS, utilizamos a técnica PCR/RFLP nos isolados dos queijos Minas tipo frescal em estudo. A utilização dos queijos Minas tipo frescal como matriz neste estudo teve como objetivo obter isolados caracterizados como *Enterococcus* e utilizar PCR/RFLP para verificar a eficácia desta técnica com as amostras desconhecidas.

Dos 21 isolados oriundos do queijo Minas tipo frescal obtivemos resultados fenotípicos típicos e atípicos e todos foram submetidos ao teste PCR/RFLP e quando associados a alguns testes bioquímicos foi possível chegar espécie. Este resultado pode ser observado através da tabela 7.

Tabela 7: Resultado da PCR/RFLP dos isolados bacterianos obtidos de queijo Minas tipo frescal.

GRUPO	ISOLADOS BACTERIANOS	IDENTIFICAÇÃO PCR/RFLP	IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA
A	Q3/1 e Q3/4	<i>E.faecalis</i>	<i>E.faecalis</i> (perfil típico)
	Q1/1, Q1/2, Q1/3, Q1/4, Q1/5, Q5/1, Q5/2, Q5/3, Q5/4 e Q5/5	<i>E.faecalis</i>	<i>E.faecalis</i> (perfil atípico)
C	Q4/3	<i>E.faecium</i>	<i>E.faecium</i> (perfil típico)
	Q3/2, Q3/5, Q4/2, Q4/4 e Q4/5	<i>E.faecium</i>	<i>E.faecium</i> (perfil atípico)
D	Q2/2 e Q2/3	<i>E.casseliflavus</i>	<i>E.casseliflavus</i> (perfil típico)
	Q4/1	<i>E.gallinarum</i>	<i>E.gallinarum</i> (perfil atípico)

Neste estudo, a técnica da PCR/RFLP aliada a algumas provas bioquímicas mostrou-se simples, eficiente e rápida, para a identificação das espécies de *Enterococcus*, principalmente quando algumas provas bioquímicas não coincidem com a literatura disponível estabelecida para isolados procedentes de material clínico, dificultando a interpretação dos resultados.

Jayarão e colaboradores (1992) realizaram um estudo com bactérias, entre elas *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Aerococcus* de origem bovina, que foram diferenciadas utilizando a técnica da RFLP. Neste estudo, comprovou-se que a identificação de espécies de estreptococos e enterococos de origem bovina poderia ser possível utilizando-se o fragmento 16S rDNA como uma alternativa para a identificação com base nas características fenotípicas.

Da mesma forma, Cardarelli-Leite e colaboradores (1996) utilizaram o método PCR/RFLP para uma identificação rápida das espécies do gênero *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* e *Wolinella*. O método revelou-se sensível e altamente confiável sendo utilizado com sucesso para os isolados bacterianos deste trabalho.

Partis e colaboradores (2000) utilizaram a técnica PCR-RFLP para avaliar sua adequação como instrumento analítico rotineiro para identificação de espécies provenientes de carne, confirmando a excelência desta técnica em produtos de origem animal.

Sousa e colaboradores (2003) analisaram a região 16S do DNA mitocondrial em populações de *Melipona rufiventris* (abelha) do Espírito Santo. Neste trabalho comparou-se a eficiência das técnicas moleculares SSPC (Single Strand Conformation Polymorfim), PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorfism), e DS-PCR (Double-Stringency Polimerase Chain Reaction). A técnica PCR-RFLP demonstrou ser sensível para detectar alterações resultantes de mutações entre as espécies *Melipona rufiventris* e *Melipona compressipes*.

4.6. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DE DNA DAS ESPÉCIES DE ENTEROCOCCUS ESTUDADAS DEPOSITADAS NO GenBank

As sequências dos gene 16S rRNA das espécies de enterococos depositadas no GenBank de acordo com o item 3.8, foram alinhadas entre si e com os iniciadores PLO6 e CAMPC5 através do programa CLUSTAL2.0.10 multiple sequence alignment, disponível em <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>.

O fragmento de 275 pb do gene 16S rRNA amplificado pela PCR foi localizado na região compreendida entre o nucleotídeo 1079 e 1355. Utilizamos como exemplo o gene 16S rRNA do *E. casseliflavus*:

DEFINITION *Enterococcus casseliflavus* strain ELS3 16S ribosomal RNA gene, complete sequence. ACCESSION EF199997

```
1 gacgaacgct ggcggcgtgc ctaatacatg caagtcgaac gctttttctt tcaccggagc
61 ttgctccacc gaaagaaaaa gaggggcgaa cgggtgagta acacgtgggt aacctgcca
121 tcagaagggg ataacacttg gaaacaggtg ctaataccgt ataacactat tttcgcgatg
181 gaagaaagtt gaaaggcgct tttgcgtcac tgatggatgg acccgcggtg cattagctag
241 ttggtgaggt aacggctcac caaggcaacg atgcatagcc gacctgagag ggtgatcggc
301 cacactggga ctgagacacg gcccgagact tacgggagggc agcacagtag ggaatcttcg
```

```

361 gcaatggacg aaagtctgac cgagcaacgc cgcgtgagtg aagaaggttt tcggatcgta
421 aaactctggt gttagagaag aacaaggatg agagtaaaat gttcatccct tgacggtatc
481 taaccagaaa gccacggcta actacgtgcc agcagccgcg gtaatacgta ggtggcaagc
541 gttgtccgga ttatttgggc gtaaagcgag cgcaggcggg ttcttaagtc tgatgtgaaa
601 gccccggct caaccgggga gggtcattgg aaactgggag acttgagtgc agaagaggag
661 agtggaaattc catgtgtagc ggtgaaatgc gtagatataat ggaggaacac cagtggcgaa
721 ggcggctctc tggctctgtaa ctgacgtgta ggctcgaaag cgtgggggagc gaacaggatt
781 agataccctg gtagtccacg ccgtaaacga tgagtgctaa gtgttgagg gtttccgccc
841 ttcagtgtctg cagcaaacgc attaagcact ccgcctgggg agtacgaccg caagtgaaa
901 ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cgggtgggagc atgtggttta attcgaagca
961 acgggaagaa cttaccagg tcttgacatc ctttgaccac tctagagata gagcttcccc

