

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**ANÁLISE DA PRESENÇA DE *Enterococcus* sp. RESISTENTES A
ANTIMICROBIANOS ISOLADOS DE ALIMENTOS DE PORTO ALEGRE-RS**

DAIANE ACOSTA FALCÃO

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Guedes Frazzon

Porto Alegre

Abril/2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**ANÁLISE DA PRESENÇA DE *Enterococcus* sp. RESISTENTES A
ANTIMICROBIANOS ISOLADOS DE ALIMENTOS DE PORTO ALEGRE-RS**

Daiane Acosta Falcão
Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do título de Mestre em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Ana Paula Guedes Frazzon

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil

Abril/2018

CIP - Catalogação na Publicação

Falcão, Daiane Acosta

ANÁLISE DA PRESENÇA DE Enterococcus sp. RESISTENTES
A ANTIMICROBIANOS ISOLADOS DE ALIMENTOS DE PORTO
ALEGRE-RS / Daiane Acosta Falcão. -- 2018.
69 f.

Orientadora: Ana Paula Guedes Frazzon.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Microbiologia de Alimentos. 2. Enterococcus sp..
3. Resistência microbiana. 4. Genes de resistência. I.
Frazzon, Ana Paula Guedes, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém.”

Dalai Lama

AGRADECIMENTOS

Primeiramente queria agradecer aos meus pais, **Rosangela Acosta Falcão** e **Cláudio Tentardini Falcão** por acreditarem em mim e nunca medirem esforços para que eu chegasse até essa etapa da minha vida;

Ao meu irmão **Lucas Acosta Falcão**, por me ensinar que na vida nada é impossível;

Ao **Bruno Cesar Bragagnolo**, pela paciência, amor e apoio diário durante esse importante momento;

Em especial à minha orientadora **Ana Paula Guedes Frazzon**, pela dedicação, paciência, pelas palavras de carinho nos momentos difíceis e, principalmente, por ter acreditado na minha capacidade;

Ao meu amigo **Alberto Jorge Gomes de Araújo**, pela amizade e pelas injeções de ânimo em alguns momentos que precisei. Por toda ajuda prestada enquanto eu escrevia esta dissertação;

À minha IC e amiga **Franscielle Dalla Porta Christiano**, por todo auxílio em todos os momentos, pela amizade e pela dedicação;

A todos os colegas e amigos do **Lab 222C**, pelas brincadeiras e pelo bom-humor, que tornaram a jornada de bancada de laboratório muito mais divertida e menos cansativa;

À minha Avó **Milka**, agradeço pelos valiosos conselhos e ensinamentos;

À toda minha família, que sempre torceu por mim;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos, pois sem ela não seria possível à realização desta pesquisa;

Por fim, agradeço a Deus por tudo, mas principalmente por colocar em minha vida pessoas tão especiais!

ANÁLISE DA PRESENÇA DE *Enterococcus* sp. RESISTENTES A ANTIMICROBIANOS ISOLADOS DE ALIMENTOS DE PORTO ALEGRE-RS

Autor: Daiane Acosta Falcão

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Guedes Frazzon

RESUMO

Bactérias do gênero *Enterococcus* sp. são Gram positivas com morfologia celular em formato de cocos, em pares ou em cadeias curtas. Estas bactérias estão presentes na microbiota de mamíferos, como a do ser humano, e na microbiota de aves. São também isolados de várias fontes, como alimentos, solo e água. Uma das características deste gênero é a capacidade de adquirir diferentes determinantes genéticos que conferem resistência a antimicrobianos distintos. O presente estudo teve como objetivo determinar e caracterizar o perfil de resistência a antimicrobianos de *Enterococcus* sp. de alimentos de três diferentes mercados de Porto Alegre-RS; e avaliar a evolução da resistência antimicrobiana comparados com dados de 2006. Os alimentos aipim, batata-doce, batata inglesa, beterraba, carne de frango crua, cenoura, couve, salsa, queijo colonial e ricota foram processados e colônias com morfologia típica de *Enterococcus* isoladas dos alimentos foram selecionadas e submetidas à identificação em nível de gênero por testes fenotípicos. Aqueles identificados como *Enterococcus* foram submetidos a técnicas moleculares, através de PCR gênero-específica para a presença do gene *tuf*, perfil de susceptibilidade e presença de genes de resistência. Foram testados os seguintes antibióticos: Ampicilina (AMP), Ciprofloxacina (CIP), Cloranfenicol (CLO), Eritromicina (ERI), Estreptomicina (EST), Gentamicina (GEN), Linezolida (LNZ), Nitrofurantoína (NIT), Norfloxacina (NOR), Tetraciclina (TET), Rifampicina (RIF) e Vancomicina (VAN). Trezentos e dez cepas de *Enterococcus* foram isoladas dos alimentos e identificados como *Enterococcus faecalis* (177), *Enterococcus casseliflavus* (103), *Enterococcus hirae* (17), *Enterococcus faecium* (6), *Enterococcus durans* (3) e *Enterococcus* spp. (4). Em relação à distribuição das espécies nos alimentos, *E. faecalis* foi a espécie mais prevalente nas amostras de carne e queijo no presente estudo, assim como em 2006. No entanto, nas amostras de vegetais as espécies mais predominantes foram *E. faecium* em 2006 e *E. casseliflavus* em 2016. Entre os isolados, 33 (10,64%) foram susceptíveis a todos os antimicrobianos testados, enquanto 277 (89,35%) apresentaram resistência a pelo menos um dos fármacos estudados. Os maiores números de resistência foram observados para os antibióticos: RIF (54,8%, n=170), ERI (47,74%, n=148), TET (31,29%, n=97) e CIP (20%, n=62). Em 2006, 34% das cepas eram resistentes à CIP (n= 19), 25% à CLO (n=14), 16% à GEN (n=9), 5,35% à AMP (n=3) e 1,78% à VAN (n=3), assim, em comparação ao presente estudo houve diminuição na porcentagem de cepas resistentes à AMP, CIP, CLO, GEN e VAN, presente nas amostras de alimentos. Os isolados de *E. faecalis* apresentam todos os genes de resistência testados e o gene que apresentou a maior prevalência entre as amostras foi *tetM* (24,51%), seguido de *ermB* (20,32%), *tetL* (2,42%), *aac* (6')/*aph* (2') e *gyrA* (3,22%) e *mrsC* (2,25%). Os dados aqui descritos demonstram fenótipos de resistência a uma gama de antibióticos de grande relevância clínica, que serve de alerta para a importância da cadeia alimentar na disseminação e transferência de genes de resistência antimicrobiana.

Palavras-chaves: Microbiologia de Alimentos; *Enterococcus* sp.; Resistência microbiana; Genes de resistência.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (69 p.) Abril, 2018.