```

PLO6

→

```

1021 ttcggggcaa agtgacaggt ggtgcatggt tgtcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg
1081 ttaagtcccg caacgagcgc aacccttatt gttagttgcc atcatttagt tgggcactct
1141 agcgagactg ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg acgtcaaadc atcatgcccc
1201 ttatgacctg ggctacacac gtgctacaat gggaaagtaca acgagttgag aagtgcgag
1261 gctaagctaa tctcttaaag cttctctcag ttcgattgt aggctgcaac tcgctacat
1321 gaagccggaa tcgctagtaa tcgcgatca gcacgccgag gtgaatacgt tcccgggctc

```

←

CAMPC5

```

1381 tgtacacacc gccgctcaca ccacgagagt ttgtaacacc cgaagtcggt gaggtaacct
1441 ttttgggcca gccgcttaag gtgggataga ttattggggg taatgtctgt aaaaagtag
1501 cgtatcggg ggg

```

GREISEN e colaboradores (1994) desenvolveram o iniciador PLO6, entre outros, com o objetivo de desenvolver uma PCR do gene do 16S rRNA para a identificação de diversas espécies de bactérias patogênicas, incluindo a maioria das espécies bacterianas encontradas no líquido cefalorraquidiano. Neste trabalho, a região da sequência amplificada com este iniciador para 32 espécies bacterianas inicia-se na região correspondente ao nucleotídeo 1088 do gene do 16S rRNA da *E. coli*, correspondendo aproximadamente do nosso trabalho.

O alinhamento das sequências de enterococos analisadas forneceu o seguinte resultado para o fragmento de 275pb amplificado pela PCR:

PLO6	GGTTAAGTCCC	GCAACGAGCGC-----	22
<i>E.columbae</i>	GGTTAAGTCCC	GCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATT	CAGTTGGGCACT 60
<i>E.asini</i>	GGTTAAGTCCC	GCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATT	CAGTTGGGCACT 60
<i>E.faecium</i>	GGTTAAGTCCC	GCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATT	CAGTTGGGCACT 60
<i>E.ratti</i>	GGTTAAGTCCC	GCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACT	60
<i>E.hirae</i>	GGTTAAGTCCC	GCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATT	TAGTTGGGCACT 60
<i>E.mundtii</i>	GGTTAAGTCCC	GCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATT	TAGTTGGGCACT 60
<i>E.durans</i>	GGTTAAGTCCC	GCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATT	CAGTTGGGCACT 60
<i>E.dispar</i>	GGTTAAGTCCC	GCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATT	TAGTTGGGCACT 60
<i>E.gallinarum</i>	GGTTAAGTCCC	GCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATT	TAGTTGGGCACT 60

E.casseliflavus GGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACT 60
E.canis GGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACT 60
E.saccharolyticus GGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACT 60
E.sulfureus GGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACT 60
E.raffinosis GGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACT 60
E.pallens GGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACT 60
E.gilvus GGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACT 60
E.avium GGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACA 60
E.malodoratus GGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACT 60
E.haemoperoxidus GGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTCAGTTGGGCACT 60
E.moraviensis GGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACT 60
E.faecalis GGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACT 60

E.columbae CTAGCGAGACTGCCGCA GACAAATGCGGAGGAA-GGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC 119
E.asini CTAGCGAGACTGCCGCGTGACAAACCGGAGGAA-GGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC 119
E.faecium CTAGCAAGACTGCCGCGTGACAAACCGGAGGAA-GGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC 119
E.ratti CTAGCAAGACTGCCGCGTGACAAACCGGAGGAA-GGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC 119
E.hirae CTAGCAAGACTGCCGCGTGACAAACCGGAGGAA-GGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC 119
E.mundtii CTAGCAAGACTGCCGCGTGACAAACCGGAGGAA-GGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC 119
E.durans CTAGCAAGACTGCCGCGTGACAAACCGGAGGAA-GGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC 119
E.dispar CTAGCGAGACTGCCGCGTGACAAACCGGAGGAA-GGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC 119
E.gallinarum CTAGCGAGACTGCCGCGTGACAAACCGGAGGAA-GGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC 119
E.casseliflavus CTAGCGAGACTGCCGCGTGACAAACCGGAGGAA-GGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC 119
E.canis CTAGCGAGACTGCCGCGTGACAAACCGGAGGAA-GGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC 119
E.saccharolyticus CTAGCGAGACTGCCGCGTGACAAACCGGAGGAA-GGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC 119
E.sulfureus CTAGCGAGACTGCCGCGTGACAAACCGGAGGAA-GGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC 119
E.raffinosis CTAGCGAGACTGCCGCGTGACAAACCGGAGGAA-GGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC 119
E.pallens CTAGCGAGACTGCCGCGTGACAAACCGGAGGAA-GGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC 119
E.gilvus CTAGCGAGACTGCCGCGTGACAAACCGGAGGAA-GGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC 119
E.avium CTAGCGAGACTGCCGCGTGACAAACCGGAGGAA-GGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC 119
E.malodoratus CTAGCGAGACTGCCGCGTGACAAACCGGAGGAA-GGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC 119
E.haemoperoxidus CTAGCGAGACTGCCGCGTGACAAACCGGAGGAA-GGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC 119
E.moraviensis CTAGCGAGACTGCCGCGTGACAAACCGKAGGAAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC 120
E.faecalis CTAGCGAGACTGCCGCGTGACAAACCGGAGGAA-GGTGGGGATGACGTCAATCATCATGC 119

E.columbae CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGAGAGTACAACGAGTTGCGAAGTCGT 179
E.asini CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAAGTCGC 179
E.faecium CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAAGTCGC 179
E.ratti CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTACGGAAGTCGC 179
E.hirae CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTACGAAAAGTCGC 179
E.mundtii CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTACGGAAGTCGC 179
E.durans CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTACGGAAGTCGC 179
E.dispar CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAAGTCGC 179
E.gallinarum CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAAGTCGC 179
E.casseliflavus CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAAGTCGC 179
E.canis CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAAGTCGC 179
E.saccharolyticus CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAAGTCGC 179
E.sulfureus CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAAGTCGC 179
E.raffinosis CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTACGGAAGTCGC 179

E.pallens CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGT**C**GCGAAGTCGC 179
E.gilvus CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGT**C**GCGAAGTCGC 179
E.avium CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGT**C**GCGAAGTCGC 179
E.malodoratus CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGT**C**GCGAAGTCGC 179
E.haemoperoxidus CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGT**C**GCTAGGCCGC 179
E.moraviensis CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGT**C**GCTAGGCCGC 180
E.faecalis CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGT**C**GCTAGGCCGC 179

E.columbae GAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTC**T**TCTCAGTTCGGATTG**T**AGGCTGCAACTCGCCTA 239
E.asini GAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTG**C**AGGCTGCAACTCGCCT**G** 239
E.faecium GAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTG**C**AGGCTGCAACTCGCCT**G** 239
E.ratti AAGGCTAAGCGAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTG**C**AGGCTGCAACTCGCCT**G** 239
E.hirae GAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTA 239
E.mundtii GAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTA 239
E.durans GAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTA 239
E.dispar GAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTA 239
E.gallinarum GAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTA 239
E.casseliflavus GAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTA 239
E.canis GAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTA 239
E.saccharolyticus GAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTA 239
E.sulfureus GAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGTTTCTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTA 239
E.raffinosis GAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTA 239
E.pallens GAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTA 239
E.gilvus GAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTA 239
E.avium GAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTA 239
E.malodoratus GAGG**N**TAAAGCTAAT**N**TCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTA 239
E.haemoperoxidus GAGG**T**CAT**G**CAA**A**TCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTA 239
E.moraviensis GAGG**T**CAT**G**CAA**A**TCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTA 240
E.faecalis GAGG**T**CAT**G**CAA**A**TCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCT**G** 239

E.columbae CATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCA 275
E.asini CATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCA 275
E.faecium CATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCA 275
E.ratti CATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCA 275
E.hirae CATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCA 275
E.mundtii CATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCA 275
E.durans CATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCA 275
E.dispar CATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCA 275
E.gallinarum CATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCA 275
E.casseliflavus CATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCA 275
E.canis CATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCA 275
E.saccharolyticus CATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCA 275
E.sulfureus CATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCA 275
E.raffinosis CATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCA 275
E.pallens CATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCA 275
E.gilvus CATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCA 275
E.avium CATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCA 275
E.malodoratus CATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCA 275
E.haemoperoxidus CATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCA 275

```
E.moraviensis   CATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCA 276
E.faecalis     CATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCA 275
CAMPC5          -- -----ATCGCTAGTAATCGTAGATCAGCC 24
```

O programa NEBCutter2.0 (item 3.8) foi utilizado para a construção de mapas de restrição dos fragmentos de 275 pb do 16SrRNA (amplificados por PCR com os iniciadores PLO6 e CAMPC5) com as enzimas *DdeI*, *HaeIII* e *HinfI*, a partir de algumas sequências selecionadas no GenBank que representam as diferentes espécies de enterococos divididos em grupos de acordo com o fluxograma da figura 6.

Os esquemas de restrição estão representados na figura 7.