ANALYSIS OF THE PRESENCE OF *Enterococcus* sp. RESISTANT TO ANTIMICROBIALS ISOLATED FROM FOOD OF PORTO ALEGRE-RS

Author: Daiane Acosta Falcão
Advisor: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Guedes Frazzon

ABSTRACT

Bacteria of the genus *Enterococcus* sp. are Gram positive with cellular morphology in the shape of coccus in pairs or in short chains. These bacteria are present in the mammal's microbiota, such as of the human being, and in the bird's microbiota. Currently they have been found in several sources, mainly in food. In addition, *Enterococcus* has acquired different genetic determinants that confer resistance to distinct antimicrobials. The present study aimed determine and characterize the profile of resistance to antimicrobials of *Enterococcus* sp. isolated of foods from three different markets of Porto Alegre-RS; and evaluate the evolution of the resistance to antimicrobials compered to data of 2006. The foods (cassava, sweet potato, potato, beetroot, raw chicken, carrot, cabbage, parsley, colonial cheese and ricotta) were processed and the colony with typical *Enterococcus* morphology isolated from food were selected and submitted to identification at the genus level by phenotypic tests. Those identified as *Enterococcus* were submitted to molecular techniques, through PCR genus-specific for the presence of the *tuf* gene, susceptibility profile and presence of resistance genes. The following antibiotics were tested: Ampicillin (AMP), Ciprofloxacin (CIP), Chloranphenicol (CLO), Erythromycin (ERI), Streptomycin (EST), Gentamicin (GEN), Linezolid (LNZ), Nitrofurantoin (NIT), Norfloxacin (NOR), Rifampin (RIF), Tetracycline (TET) and Vancomycin (VAN). Three hundred and ten strains of *Enterococcus* were isolated from the food and identified as *Enterococcus faecalis* (177), *Enterococcus casseliflavus* (103), *Enterococcus hirae* (17), *Enterococcus faecium* (6), *Enterococcus durans* (3) e *Enterococcus* spp. (4). In relation to the distribution of the species in food, *E. faecalis* was the most prevalent species among meat and cheese samples, as well as in the present study. However in the vegetable samples the most predominant species was *E. faecium* in 2006 and *E.casseliflavus* in 2016. Among the isolates, 33 (10.64%) were susceptible to all antimicrobials tested, while 277 (89.35%) presented resistance to at least one of the drugs studied. The highest numbers of resistance strains were observed for the antibiotics: RIF (54.8%, n=170), ERI (47.74%, n=148), TET (31.29%, n=97) and CIP (20%, n=62). In 2006, 34% of the strains were resistant to CIP (n=19), 25% to chlorofenicol (n=14), 16% to GEN (n=9), 5,35% AMP (n=3), 1,78% to VAN (n=3), thus, in comparison to the present study, there was a decrease in the percentage of strains resistant to AMP, CIP, COL, GEN and VAN isolated from food samples. The *E. faecalis* isolates present all genes of resistance tested and the gene that presented the highest prevalence among the samples was *tetM* (24.51%), followed by *ermB* (20.32%), *tetL* (2.42%), *aac(6 ')/aph(2')* and *gyrA* (3.22%) and *mrsC* (2.25%). The data described here demonstrate phenotypes of resistance to a range of antibiotics of great clinical relevance, which serves as an alert to the importance of the food chain in the dissemination and transfer of antimicrobial resistance genes.

Keywords: Food Microbiology; *Enterococcus* sp.: Microbial resistance; Resistance genes.

¹Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (69 p.) April, 2018.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	15
2.	OBJETIVOS.....	16
2.1	Objetivo Geral.....	16
2.2	Objetivos Específicos.....	16
3.	REVISÃO DA LITERATURA.....	17
3.1	<i>Enterococcus</i> spp.....	17
3.2	Enterococos em alimentos.....	18
3.3	Resistência a antimicrobianos.....	21
3.3.1	Resistência aos glicopeptídeos.....	22
3.3.2	Resistência a macrolídeos.....	23
3.3.3	Resistência à quinolonas.....	24
3.3.4	Resistência aos aminoglicosídeos.....	24
3.3.5	Resistência à Tetraciclina.....	25
3.3.6	Resistência aos β -lactâmicos.....	26
3.3.7	Resistência ao Clorofenicol.....	27
3.3.8	Resistência à Oxazolidinonas.....	28
3.3.9	Resistência à Nitrofurantoína.....	28
3.3.10	Resistência à Rifampicina.....	29
3.4	<i>Enterococcus</i> Resistentes em Alimentos.....	29
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1	Amostras de Alimentos.....	31
4.2	Processamento das Amostras: Semeadura, Isolamento e Identificação de <i>Enterococcus</i> sp.....	32
4.3	Extração de DNA Bacteriano.....	33
4.4	Confirmação do Gênero <i>Enterococcus</i> por PCR.....	33
4.5	Identificação das Espécies de <i>Enterococcus</i> sp.....	34
4.5.1	PCR espécie-específico.....	34
4.5.2	MALDI-TOF.....	35
4.6	Teste de Suscetibilidade a Antimicrobianos.....	35
4.6.1	Determinação da Susceptibilidade aos Antimicrobianos pelo Método de Difusão em Ágar.....	36
4.6.2	Concentração Mínima Inibitória (MIC).....	37

4.6.2.1	Determinações da Concentração Inibitória Mínima para Isolados não Susceptíveis à Vancomicina.....	37
4.6.2.2	Determinação da concentração inibitória mínima para isolados resistentes a gentamicina e a estreptomicina.....	38
4.7	Determinação dos Genes de Resistência nos Isolados de <i>Enterococcus</i> sp. por PCR.....	38
4.8	Análise Estatística.....	40
5	RESULTADOS.....	41
5.1	Distribuição e Identificação dos Isolados das Amostras de Alimentos.....	41
5.2	Perfis de Resistência aos Antimicrobianos.....	43
5.3	Presença de Genes de Resistência aos Antimicrobianos nos Isolados Identificados.....	50
6	DISCUSSÃO.....	52
6.1	Distribuição e Identificação dos Isolados das Amostras de Alimentos.....	52
6.2	Perfis de Resistência aos Antimicrobianos e Genes de Resistência.....	54
7	CONCLUSÃO.....	60
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as reações de PCR para identificação das espécies de enterococos.....	34
Tabela 2	Interpretação dos diâmetros das zonas de inibição do crescimento microbiano para <i>Enterococcus</i> spp.....	36
Tabela 3	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as reações de PCR e tamanhos dos fragmentos gerados. <i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>tet(S)</i> , <i>erm(A)</i> , <i>erm(B)</i> , <i>erm(C)</i> , <i>gyr(A)</i> , <i>msrC</i> , <i>vanC₂₋₃</i> e <i>aac(6')/aph(2')</i> ..	39
Tabela 4	Distribuição dos <i>Enterococcus</i> isolados por amostra de alimento adquiridos nos mercados de Porto Alegre – RS.....	41
Tabela 5	Quantidades das espécies de <i>Enterococcus</i> spp. identificadas por amostra de alimento.....	43
Tabela 6	Perfil de susceptibilidade das cepas de <i>Enterococcus</i> em relação ao alimento que foram isoladas.....	43
Tabela 7	Perfil de resistência total (%) de amostras resistente e resistentes-intermediárias.....	45
Tabela 8	Perfil de resistência total de amostras resistente e resistentes-intermediárias.....	46
Tabela 9	Perfis de resistência verificados para as espécies de <i>Enterococcus</i> spp. isoladas.....	48
Tabela 10	Detecção de genes de resistência nas estirpes isoladas das amostras de alimentos coletados em mercados de Porto Alegre–RS.....	51
Tabela 11	Número de genes de resistência detectados divididos por espécies.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Localização da cidade de Porto Alegre – RS, Brasil, onde as coletas foram realizadas.....	31
Figura 2	Frequência das espécies de <i>Enterococcus</i> isoladas de alimento de Porto Alegre – RS em 2016.....	42
Figura 3	Percentual de enterococos com perfil de resistência antimicrobiana.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Centígrados
µg	Microgramas
µL	Microlitros
µM	Micromolar
AACs	Acetiltransferases
ANTs	Nucleotídeostransferases
APA	Água Peptonada Alcalina
APHs	Fosfotransferases
BHI	Brain Heart Infusion
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
g	Gramas
GTP	Guanosina trifosfato
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
LAB	Lactic acid bactéria
m	Metros
MALDI-TOF	Matrix Assisted Lazer Desorption Ionization- Time of flight
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MH	Mueller Hinton
MIC	Concentração mínima inibitória
mL	Mililitros
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
NAE	Nucleo de Assessoria Estatística
NARMS	Sistema Nacional de Monitoramento da Resistência Antimicrobiana
ng	Nanograma
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Pares de base
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Potencial hidrogeniônico
PYR	L-pirrolidonil-β-naftilamida
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RMD	Resistência a múltiplas drogas
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
TGI	Trato gastrointestinal
tRNA	Ácido ribonucleico transportador
U	Unidade
UFC	Unidades formadoras de colônia

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Enterococcus* sp. corresponde a um grupo de micro-organismos conhecido com bactéria ácido-láticas de grande importância em diversas áreas, como ambiental, clínica e de alimentos. Os micro-organismos pertencentes a este gênero são Gram-positivos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, oxidase e catalase negativos, com morfologia celular na forma de cocos em pares ou em cadeias curtas. São bactérias ubíquas, comumente encontradas no trato gastrointestinal de humanos e de animais, bem como em seus habitats. No entanto estão se tornando patógenos emergentes e causadores de infecções hospitalares graves, apesar de serem bactérias comensais.

Os enterococos desempenham papel ambíguo em alimentos, enquanto algumas linhagens possuem um papel benéfico durante a maturação de determinados produtos fermentados, outras cepas estão relacionadas a deterioração de alimentos. Estes micro-organismos foram considerados durante muito tempo comensais com baixo potencial patogênico, mas à medida que aumentou o envolvimento destes micro-organismos nas infecções nosocomiais e multirresistência a antimicrobianos, enfatizaram a importância das caracterizações.

A frequência dessas bactérias isoladas de diferentes fontes de alimentos adquiridos da cidade de Porto Alegre – RS, assim como a presença de resistência a antimicrobianos foram avaliadas pela primeira vez em 2006. O presente estudo isolou enterococos resistentes de alimentos, como vegetais, carnes e produtos lácticos, identificou as espécies por análises fenotípicas e genotípicas e comparou os dados obtidos neste estudo com os dados de 2006, objetivando avaliar a evolução da resistência dos enterococos isolados de alimentos frente a antimicrobianos de uso clínico e veterinário.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo principal deste estudo foi determinar a frequência e a caracterização do perfil de resistência de *Enterococcus* spp. isolados de diferentes alimentos adquiridos em mercados de Porto Alegre – RS, avaliando a evolução da resistência a antimicrobianos em comparação com dados obtidos em 2006.

2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Identificar em nível de espécie as cepas de *Enterococcus* spp. isoladas a partir de diferentes amostras de alimentos;
- 2.2.2 Avaliar a diversidade destes micro-organismos nos alimentos analisados;
- 2.2.3 Determinar os perfis de susceptibilidade a antimicrobianos nas diferentes espécies identificadas;
- 2.2.4 Verificar a presença de genes de resistência a antimicrobianos nos isolados identificados;
- 2.2.5 Comparar o perfil de resistência/susceptibilidade das cepas isoladas no presente com dados de 2006.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 *Enterococcus* spp.

As bactérias do gênero *Enterococcus* são bactérias Gram-positivas que pertencem ao grupo das bactérias ácido-láticas (LAB) e constituem parte da microbiota natural do trato gastrointestinal de humanos e de vários animais, podendo ser encontradas em solo, água e alimentos (Franz *et al.*, 2003; Giraffa, 2003). Microscopicamente apresentam morfologia em forma de cocos arranjados em cadeias curtas, aos pares ou em células únicas (Murray *et al.*, 1990; Foulquié Moreno *et al.*, 2006).

Enterococos são micro-organismos anaeróbios facultativos, mesófilos que apresentam temperatura ótima de crescimento de 35°C, embora a maioria deles seja capaz de tolerar altas variações de temperatura que variam de 10°C a 45°C. Possuem metabolismo homofermentativo, ou seja, produzem ácido lático como produto final da via de consumo da glicose, sem produção de gás. São capazes de hidrolisar a esculina na presença de sais biliares (40%), produzindo glicose e esculina, geralmente toleram altas concentrações de NaCl (6,5%) (Franz *et al.*, 2003; Lebreton *et al.*, 2014). Além disso, crescem em uma ampla variedade de pH (4,6 a 9,9), sendo seu crescimento ótimo em 7,5 (Fisher & Phillips, 2009).

Atualmente, o gênero inclui mais de 50 espécies, que foram classificadas com base em evidências filogenéticas, sequenciamento do gene 16S rRNA e estudos de hibridização DNA-DNA (Foulquié Moreno *et al.*, 2006; Parte, 2013).

As espécies *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* são as mais comumente encontradas no intestino de humanos e animais, e são descritas como as principais responsáveis por infecções hospitalares junto com o aumento da resistência aos antimicrobianos (Lebreton *et al.*, 2014). Algumas espécies apresentam colônias pigmentadas, tais como *E. casseliflavus*, *E. gilvus*, *E. mundtii*, *E. pallens* e *E. sulfureus*. Outras espécies apresentam motilidade, como *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*. Há espécies capazes de hidrolisar a L-pirrolidonil- β -naftilamida (PYR) como *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. pallens*, *E. saccharolyticus*, *E. canintestini*, *E. termitis*, *E. viikiensis* e *E. devriesei* (varia entre as linhagens), e espécies que pertencem ao grupo Q de Lancefield, como *E. avium*. Todas essas

características peculiares de cada espécie têm contribuído para a adaptabilidade e a ampla distribuição do gênero *Enterococcus* na natureza (Lebreton *et al.*, 2014).

Determinadas espécies de enterococos são utilizadas benéficamente na indústria alimentícia e farmacêutica, especialmente *E. faecalis*, que são utilizados como indicadores de contaminação fecal em alimentos e na água, auxiliando na avaliação das condições sanitárias dessas fontes (Werner, 2013).

Estudos sobre os enterococos têm mostrado significativo papel na disseminação e persistência da resistência antimicrobiana, pelo uso indiscriminado destes compostos, levando à seleção de genes resistentes e conduzindo ao aparecimento de cepas com estas características em outros locais. A presença desses genes de resistência em micro-organismos tem sido considerada como alto risco à saúde humana e animal (Jackson *et al.*, 2004; Pieniz *et al.*, 2015).

3.2 Enterococos em alimentos

As espécies de *Enterococcus* são de natureza ubíqua, o que faz com que seja comum sua ocorrência em uma ampla variedade de alimentos, fazendo-se, dessa forma, que seja importante manter uma vigilância frequente destes micro-organismos nos alimentos (Soares-Santos, 2015). Este gênero tem a capacidade de suportar grandes oscilações em diferentes variáveis ambientais, como as variações de temperatura, salinidade e acidez, condições muitas vezes consideradas adversas para outros micro-organismos (Eaton & Gasson, 2001; Mota *et al.*, 2005; Fisher & Phillips, 2009).