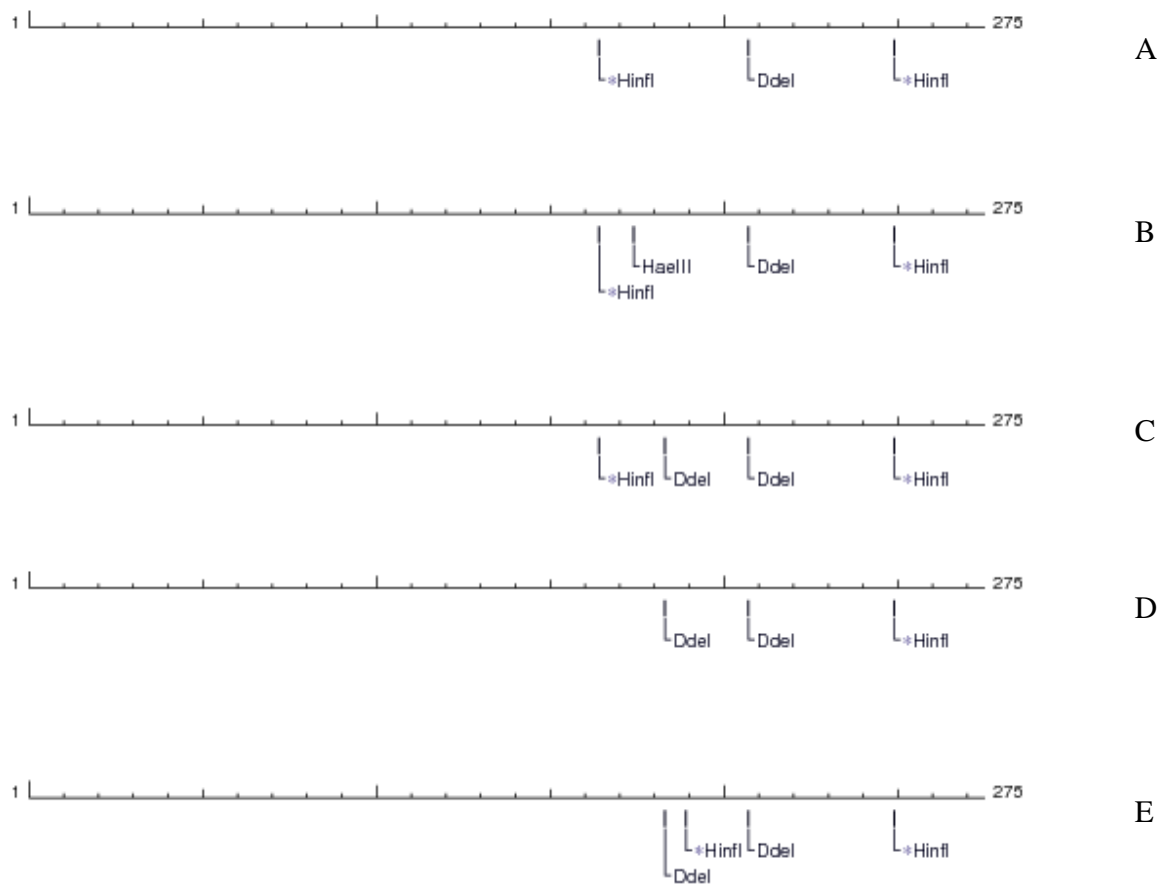


Figura7: Mapa de restrição obtido a partir de algumas sequências de enterococos depositadas no GenBank representando os grupos PCR/RFLP.

A: *Enterococcus faecalis* SS1273 representando o grupo A; **B:** *Enterococcus haemoperoxidus* SS1690 representando o grupo B; **C:** *Enterococcus avium* SS559 representando o grupo C; **D:** *Enterococcus faecium* SS1274 representando o grupo D; **E:** *Enterococcus ratti* SS1494 representando o grupo E.

Os esquemas de restrição apresentados na figura 7 forneceram os tamanhos em pb dos fragmentos obtidos após a digestão com as enzimas de restrição *DdeI*, *HaeIII* e *Hinfl* para cada grupo PCR/RFLP de enterococos (Tabela 8).

Tabela 8: Tamanho dos fragmentos (em pb) obtidos após a digestão das enzimas de restrição:

GRUPOS	Enzimas de Restrição		
	<i>Ddel</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HinfI</i>
A	208 / 67	0	165 / 85 / 25
B	208 / 67	175 / 100	165 / 85 / 25
C	184 / 67 / 24	0	165 / 85 / 25
D	184 / 67 / 24	0	250 / 25
E	184 / 67 / 24	0	190 / 60 / 25

Estes dados coincidem com as imagens obtidas experimentalmente (Figura 5) confirmando que existe uma variabilidade dentro desta região do gene 16S rRNA que pode ser considerada específica para os grupos de espécies de enterococos estabelecidos.

CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

A técnica da PCR/RFLP aliada a algumas provas bioquímicas demonstrou ser simples, eficiente e rápida para a identificação das espécies de enterococos, quando algumas provas bioquímicas apresentaram resultados atípicos diante da literatura, dificultando interpretação dos resultados.

Neste estudo, 5 grupos (A a E) com perfis distintos de restrição foram obtidos por PCR/RFLP após a digestão com as endonucleases de restrição *DdeI*, *HaeIII* e *HinfI* do fragmento de 275 pb, amplificado após PCR específico do gene do 16SrRNA das diferentes cepas de referência de enterococos. A confirmação destes resultados foi obtida com a utilização dos 54 isolados de *Enterococcus* spp pertencentes à coleção de amostras bacterianas do Laboratório de Biologia molecular, no qual todos se encaixaram em um dos 5 grupos. Após a associação da técnica da PCR/RFLP com alguns testes bioquímicos, todos os isolados foram diferenciados quanto à espécie.

Os perfis de restrição específicos observados nos grupos determinados neste trabalho foram confirmados após comparação com as sequências do gene 16SrRNA das diferentes espécies de enterococos depositados no GenBank.

Em todas as amostras de queijo Minas tipo frescal foram encontrados isolados bacterianos do gênero *Enterococcus*.

Todas as amostras bacterianas de enterococos isoladas das amostras de queijo Minas tipo frescal foram identificadas com maior rapidez e precisão pela técnica da PCR/RFLP associada a algumas provas bioquímicas, quando comparadas aos esquemas de caracterização fenotípica clássica.

Das espécies identificadas nas amostras de queijo Minas tipo frescal houve uma predominância da espécie *E. faecalis* seguida pela *E. faecium*, confirmando dados obtidos na literatura.

Dos doze *E. faecalis* isolados do Minas tipo frescal, dez deles quando submetidos aos testes para identificação fenotípica, apresentaram atípia fisiológica no teste MGP.

Dos seis *E. faecium* isolados, cinco apresentaram atípia fisiológica quando submetidos ao teste utilizando o telurito de K, e o *E. gallinarum* isolado também apresentou atípia fisiológica para este mesmo teste, confirmando as dificuldades

da identificação destes microrganismos quando baseados apenas em testes fenotípicos.

A técnica padronizada neste trabalho pode ser proposta para a rotina de identificação de *Enterococcus* spp. em laboratórios de saúde pública.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ANDREWS, W. H. & JUNE, G. A. Food Sampling and Preparation of homogenate, Ch. 1. In: **Food and drug Administration Bacteriological Analytical Manual**, 8th ed. (revision A), R. L. Merker (Ed.), AOAC International, Gaithersburg, MD. 1998.