Um panorama geral de sua distribuição na natureza, incluindo a presença em materiais fecais e sua capacidade de sobrevivência em condições hostis no meio extra-entérico, pode explicar sua ampla distribuição no ambiente e, naturalmente, sua presença em quase tudo o que cerca os seres humanos, inclusive água, alimentos, e medicamentos de origem vegetal (Iversen *et al.*, 2000).

A variedade de espécies de LAB, encontradas em alimentos, tem despertado o interesse por proporcionar benefícios à saúde. Os enterococos podem ser utilizados como probióticos (para melhorar o equilíbrio microbiano do intestino), nos processos de maturação e desenvolvimento de queijos (culturas starter) e também como atividade anti-*Listeria*, pela produção de bacteriocinas. Mas também são utilizados como indicadores de qualidade, principalmente em virtude de seu

histórico como causadores de doenças, sugerindo uma avaliação cuidadosa antes de sua aplicação na indústria alimentícia (Eaton & Gasson, 2001; Giraffa, 2003; Johnston & Jaykus, 2004; Jiménez *et al.*, 2013).

O gênero *Enterococcus* também está associado com a deterioração de alimentos, principalmente carnes. A presença de enterococos no trato gastrointestinal de animais os torna um possível contaminante da carne durante o abate. Como essas bactérias caracterizam-se por serem mais termotolerantes dentre as bactérias não formadoras de esporos, elas podem causar problemas de deterioração de carnes cozidas e processadas (Franz *et al.*, 1999).

O isolamento de enterococos em produtos lácticos é altamente controverso, embora sua incidência nesses produtos seja considerada resultado de condições inadequadas de higiene ao longo da produção e processamento do leite, por vezes não está relacionada diretamente com a contaminação fecal. A contaminação pode ocorrer através de fontes externas como a água, equipamentos de processamento e tanques de estocagem. Como os enterococos são micro-organismos termotolerantes às condições ambientais, podem crescer e aumentar em número de células durante o período de refrigeração do leite e sobreviver após a pasteurização (Franz *et al.*, 1999; Giraffa, 2003; Ogier *et al.*, 2008).

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

Embora se conheça pouco sobre a associação direta dos enterococos com plantas, sabe-se que as espécies *E. casseliflavus* e *E. mundtii* podem estar relacionadas com plantas, tanto comestíveis como medicinais (Ulrich *et al.*, 1998). Entretanto, a interpretação da presença destes micro-organismos em alimentos de

origem vegetal é difícil, uma vez que as espécies associadas às plantas podem ocorrer juntamente com espécies de enterococos sabidamente de origem fecal e ambiental, que contaminam estes alimentos (Devriese *et al.*, 1995).

A contaminação dos alimentos de origem animal (carnes e produtos cárneos, leite e derivados) com enterococos pode ser endógena ou exógena dependendo se a origem das bactérias for do próprio animal ou do meio ambiente, incluindo-se água, solo, equipamentos e operadores, que têm contato com os alimentos em alguma fase de sua preparação, distribuição e consumo, sendo, portanto, esta relação bastante controversa e discutível. A contaminação dos alimentos de origem animal (aves, bovinos, ovinos e suínos) pode ocorrer tanto durante o processo de abate como também durante qualquer das outras fases do processamento destes tipos de produtos, envolvendo toda a manipulação, a estocagem e comercialização (Tiecco, 1992).

Como se sabe os enterococos são comensais intestinais na maioria dos vertebrados, os enterococos são usados como marcador de contaminação fecal de produtos alimentares. Os enterococos com base em alimentos raramente são implicados como responsáveis diretos de infecções transmitidas por alimentos, mas a aquisição dessas bactérias através de alimentos pode resultar em infecções sanguíneas. Além disso, muitas infecções da corrente sanguínea por *E. faecium* são de origem gastrointestinal, aumentando a possibilidade de que o alimento possa ser um veículo para essas bactérias. O alimento também pode ser uma fonte de *Enterococcus* sp. causando infecções do trato urinário. Os enterococos alimentares podem transferir genes de resistência para agentes patogênicos, como *Campylobacter*, *Listeria* e *Escherichia coli* (Raj *et al.*, 1961; Sorensen *et al.*, 2001; Abriouel *et al.*, 2008; Tyson *et al.*, 2017).

Devido à ubiquidade dos enterococos no intestino animal, juntamente com a sua resiliência ao estresse ambiental e capacidade de adquirir resistência aos antibióticos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que os sistemas integrados de monitoramento de resistência antimicrobiana usem enterococos como organismos sentinelas para resistência a agentes com atividade contra Gram-positivos. Nos Estados Unidos, o Sistema Nacional de Monitoramento da Resistência Antimicrobiana (NARMS) monitora a resistência antimicrobiana de patógenos bacterianos transmitidos por alimentos em todo o suprimento de alimentos, incluindo *Enterococcus* spp. isolados de carnes de varejo. Portanto, a

vigilância prévia da resistência de enterococos de carnes de varejo conduzidas pelo NARMS pode ser usada como base para medir possíveis mudanças futuras na prevalência de resistência de enterococos no suprimento de alimentos e também para entender melhor as pressões seletivas que contribuem para a resistência em alimentos de origem animal (Tyson *et al.*, 2017).

Enterococcus também tem outras aplicações tecnológicas na indústria de alimentos e têm sido utilizados como culturas starters (Foulquié-Moreno *et al.*, 2006), além disso, algumas cepas que produzem a bacteriocina, enterocina, vêm sendo utilizadas como bio-conservantes (Stiles & Holzapfel, 1997). A tolerância a extremos ambientais explica a sua sobrevivência durante o processamento de carnes curadas cozidas e não cozidas e sua capacidade de se multiplicar durante as fermentações (Hugas *et al.*, 2003; Simpson, 1994). Esta alta capacidade de sobrevivência em ambientes em mudança, como os alimentos, pode ser explicada em parte pela sua capacidade de formar biofilmes (Cretl *et al.*, 2004; Holley, 2014; Tendolkar *et al.*, 2006).

3.3 Resistência a antimicrobianos

Enterococcus sp. são intrinsecamente resistentes a muitos antimicrobianos e tem uma capacidade notável para adquirir características adicionais de resistência antimicrobiana, através das aquisições de genes ou mutações, limitando as opções terapêuticas (Prieto *et al.*, 2016). A disseminação de cepas que apresentam genes de resistência a antimicrobianos não apenas de amostras clínicas, mas também de muitos ambientes tem aumentado o interesse em estudar a ocorrência e as características enterococos de habitats não humanos (Freitas, 2010).

A resistência intrínseca ocorre naturalmente, é codificada no cromossomo bacteriano e está presente na maioria dos enterococos ou particularmente em alguma espécie. Já a resistência adquirida é variável e ocorre através de mutações no DNA bacteriano ou aquisição de elementos genéticos móveis, tais como plasmídeos e transposons (Teixeira *et al.*, 2011).

Esses micro-organismos apresentam diferentes mecanismos de ação de resistência a maior parte dos antimicrobianos utilizados na área clínica, podendo ser intrínsecos ou adquiridos (Garrido *et al.*, 2014). Além disso, sugeriu-se que o uso de

antimicrobianos para promoção de crescimento animal ou para tratamento e controle de doenças animais acelera a seleção de bactérias resistentes a antibióticos em seres humanos (Mundy *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2002;).

Algumas cepas de enterococos podem exibir resistência *in vitro* a três ou mais classes distintas de antimicrobianos, o que os classifica-as como multirresistentes (Magiorakos *et al.*, 2012). O problema da resistência antimicrobiana nos enterococos não se limita apenas a contextos clínicos, mas também afeta outros ambientes. Os *Enterococcus* spp. desenvolveram mecanismos altamente eficientes para adquirir e distribuir genes de resistência aos antimicrobianos entre as cepas de enterococos e para outros microorganismos (Guerrero-Ramos *et al.*, 2016). Essa facilidade na disseminação e aquisição de genes lhes conferem vantagens seletivas para sua sobrevivência. Esses elementos móveis não se limitam a gêneros nem a espécies, podendo ser encontrados diferentes espécies bacterianas (Chotinantakula *et al.*, 2018).

3.3.1 Resistência a glicopeptídeos

Os glicopeptídeos atuam na inibição do crescimento bacteriano por interferência na biossíntese da parede celular, proveniente da ligação de alta afinidade à extremidade terminal D-Ala-D-Ala. Pertencem a este grupo à vancomicina e a teicoplanina. A resistência à vancomicina se dá quando ocorre uma mudança no aminoácido terminal do peptideoglicano precursor, onde o terminal D-Ala-D-Ala passa a ser ou D-Ala-D-Lac, conferindo altos níveis de resistência, ou D-Ala-D-Ser, conferindo níveis baixos níveis de resistência (Miller *et al.*, 2014; Ness *et al.*, 2014).

Os *Enterococcus* spp. têm servido como doadores do cluster de genes de resistência à vancomicina a diversos micro-organismos patogênicos, pois se adaptam facilmente em diferentes ambientes. Esses clusters podem ser diferenciados pelo nível de aminoácidos na enzima ligase, pelo grau de resistência conferida à vancomicina, pela habilidade da indução à teicoplanina e pelo arranjo estrutural do cluster (Miller *et al.*, 2014).

Nove fenótipos de resistência aos glicopeptídeos já foram descritos em enterococos, sendo cada tipo associado a diferentes elementos gênicos (*vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM* e *vanN*) (Garrido, 2014; Kristich *et al.*,

2014). Destacam-se os fenótipos *vanA* (resistência em altos níveis à vancomicina e à teicoplanina) e *vanB* (resistência moderada a altos níveis de vancomicina), considerados de alta relevância clínica e frequentemente associados a *E. faecalis* e *E. faecium*. O fenótipo *vanC* (resistência em baixos níveis à vancomicina) está relacionado a característica intrínseca de *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* e *E. flavescens* (Bell *et al.*, 1998; Miller *et al.*, 2014; Moura *et al.*, 2015).

Os fenótipos *vanA* e *vanB*, conferem a resistência através da modificação do alvo para resíduos de peptidil-D-Ala-D-Lac, o que reduz a afinidade entre os glicopeptídeos e a parede celular bacteriana (Werner *et al.*, 2008). O fenótipo do gene *vanC* é expresso constitutivamente ou induzivelmente como resultado da produção de precursores de peptídeoglicanos que terminam em D-Ser. Três genes *vanC* que codificam ligases D-Ala:D-Ser têm sido descritos: *vanC*₁ em *E. gallinarum*, *vanC*₂ em *E. casseliflavus* e *vanC*₃ em *E. flavescens* (Courvalin, 2006).

3.3.2 Resistência a macrolídeos

Os antimicrobianos eritromicina, claritromicina e azitromicina fazem parte do grupo dos macrólidos. A resistência a este grupo baseia-se nos seguintes mecanismos: modificação do alvo por mutações precisas; modificação do alvo por meio da metilação da porção 23S da subunidade ribossomal 50S; hidrólise do anel lactona da molécula antibiótica e bombas de efluxo, que removem moléculas antibióticas do interior da célula (Garrido *et al.*, 2014).

Os determinantes mais frequentes da resistência aos macrólidos são os genes *ermA*, *ermB* e *ermC*, que conferem resistência à eritromicina a partir da modificação do alvo por meio da codificação de uma metiltransferase que age em resíduos específicos da subunidade 23S rRNA, causando a dimetilação de resíduos de adenina, impedindo a ligação dos macrolídeos (Murray, 1990; Diarra *et al.*, 2010; Garrido *et al.*, 2014).

Os genes *msrA* e *msrC* conferem resistência à eritromicina pelo mecanismo de bombas de efluxo, removendo as substâncias indesejadas para fora da célula. Os genes *msr* pertencem à família transportadora ABC, onde *msrA* é um determinante transmitido por plasmídeo, inicialmente descrito em *Staphylococcus epidermidis*, e *msrC* é uma proteína cromossômica descrita em *E. faecalis*, a qual produz resistência de baixo nível aos macrolídeos (Munita & Arias, 2016).

3.3.3 Resistência a quinolonas

Existem mais de vinte representantes integrando esta classe de antimicrobianos, dentre eles, a ciprofloxacina e a norfloxacina, que apresentam atividade moderada contra enterococos. As quinolonas inibem o crescimento de bactérias ao interferir com a replicação do DNA, especificamente pela ligação às topoisomerasas de tipo II que controlam o superenrolamento do DNA, inibindo a sua função, levando a rupturas letal da dupla fita de DNA. (Lebreton *et al.*, 2014).

Os alvos destes antimicrobianos são as enzimas DNA girase e DNA topoisomerase IV, que são tetrâmeros formados por duas subunidades: *gyrA* e *gyrB*, para o complexo DNA girase, e *parC* e *parE*, para topoisomerase IV. O mecanismo de resistência está relacionado com a alteração de aminoácidos na subunidade *gyrA* da DNA girase, ou na subunidade *parC* da topoisomerase IV, denominadas regiões determinantes de resistência às quinolonas (Leavis *et al.*, 2006; Hegde *et al.*, 2011; Lebreton *et al.*, 2014). Mutações nos genes *gyrA* e *parC*, são encontradas principalmente em *E. faecalis* e *E. faecium*. Essas alterações afetam a região de ligação com as quinolonas e modificam a afinidade com o antibiótico (Miller *et al.*, 2014).

3.3.4 Resistência a aminoglicosídeos

Estreptomicina e gentamicina são exemplos de antimicrobianos de amplo espectro desta classe. O efeito deste antimicrobiano deve-se à interferência do composto na síntese de proteínas pela ligação à porção 16S rRNA da subunidade ribossomal 30S, ocasionando a morte celular. O nível de resistência varia entre os diferentes aminoglicosídeos e está associado à baixa permeabilidade da parede celular a estas moléculas, reduzindo sua entrada na célula bacteriana (Tavares, 2000).

Todas as espécies de *Enterococcus* apresentam resistência intrínseca a moderadas concentrações de aminoglicosídeos, decorrente da reduzida penetração do antimicrobiano pela parede celular (Miller *et al.*, 2014). A resistência adquirida a altas concentrações destas drogas pode ter duas explicações, uma delas é que pode ser decorrente de mutações, as quais ocasionam a diminuição da ligação do agente antimicrobiano ao ribossomo, como a que ocorre com a estreptomicina,

chamada resistência ribossômica, enquanto que a outra explicação, mais frequente, é devido à aquisição de novos genes que codificam enzimas capazes de modificar os aminoglicosídeos, assim, resistência adquirida (Teixeira & Facklam, 2004).