ARIHARA, K., CASSENS, R. G. & LUCHANSKY, J. B. Characterization of bacteriocins from *Enterococcus faecium* with activity against *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**. V.19, p.123-134, 1993.

BAKER, G. C., BEEBEE, T. J. C. & RAGAN, M. A. *Prototheca richardsi* , a pathogen of anuran larvae, is related to a clade of protistan parasites near the animal-fungal divergence. **Microbiology**. V.145, p. 1777 - 1784, 1999.

BAKER, G. C., GAFFER, S., COWAN, D. A. & SUHARTO, A. R. Bacterial community analysis of Indonesian hot springs. **FEMS Microbiology Lett** . V. 200, p. 103-109, 2001.

BATES, J., JORDENS, J. Z. & GRIFFITHS, D. T. Farm animals as a putative reservoir for vancomycin-resistant enterococcal infection in man. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. V. 34, p. 507-516, 1994.

BLOM, K., PATTON, C. M., NICHOLSON, M. A. & SWAMINATHAN, B. Identification of *Campylobacter fetus* by PCR-DNA probe method. **Journal of Clinical Microbiology**, V. 33, No. 5 , p. 1360–1362,1995.

BOYCE, J.M. Vancomycin-resistant *Enterococcus*. Detection, epidemiology, and control measures. **Infectious Disease Clinical North America**. V. 11, p. 367-384,1997.

BONTEN, M. J. M.; WILLEMS, R. & WEISTEIN, R. A. Vancomycin-resistant *Enterococci*: why are they here, and where do they come from? *The Lancet Infectious Diseases*. V. 1, p.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. *Journal of Clinical Microbiology*, V 18, p.275 – 1277, 1983..

BRASIL, 2006. Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frangos – PREBAF. Relatório de curso e reunião geral do PREBAF. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/prebaf_04_06. Acesso em 20 de dezembro de 2007.

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

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, 1997. Ministério da Agricultura e do abastecimento. Coordenadoria de Defesa Agropecuária (CDA). Portaria n ° 352, 4 de Setembro de 1997. O ministério do Estado da Agricultura e de abastecimento institui o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do queijo Minas tipo frescal. Diário Oficial [da] **Republica Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, Set 1997^a. Disponível em <http://www.cda.sp.gov.br/www/legislações>. Acesso em: 15 de Janeiro de 2008.

BRASIL, 1990. Lei nº8.080 de 19 de setembro de 2003. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. Disponível em: <http://www.portal.saúde.gov.br>. Acesso em 23 de Maio de 2007.

CARDARELLI-LEITE, P., BLOM, K., PATTON, C.M., NICHOLSON, M.A., STEIGERWALT, A. G., HUNTER, S. B., BRENER, D. J., BARRETT, T. J. & SWAMINATHAN, B. Rapid identification of *Campylobacter* species by restriction fragment length polymorphism analysis of a PCR- amplified fragment of the gene coding for 16S rRNA. **Journal Clinical Microbiology**. P. 62 – 67, 1996.

CASALTA, E. & ZENNARO, R. Effect of specific starters on microbiological, biochemical and sensory characteristics of Venaco, a Corsican soft cheese. **Sciences des Aliments**. V.17, p. 79-94, 1997.

CENTENO, J. A., MENENDEZ, S., HERMIDA, M. A. & RODRIGUES - OTERO, J. L. Effects of the addition of *Enterococcus faecalis* in Cebreiro cheese manufacture. **International Journal of Food Microbiology**. V. 48, p. 97-111, 1999.

CHADWICK , P. R., WOODFORD, N., KACZMARSKI, E. B., GRAY, S., BARREL, R. S. & OPPENHEIN, B. A. Glycopeptide-resistant *enterococci* isolated from uncooked meat. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. V. 38, p. 908-909, 1996.

CHINGWARU, W., MPUCHANE,S.F., GASHE,B.A. *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from milk, beef, and chicken and their antibiotic resistance. **Jornal of Food Protection**, Vol.66, N°6, p.931 - 936, 2003.

DAS, I., FRAISE, A. & WISE, R. Are glycopeptide-resistant *enterococci* in animal a threat to human beings? **The Lancet**. V. 349, p. 997-998, 1997.

D`AZEVEDO P.A, CANTARELLI V., INAMINE, E., SUPERTI, S. & DIAS, C. A. G. Avaliação de um sistema automatizado na identificação na espécie de *Enterococcus*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. V. 40, nº. 4, P.237- 239, 2004.

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. Applied Microbiology**, 23: 510 - 522, 2000.

DELGADO, R.L.C. & TORRES, D.J.M. Evaluación bacteriológica de quesos frescos artesanales comercializados en Lima, Perú, y la supuesta acción bactericida de *Lactobacillus* spp. **Revista Panamericana de salud Publica** Vol.14 nº3, Washington Sept. 2003.

DOMIG, K.J., MAYER, H.K. & W. KNEIFEL, Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp.: 1. Media for isolation and enumeration. **International Journal of Food Microbiology**. V.88, n. 2 -3, p. 147-164, 2003.

DRIVER, D., FIMLAND, G., HÉCHARD, Y., Mc MULLEN, L.M., PRÉVOST, H. The continuing story of class IIa bacteriocins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v 70, p.564-582, 2006.

DUTKA-MALEN. S., EVERS, S. & COURVALIN, P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant Enterococci by PCR. **Journal Clinical Microbiology**, V 33 (1), p. 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. **Applied Environmental Microbiology**, V.67, p. 4385 – 4389, 2001.

ELSAS, J. D. VAN, DUARTE, G.F., ROSADO, A.S. & SMALLA, K. Microbiological and molecular biological methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the soil environment. **Journal of Microbiological Methods**, Washington, DC, v32, p.133-154, 1998.