No entanto, estratégias adotadas pelos micro-organismos levaram ao surgimento de estirpes com resistência a altos níveis aos aminoglicosídeos e mesmo ao sinergismo. Por conseguinte, a aquisição de genes que codificam enzimas como fosfotransferases, acetiltransferases ou nucleotidiltransferases, promovendo modificações na estrutura do antimicrobiano, elevam os níveis de resistência (Murray, 1990; Murray, 1998; Shepard & Gilmore, 2002).

A resistência a elevados níveis de aminoglicosídeos é mais frequentemente mediada por enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, como fosfotransferases (APHs), acetiltransferases (AACs) e nucleotídeo transferases (ANTs) (Garrido, 2014). Uma das enzimas de resistência aos aminoglicosídeos mais importantes é AAC(6')-APH (2''). O alto nível de resistência de gentamicina em enterococos é reportado como sendo predominantemente mediado pelo gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, que codifica um aminoglicosídeo bifuncional que modifica essa enzima. A ação desta enzima nos enterococos elimina a atividade sinérgica da gentamicina quando combinados com um agente ativo da parede celular, como a ampicilina ou a vancomicina (Boehr *et al.*, 2001).

3.3.5 Resistência a Tetraciclina

A ação bacteriostática ocorre pela ligação do antimicrobiano, de maneira reversível, ao sítio A da subunidade 30S do ribossomo, bloqueando a ligação do RNA transportador (tRNA) ao RNA mensageiro (mRNA), e impedindo a síntese proteica. A resistência à tetraciclina, presente em enterococos, pode ser adquirida através de diversos genes, que atuam por diferentes mecanismos de ação, entre eles a bomba de efluxo do antibiótico da célula bacteriana e a proteção ribossomal (Cauwerts *et al.*, 2007; Frazzon *et al.*, 2010). Os genes *tet(M)*, *tet(O)* e *tet(S)* são responsáveis por conferir proteção ribossomal à célula, reduzindo a associação da tetraciclina aos ribossomos (Connell *et al.*, 2003; Huys *et al.*, 2004). Estes genes são determinantes da resistência cromossômica e podem ser transferidos via transposons. Esses genes codificam uma proteína com homologia significativa a fatores de alongação, e como fatores de alongação, essas proteínas são capazes de

hidrolisar GTP na presença do ribossomo, o qual altera sua conformação e desloca a tetraciclina ligada. Desta forma, esses genes atuam como protetores ribossomais, e conferem um maior espectro de resistência à tetraciclina do que é observado em bombas de efluxo para este mesmo antibiótico (Chopra & Roberts, 2001; Frazzon *et al.*, 2010; Garrido *et al.*, 2014; Miller *et al.*, 2014).

Um segundo mecanismo de resistência é atribuído aos genes *tet(L)* e *tet(K)*, que codificam proteínas de bombas de efluxo celular dependentes de energia, diminuindo a concentração das tetraciclinas no interior da célula (Huys *et al.*, 2004). Pois, na presença deste antimicrobiano, o complexo ribossomal é incapaz de sintetizar o peptídeo principal. Assim, um segundo sítio de ligação se torna acessível, o que permite a síntese da bomba de efluxo. Desta forma, as proteínas associadas à membrana exportam a tetraciclina da célula reduzindo a concentração do antimicrobiano e protegendo os ribossomos intracelulares (Chopra & Roberts, 2001; Miller *et al.*, 2014; Ness *et al.*, 2014).

O uso de tetraciclinas para o tratamento de infecções clínicas tornou-se limitado, uma vez que a resistência a esses antimicrobianos se tornou comum em diversos gêneros bacterianos (Speer *et al.*, 1992). Este antibiótico também é usado como promotores de crescimento na produção animal. O amplo uso deste antimicrobiano o leva à pressão seletiva e conduz a um aumento na presença de genes de resistência adquiridos entre as bactérias de diferentes gêneros (Choi & Woo, 2015). Quando o antibiótico é adicionado à alimentação animal, mesmo que em baixas concentrações, há um estímulo da transferência de alguns elementos transmissíveis, podendo aumentar essa transferência de elementos que conferem resistência, bem como selecionar as cepas que adquirem esses genes (Speer *et al.*, 1992; Choi & Woo, 2015).

3.3.6 Resistência a β -lactâmicos

Espécies de *Enterococcus* sp. normalmente exibe baixa resistência intrínseca aos β -lactâmicos, como a penicilina e ampicilina, os quais exercem efeito bacteriostático (Garrido *et al.*, 2014). A resistência à ampicilina, por exemplo, é mais rara em *E. faecalis* e ocorre na maior parte das vezes (90%) em cepas de *E. faecium* isoladas de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) (Arias & Murray, 2012).

Os antimicrobianos pertencentes a este grupo têm a capacidade de inibirem a síntese da parede celular, impedindo assim que as ligações cruzadas entre as fitas de glicopeptídeos se formem. Já foram descritos dois mecanismos de resistência à β -lactâmicos para a espécie *E. faecalis*, um deles é a produção da enzima β -lactamase que tem a capacidade de hidrolisar os antimicrobianos desse grupo e o outro é a baixa afinidade das proteínas de ligação à penicilina (PBP), presentes nos enterococos (Ligozzi *et al.*, 1996; Hörner *et al.*, 2005; Ono *et al.*, 2005).

As β -lactamases são enzimas sintetizadas na membrana celular, podendo também ser segregadas extracelularmente e encontradas nos cromossomos e plasmídeos, sendo assim transferíveis de uma célula para outra (Konemann *et al.*, 2001). A resistência natural intrínseca dos enterococos aos β -lactâmicos difere dentre as drogas deste grupo, sendo as penicilinas mais eficientes frente a essas bactérias, seguidas pelos carbapenens e cefalosporinas (Valdes *et al.*, 1998; Kak & Chow, 2002).

3.3.7 Resistência a Cloranfenicol

A ação bacteriostática deste antimicrobiano provém da inibição da síntese proteica, pela ligação à subunidade 50S do ribossomo, bloqueando a ação da enzima peptidiltransferase. Os enterococos apresentam resistência a este composto, comumente mediada pelo gene *cat* (chloramphenicol acetiltransferase), presente no cromossomo ou em plasmídeos, que codifica a enzima cloranfenicol acetiltransferase, alterando a estrutura química da substância de forma a perder a capacidade de ligação ao ribossomo. Esses genes foram classificados em dois grupos principais: tipo A, que geralmente resulta em uma resistência elevada, e tipo B, que confere baixo nível de resistência ao cloranfenicol. Embora esses determinantes sejam geralmente abrigados em elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons, eles também foram relatados como parte do cromossomo de algumas bactérias (Murray, 1990; Munita & Arias, 2016).

3.3.8 Resistência a Oxazolidinonas

O antimicrobiano que representa este grupo é a linezolida, que apresenta uma elevada atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas. A resistência a esse antimicrobiano está relacionada a uma mutação na região do gene que corresponde a atividade da peptidil-transferase no 23S rRNA (Prystowsky *et al.*, 2001). O mecanismo de ação à linezolida inibe a síntese proteica através da ligação com a subunidade 50S ribossomal, no sítio da peptidil-transferase do 23S rRNA, bloqueando a formação de um complexo entre o ribossomo, RNA transportador e RNA mensageiro (Fung *et al.*, 2001).