ELIOPOULOS G.M., WENNERSTEN C.B., GOLD H.S., SCHULIN T., SOULI M. & FARRIS M.G. Characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*

isolates from the United States and their susceptibility in vitro to dalfopristina-quinupristina. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. V. 42, p. 1088-1092, 1998.

FACKLAM, R. R. & COLLINS, M. D. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. **Journal Clinical Microbiology**. V.27. p. 731 – 734 ,1989.

FACKLAM, R. R. & TEIXEIRA, L. M. *Enterococcus*. In: COLLIER, L.; BALOWS, A.; SUSSMAN, M. (Eds.). **Topley and Wilson's microbiology and microbial infections**. 9. ed. Edward Arnold. London: United Kingdom. P. 669 - 682, 1997.

FACKLAM, R. R., SAHM, M. D. & TEIXEIRA, L. M. *Enterococcus*. In: Murray, B. E., BARON, E. J., PFALLER, M. A., TENOVER, F. C., YOLKEN, R. H. (eds.) Manual of Clinical Microbiology, 7th ed. **American Society for Microbiology Press**. Washington DC, EUA, p. 297 - 305, 1999.

FERRE, F. Quantitative or semi-quantitative PCR: reality versus myth. **PCR Methods Application**. V. 2, p. 1 - 9, 1992.

FRACALANZZA, S. A. P., SCHEIDEGGER, E.M.D., SANTOS, P.F., LEITE, P.C. & TEIXEIRA, L.M. Antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from poultry meat and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol.102 (7): 853-859, November 2007.

FRACALANZZA, S. A. P. **Identificação, resistência a antimicrobianos e caracterização molecular de *Enterococcus* isolados de alimentos**. 158p. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2007.

FRANZ, C., STILES, M. E., SCHLEIFER, K. H. & HOLZAPFEL, W. H. *Enterococci* in foods — a conundrum for food safety. **International Journal of Food Microbiology**. V. 88 (2 – 3), p. 105-122, 2003.

FRANZ, C. M. A. P., HOLZAPFEL, W. H. & STILES, M. E. *Enterococci at crossroads of food safety?* **International Journal of Food Microbiology**. V. 47, p.1 -24, 1999.

FURTADO, G. H. C., MARTINS, S. T., COUTINHO, A. P., SOARES, G. M. M.; WEY, S. B. & MEDEIROS, E. A. S. Incidência de *Enterococcus* resistente à vancomicina em hospital universitário no Brasil, **Revista Saúde Pública**. V. 39, n.1, 2005.

GELSOMINO, R., VANCANNEYT, M., CONDON, S., SWINGS, J. & COGAN, T. M. Enterococcal diversity in the cheesemaking environment of an Irish Cheddar-type cheesemaking factory. **International Journal of Food Microbiology**. V.71, p.177-188, 2001

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

GIRAFFA, G. Enterococcal bacteriocins: their potencial use as anti-Listeria factors in dairy technology, **Academic Press**, London. V. I2, p. 617 - 624,1995.

GIRAFFA, G. & CARMINATI, D. Control of *Listeria monocytogenes* in the rind of Taleggio, a surface-smear cheese, by a bacteriocin from *Enterococcus faecium* 7CS. **Sciences des Aliments**. V.17, p. 383 - 391,1997.

GIRAFFA, G. *Enterococcus*. In: ROBINSON, R., BATT, C. & PATEL, P. (eds), **Encyclopedia of Food Microbiology Academic Press**, London.V.1, p. 617-624,1999.

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

GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, V. 88, p. 215-222, 2003.

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

GOLD H. S. Vancomycin - resistant *enterococci*: mechanisms and clinical observations. **Clinical Infection Disease**. V. 33 , p.210 - 219, 2001.

GOMES, B. C. **Enterococos em amostras de alimentos e água: Avaliação da virulência e do desempenho como indicadores de higiene**. São Paulo: USP, 2007.151p. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo.

GOMES, C. B., ESTEVES T.C., PALAZZO, C.V. I., DARINI, C. A . L., FELIS, G.E., SECHI, A.L., FRANCO, D.G.M.B., DE MARTINIS, C.P.E. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. **Food Microbiology**. V 25, p. 668 – 675, 2008.

GORDTS, B., VAN LANDUYT, H., IEVEN, M., VANDAMME, P. & GOOSSENS, H. Vancomycin-resistant enterococci colonizing the intestinal tracts of hospitalized patients. **Journal Clinical Microbiology**. V. 33, p. 2842-2846, 1995.

GREISEN, K., LOEFFELHOLZ, M., PUROHIT, A.& LEONG, D. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. **Journal of Clinical Microbiology**, V. 32, p. 335-351, 1994.

HOEBEN, J. H. The potencial of vancomycin-resistant enterococci to persist in fermented and pasteurized meat products. **International Journal Food Microbiology**, v. 88, p. 11-18, 2003.

HORNER, R., LISCANO, M. G. H., MARASCHIN, M. M., MENEGHETTI, A .B., FORNO, N. L. F. D. & RIGHI, R. A. Susceptibilidade antimicrobiana entre amostras de *Enterococcus* isoladas no Hospital Universitário de Santa Maria. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, vol.41, N 6 Rio de janeiro. Dezembro de 2005.

IVERSEN, A., KÜHN, I., FRANKLIN, A. & MÖLBY, R. High prevalence of vancomycin resistant enterococci in Swedish sewage. **Applied and Environmental Microbiology**, V 68, p. 2838 – 2842, 2002.

JAYARÃO, B. M, DORE, J. J. E. JR., & OLIVER, S. P. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of 16S Ribosomal DNA of Streptococcus and *Enterococcus* Species of Bovine Origin. **Journal of Clinical Microbiology**, V. 30, N. 9, p. 2235-2240, 1992.