As cepas resistentes à linezolida também podem mostrar co-resistência a outros antibióticos, como à ampicilina, cloranfenicol, fluoroquinolonas, gentamicina, macrolídeos, nitrofurantoína, rifampicina e vancomicina (Garrido *et al.*, 2014). O gene *cfr* é o responsável pela resistência à linezolida, cujo se enquadra como plasmídeo determinante e vem sendo encontrado em isolados clínicos de *E. faecalis*. Sua sequência tem estabelecido a transferência de genes de resistência bem como alterado a sequência promotora das proteínas regulatórias ou ativado a expressão de determinantes de resistência. Isso explica a capacidade do gene *cfr* ser compartilhado entre as espécies e também fazer possível a disseminação generalizada no cenário clínico (Miller *et al.*, 2014).

3.3.9 Resistência a Nitrofurantoínas

A resistência à nitrofurantoína é bastante incomum, mesmo com o surgimento de *Enterococcus* sp. resistentes a diversos antimicrobianos, esses microorganismos possuem alta suscetibilidade a esses antimicrobianos (Butt *et al.*, 2004). Isso se deve ao seu complexo mecanismo de ação, onde o antimicrobiano usa as flavoproteínas de células bacterianas para convertê-las em múltiplas formas intermediárias que danificam o DNA. Esse mecanismo faz com que ocorra a inibição do metabolismo de carboidratos e a interferência na síntese da parede celular. Mesmo assim, os dados são limitados quando se referem à atividade deste antimicrobiano (Meena *et al.*, 2017).

3.3.10 Resistência a Rifampicinas

Os enterococos são frequentemente resistentes à rifampicina, mesmo que este antibiótico não seja comumente utilizado em infecções enterocócicas. O mecanismo de resistência está relacionado com as mutações em sítios específicos do gene *rpoB*, que codifica a subunidade β da RNA polimerase, que inibe a transcrição do mRNA (Kristich *et al.*, 2014; Garrido *et al.*, 2014).

3.4 *Enterococcus* Resistentes em Alimentos

O surgimento de enterococos resistentes a múltiplas drogas ao longo dos últimos 50 anos tem se agravado, e enterococos resistentes a antibióticos são agora as principais causas de infecção nosocomial em todo o mundo (Lebreton *et al.*, 2014). Há muito tempo, a resistência aos antimicrobianos tem sido relacionado exclusivamente ao ambiente hospitalar, mas atualmente com maior conhecimento sobre a aquisição e transmissão de resistência, tem atraído a atenção dos pesquisadores para outras fontes de propagação de cepas resistentes, como por exemplo, os alimentos (Gazzola *et al.* 2012; Wang 2012; Chajeka-Wierzchowska *et al.*, 2014).

Detectar cepas de *Enterococcus* em alimentos, examinando sua resistência a antimicrobianos e a presença de genes que codificam resistências a diferentes antimicrobianos permite avaliar os riscos e proceder com a correta inspeção dos alimentos. A presença de *Enterococcus* spp. em alimento não é levada em consideração nos critérios de higiene ou segurança de alimentos. Portanto, a vigilância da resistência aos antibióticos e a promoção do uso adequado de antibióticos são necessárias em todo o país. Estudos tem mostrado que enterococos resistentes a antibióticos em alimentos pode atuar como um reservatório de cepas resistentes, criando uma rota potencial de transferência de genes por transferência horizontal (Frazzon *et al.* 2010; Chajeka-Wierzchowska *et al.*, 2016).

A utilização de antimicrobianos como promotores do crescimento na produção animal pode promover resistência aos antibióticos nas bactérias da microbiota destes animais. Diversos estudos já apresentaram dados que remetem a uma ligação entre o uso do estimulante do crescimento avoparcina (glicopeptideo) em fazendas produtoras de galinhas e suínos e o crescimento na ocorrência de

cepas de enterococos resistentes a diversos antimicrobianos em humanos, bem como uma comprovação da evidência de transmissão aos humanos a partir de animais (Wegener *et al.*, 1999; Poeta *et al.*, 2004). O uso generalizado e indevido de antibióticos, tanto na medicina quanto na agricultura, aumentou a prevalência e a expressão de genes de resistência.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras de Alimentos

Cada alimento foi adquirido em três mercados diferentes da cidade de Porto Alegre – RS, Brasil. A aquisição das amostras de alimentos foi realizada entre setembro a novembro de 2016. Os alimentos, do mesmo tipo, foram sempre comprados no mesmo dia em mercados aleatórios de Porto Alegre – RS, Brasil (FIGURA 1).

Os seguintes alimentos foram utilizados: aipim (n=3), batata-doce (n=3), batata-inglesa (n=3), beterraba (n=3), cenoura (n=3), couve (n=3), carne de frango crua (n=3), queijo tipo colonial (n=3), queijo ricota (n=3) e salsa (n=3). Como o objetivo principal do estudo foi avaliar a resistência a antimicrobianos em cepas de enterococos.

FIGURA 1 – Localização da cidade de Porto Alegre – RS, Brasil, onde as coletas foram realizadas.



Fonte: Google Maps, 2017.

4.2 Processamento das Amostras: Semeadura, Isolamento e Identificação de *Enterococcus* sp.

As amostras de alimentos foram processadas no Laboratório de Microbiologia Ambiental do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Primeiramente, foram pesados 25g de cada alimento e adicionados em 225 mL de Água Peptonada Alcalina (APA) estéril por 18 horas, a 37°C. Posteriormente, 1 mL dessa suspensão foi inoculada em 9 mL do meio Caldo Azida Dextrose (*Azida Dextrose Broth*, Himedia®, Índia) e incubada a 35°C, durante 24 horas.

Após esse tempo de incubação, foi realizada diluição seriada em solução salina 0,85% até a diluição 10^{-3} , e 100 μ L da suspensão foi inoculada, em triplicata, em placas contendo ágar Infusão de Cérebro e Coração (BHI - *Brain Heart Infusion*, Himedia®) acrescido de 6,5% de Cloreto de Sódio (NaCl - Nuclear®). A adição de NaCl no meio de cultura teve com o objetivo fazer uma pressão seletiva, uma vez que bactérias do gênero *Enterococcus* toleram altas salinidades durante seu crescimento. As placas foram incubadas a 35°C, por 48 horas.

Doze colônias foram selecionadas aleatoriamente de cada uma das amostras de alimento. Colônias com morfologia típicas de *Enterococcus* foram submetidas a testes preliminares para identificação presuntiva em nível de gênero, sendo eles: coloração de Gram, teste da catalase, hidrólise da esculina em combinação a resistência a sais biliares e crescimento a 10°C e 45°C.

Cada isolado selecionado foi inoculado em meio Ágar Bile Esculina (*Bile Esculin Agar*, Himedia®) e incubados a 35°C durante 24 horas. Isolados que se apresentaram positivos para a degradação da esculina na presença de sais biliares, com escurecimento do meio de cultura, foram semeados por esgotamento em meio BHI e incubados a 35°C por 24 horas.

A partir do isolamento de colônias puras em meio BHI, as mesmas foram submetidas a esfregaços corados pelo método de Gram. As colônias típicas de enterococos apresentam-se como cocos Gram-positivos isolados, aos pares ou em cadeias curtas.

Para detectar a presença da enzima catalase, uma porção do crescimento bacteriano foi depositada sobre uma gota de peróxido de hidrogênio (H₂O₂ - Lifar®) a 3% (v/v). Quando o micro-organismo possui a enzima, o teste da catalase

demonstra a decomposição do peróxido de hidrogênio, com formação de água e oxigênio molecular, observado através da presença de bolhas. No caso do gênero *Enterococcus*, não há a formação de bolhas, sendo, portanto, catalase negativo.