JETT, B. D., HUYPKE, M. M. & GILMORE, M. S. Virulence of enterococci. **Clinical Microbiology Reviews** [PubMed];., 7 (4), p. 462 – 478, 1994.

JORDENS, J. Z., BATES, J. & GRIFFITHS, D. T. Faecal carriage and nosocomial spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. **Journal Antimicrobiol Chemotherapy**. V. 34, p. 515 - 528, 1994.

JUNIOR, FABIO BUENO DOS REIS et al . Uso de ferramentas moleculares em estudos de diversidades de microrganismos do solo. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Planaltina, DF: Documento 51, **Embrapa**., Cerrados, 2002.

KEARNS, A. M., FREEMAN, R. & LIGTH-FOOT. A. M. Nosocomial enterococci: resistance to heat and sodium hypochlorite. **Journal Hospital Infection**., V.30, p. 193 – 199, 1995.

KLARE, I., HEIER, H., CLANS, H., REISSBRODT, R. & WITTE, W. Van A-mediated high-level glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium* from animal husbandry. **FEMS Microbiology Lett.**, V.125, 165-172, 1995.

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

KLIJN, N., WEERKAMP, A. H. & DE VOS, W. M. Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction- amplified variable regions of 16S rDNA and specific probes. **Applied Environmental Microbiology.** V.57, n. 11, p. 3390-3393, 1991.

KONEMAN, E. W. *et al.* **Diagnóstico Microbiológico.** Texto e Atlas Colorido. 5. ed. Rio de Janeiro: MEDSI. P. 589-659, 2001

KÜHN, I. VERSEN, A. BURMAN, L. G., SEYFARTH, A-M., BLANCH, A. R., TAYLOR, H., CAPLIN, J., MORENO, M. A., DOMINGUES, L. & MÖLBY, R. Epidemiology and ecology of *enterococci*, with spacial reference to antibiotic resistant strains, in animals and the environment. Example of an ongoing project within the European research programe. **International Journal Antimicrobial.** V. 14, p. 337-342, 2000.

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

LAI, K.K., KELLEY, A.L., MELVIN, Z.S., BELLIVEAU, P.P & FONTECCHIO, S.A. Failure to eradicate Vancomycin-resistant *enterococci* in a University hospital and the cost of barrier precautions. **Infection Control Hospital Epidemiology.** V.19, p.647-652,1998.

LEDDA, A., SCINTU, M. F., PIRISI, A., SANNA, S. & MANNU, L. 1994. Caratterizzazione tecnologica di ceppi di lactocochi e di enterocchi per la

produzione di formaggio pecorino Fiore Sardo. **Science. Technical. Latt. – casearia.** V. 45, p. 443 - 456,1994.

LOPEZ - DIAZ, T. M., SANTOS, J. A., GONZALES, C. J., MORENO, B. & GARCIA, M. L. Bacteriological quality of tradicional Spanish blue cheese. **Milchwissenschaft.** V.50, p. 503 - 505, 1995.

LOW, D.E., KELLER, N., BARTH, A., & JONES R.N. Clinical prevalence, antimicrobial susceptibility, and geographic resistance patterns of enterococci: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. **Clinical Infection Diseases.** V .32, n. 2, p. 133 - 45, 2001.

LOGUERCIO, A.P & ALEIXO, J. A . G. Microbiota de Queijo Tipo Minas Frescal produzido artesanalmente. **Ciência Rural Santa Maria.** nº 6,. Vol.31, 2001.

MAC DONALD, L. C., KUEHNERT, M. J., TENOVER, F. C. & JARVIS, W. R. Vancomycin-resistant enterococci outside the health-care setting: prevalence, sources and public health implications. **Emergence Infectious Diseases.** V.3, p.311-317,1997.

MARCHIORI, E. **Queijo:** O tesouro que vem o leite. Industria de Lactínios, São Paulo, Nº 50.p.20, mar/abr.,2004.

MALORNY, B.; TASSIOS, P. T., RADSTROM, P., COOK., WAGNER, M., HOORFAR, J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology,** v.83,p.39-48, 2003.

MANNU, L., PABA, A., DAGA, E., COMUNIAN, R., ZANETTI, S., DUPRÈ, I. & SECHI,. A. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* of dairy, animal and clinical origen. **International Journal of Food Microbiology.** V. 88, p. 291 - 304, 2003.

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. **Current Microbiology**. V. 28, p. 149 - 153,1994.

MMWR., *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin - United State,26 : 565,2002.

MORRIS, J.R JG, SHAY. D.K, HEBDEN, J.N, MCCARTER, J.R R.J, PERDUE, B.E et al. Enterococci resistant to multiple antimicrobial agents,including vancomycin. Establishment of endemicity in a university medical center. **Annals of International Medicine**. V.123, p. 250-259,1995.

MORRISON, D., WOODFORD, N. & COOKSON, B. *Enterococci* as emerging pathogens of humans. Journal Applied and Microbiology Symposium Supplement V.83, p.89 S – 99 S, 1997.

MUNDY, L.M., SAHM, D.F. & GILMORE, M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v13,p.513-522,2000.

MURRAY, B.E. The life and times of *Enterococcus*. **Clinical Microbiology** , V.3,p. 46 – 65, 1990.

MURRAY, P. et al. 2003. **Microbiologia Médica**. 4 edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. P. 220 – 223, 2004.

PANGALLO ,D., DRAHOVSKÁ H., HARICHOVÁ J., KARELOVÁ E., CHOVANOVÁ K., FERIANC P., TURÑA J. & TIMKO J. Assessment of environmental enterococci: bacterial antagonism, pathogenic capacity and antibiotic resistance. Antonie van Leeuwenhoek DOI 10.1007/s 10482-008-9272-9 **Springer Science Business Media** B.V.2008

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

PATEL, J. B. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. **Molecular Diagnostic**. V. 6, p. 313 - 321, 2001.

PARTIS,L., CROAN,D., GUO,Z., CLARK,R., COLDHAM,T. & MURBY, J. Evaluation of a DNA fingerprinting method for determining the species origin of meats. **Elsevier Science**, V. 54, p. 369 – 376, 2000.

ROCHA, J. S., BURITI F. C. A. & SAAD, S. M. I. Condições de processamento e comercialização de queijo-de-Minas frescal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. V. 58, N.2, 2006.

RODRIGUES, U., & M. D. COLLINS. Phylogenetic analysis of *Streptococcus saccharolyticus* based on 16S rRNA sequencing. **FEMS Microbiology Lett**.V. 71. p:231-234, 1990.

SANTOS, F.A., NOGUEIRA, N.A.P, CUNHA, G.M.A. Aspectos microbiologicos do queijo tipo “coalho” comercializado em Fortaleza – Ceará. B **CEPPA**, Curitiba,V13,N.1,p31-36.1995.

SARANTINOPOULOS, P., ANDRIGHETTO, C., GEORGALAKI, M. D., REA, M. C., LOMBARDI, A., COGAN, T. M., KALANTZOPOULOS, G. & TSAKALIDON, E., Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. **International Dairy Journal**. V.11, p. 621 - 647, 2002.

SCHLEIFER, K. H. & KILPPER - BÄLZ, R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. Rev. as *Enterococcus faecalis* com. Nov. **International Journal Systemic Bacteriology**. V. 34, p. 31-34, 1984.

SIMPSON, W. J.;TAGUCHI, H. The genus *Pediococcus* with notes on the genera *Tetratogenococcus* and *Aerococcus*. In: WOOD, B.J.B.; HOLZAPFEL, W.H. (Ed.) The genera of Lactic Acid Bacteria. London :**Chapman and Hall**, p.125-172. 1995

SOUSA, C.S., KERR, W.E., BONETTI, A.M.,SANTANA, F.A.,GOULART, L.R., OLIVEIRA, R.C.,VIEIRA, C.U.,VASCONCELOS S. M. Comparação das técnicas de SSCP, DS-PCR, PCR-RFLP para detecção de mutação no gene mitocondrial 16S RRNA em populações de *Melipona rufiventris*. **Bioscience Journal**. V.19, N 1,p. 65-70, 2003.

SWAMINATHAN, B. & GHASSAN, M.M. Molecular typing methods. In: PERSING, D.H., SMITH, T.H., TENOVER, F.C. AND WHITE, T.J. (Eds.) Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications. **American Society for Microbiology**, Washington, D.C.: p. 26–50, 1993.

SUMRU ÇITAK., NIHAL YUCEL & SATI ORHAN. Antibiotic resistance and incidence of *Enterococcus* species in Turkish white cheese. **International Journal of Dairy Technology**. Vol 57, No 1, p 27-31., 2004.

TEIXEIRA, L. M. & FACKLAM, R. R. **Enterococcus**. In: MURRAY, B. E. , BARON, E. J., JORGENSEN, J. H., PFALLER, M. A., YOLKEN, R. H. (eds.), Manual of Clinical Microbiology P.422-433, 8th Edition, American Society for Microbiology Press. Washington, DC, EUA. 2003.

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.

TEJEDOR, JUNCO .,M.T, GONZA´LEZ.,MARTI´N M., TOLEDO L.P., GO´MEZPL & BARRASA J.L.M. Identification and antibiotic resistance of faecal enterococci isolated from water samples.**International Journal Hyg Environmental Health** V.203, p 363–368, 2001.

TEUBER, M., PERRETN, V. & WIRSCHING, F. Antibiotikum - resistent bakterien: Eine neue Dimension in der Lebensmitteld - microbiologie. **Lebensmitteld technologie**. V. 29, p. 182-199,1996.

THEPPANGNA, W., MURASE, T., TOKUMARU, N., CHIKUMI, H., SHIMIZUE & OTSUKI, K. Screening of the enterocin genes and antimicrobial activity against pathogenic bacteria in *Enterococcus* strains obtained from different origins. **Journal of Veterinary Medicine Science** . V. 69, p.1235–1239, 2007.

TSAKRIS, A., WOODFORD, N. , POURNARAS, S., KAUFMANN, M., & DOUBOYAS, J. Apparent increased prevalence of high-level aminoglycoside-resistant *Enterococcus durans* resulting from false identification by a semiautomated software system. **Journal Clinical Microbiology**. V. 36, p. 1419 - 1421,1998.

VANCANNEYT, M., LOMBARDI, A ., ANDRIGHETTO, C ., KNIJFF, E ., TORRIANI, S ., BJORKOTH , K . J. , FRANZ , C . M . A . P. , MORENO , M . R . F; .REVETS , H . , VUYST , L. SWINGS , J . , KERTERS , K ., DELLAGLIO , F. , & HOLZAPFEL , W . H . Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their carrelation with origin and pathogenicity. **Applied and Environmental Microbiology**, V.68,p.1381-1391,2002.

VILLANI, F. & COPPOLA, S. Selection of enterococcal strains for water-bufalo Mozzarella cheese manufacture. **Annual Microbiology Enzymol**. V. 44, p.97 - 105, 1994.

VINCZE, T., POSFAI, J. & ROBERTS, R.J. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. **Nucleic Acids Research**. 31: 3688-3691, 2003.

WOESE, C. R. **Bacterial Evolution Microbiology Rev**. V. 51, n.2, p. 221 - 271, 1987.