Após a caracterização presuntiva quanto ao gênero, os isolados foram classificados como *Enterococcus* sp., os mesmos foram inoculados em ágar BHI (Himedia®) e incubados a 35°C durante 24 horas, a partir desse cultivo, as colônias foram preservadas em solução contendo 50% (v/v) de glicerol (Vetec®) e armazenados em criotubos a -20°C para análises moleculares posteriores e a fim de evitar que características importantes fossem perdidas com o tempo de manuseio das colônias.

4.3 Extração de DNA Bacterianos

A extração do DNA de cada isolado bacteriano foi realizada através do método de lise térmica descrita por Riboldi *et al.* (2009), onde uma colônia do isolado cultivada a 35°C durante 24 horas em ágar BHI, foi suspensa em 100 µL de água MiliQ estéril e submetida à fervura a 100°C por 10 minutos. Posteriormente, as suspensões bacterianas foram centrifugadas a 13000 x g durante 10 minutos em micro centrífuga (Eppendorf® Minispin®). Os DNAs extraídos foram armazenados a -20°C para realização dos testes moleculares.

4.4 Confirmação do Gênero *Enterococcus* por PCR

A confirmação da identificação do gênero *Enterococcus* dentre os isolados foi realizada por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) empregando oligonucleotídeos iniciadores gênero-específico, seguindo o protocolo descrito por Ke *et al.* (1999). Para a reação de PCR foram utilizados 25 µL de volume total, contendo: 1x de tampão *Taq* DNA polimerase (Ludwig Biotecnologia), 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Ludwig Biotecnologia), 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs (Ludwig Biotecnologia), 1U de *Taq* DNA Polimerase (Ludwig Biotecnologia), 100 ng de DNA e água MilliQ estéril para completar o volume da reação. Foi utilizado oligonucleotídeos iniciadores que amplificam o gene *tuf* e 16S *rDNA* para análise do gênero *Enterococcus* (Tabela 1).

Para a amplificação foi utilizado o termociclador 2720 Thermal Cycler nas seguintes condições: desnaturação inicial por 3 minutos a 95°C, seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C, 1 minuto a 72°C e extensão final por 7 minutos a 72°C. A cepa *E. faecalis* ATCC 29212 foi utilizada como controle positivo durante as reações.

O amplicon esperado com massa molecular de 112 pb foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen®), com visualização em Transiluminador L.Pix (Loccus Biotecnologia®, Molecular Imaging).

4.5 Identificação das Espécies de *Enterococcus* sp.

Para a identificação das espécies utilizou-se duas técnicas: uma genotípica, por meio da PCR, utilizando oligonucleotídeos iniciadores espécie-específicos para *Enterococcus casseliflavus* e *Enterococcus faecalis*, e a técnica fenotípica com espectrometria de massa MALD-TOF, para as demais espécies identificadas.

4.5.1 PCR espécie-específico

Para a identificação das espécies *E. casseliflavus* e *E. faecalis* realizou-se PCR, utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para as diferentes espécies de enterococos, como exposto na tabela 1.

TABELA 1 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as reações de PCR para identificação das espécies de enterococos.

Oligonucleotídeos iniciadores ¹	Sequência (5'- 3')	Temperatura de Anelamento (°C)	Produto (pb)	Referência
Ent1	TACTGACAAACCATTTCATGATG	55	112	Ke <i>et al</i> , 1999
Ent2	AACTTCGTCACCAACGCGAAC			
<i>E. casseliflavus</i> F	TAGGATGTTACGTCTGCGTG	58	139	Medeiros <i>et al</i> , 2017
<i>E. casseliflavus</i> R	TTGTTGGTTTGGGCTTTTCCCG			
E16S 72f	CCGAGTGCTTGCACTCAATTGG	66	138	Sedgley <i>et al.</i> , 2005
E16S 210r	CTCTTATGCCATGCGGCATAAAC			
coccus16S rDNA-F	GAGAATGATGGAGGTAGAGC	60	123	Lehner <i>et al.</i> (2005)
coccus16S rDNA -R	GACTACGGATCTTATCACTC			

¹ *Enterococcus* sp. – gene *tuf* (Ent1 e Ent2); *E. casseliflavus* (*E. casseliflavus* F e *E. casseliflavus* R); *E. faecalis* (E16S 72f e E16S 210r); 16S rDNA (coccus16S rDNA-F e coccus16S rDNA-R).

As reações de PCR foram realizadas com o volume total de 25 µL, contendo 100 ng de DNA, 1x de tampão de reação da *Taq* DNA polimerase (4G®), 0,4 µM de cada oligonucleotídeos iniciadores (Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl₂ (4G®), 200 µM de dNTPs (Ludwig Biotecnologia®), 1U de *Taq* DNA polimerase (4G®) e Água MiliQ estéril para completar o volume da reação.

Os ciclos foram os seguintes: desnaturação inicial por 5 minutos a 95°C, seguido por 35 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 58°C (*E. casseliflavus* F e *E. casseliflavus* R), ou 66°C (E16S 72f e E16S 210r), 1 minuto a 72°C, seguido de 5 minutos a 72°C. As cepas de *E. casseliflavus* J21 (Santestevan et al., 2015) e *E. faecalis* ATCC 29212, foram utilizadas como controle positivo.

4.5.2 MALDI-TOF

A partir das cepas preservadas em glicerol, os isolados foram cultivados a 35°C por 24 horas em caldo BHI para recuperação dos mesmos. Seguido esse período de incubação, os isolados foram semeados em ágar BHI e incubados a 35°C por 18 horas. Posteriormente, selecionou-se uma colônia de cada isolado, e pelo método de transferência direta as amostras foram aplicadas sobre cada *spot* na placa alvo do MALDI-TOF. Após secagem, foi adicionado sobre cada *spot* 1 µL de solução matriz HCCA e deixado a temperatura ambiente até secar.

A placa foi colocada no Microflex LT/SH (BrukerDaltonics) e a identificação dos isolados foi realizada pelo software MALDI Biotyper 4.0 com base nos perfis gerados. Os isolados foram considerados corretamente identificados ao nível de gênero quando os scores foram $\geq 1,7$ e ao nível de espécie, quando os scores foram ≥ 2 .

4.6 Teste de Suscetibilidade a Antimicrobianos

Doze antimicrobianos pertencentes a dez classes distintas foram testados frente às cepas estudadas e estas categorizadas em susceptível, intermediária ou resistente conforme recomendado pelo CLSI (2015) (Tabela 2). Os fármacos utilizados foram Ampicilina – AMP (10 µg/ml), Ciprofloxacina - CIP (5µg/ml), Cloranfenicol – CLO (30 µg/ml), Eritromicina – ERI (15µg/ml), Linezolida – LNZ (30µg/ml), Nitrofurantoína – NIT (300µg/ml), Norfloxacina - NOR (10µg/ml),

Rifampicina – RIF (5µg/ml), Tetraciclina –TET (30 µg/ml), Vancomicina –VAN (30 µg/ml). Para detecção de níveis elevados de resistência aos aminoglicosídeos (HLR-A) foram utilizados discos de Estreptomicina – EST (300µg/ml) e Gentamicina – GEN (120µg).

TABELA 2 – Interpretação dos diâmetros das zonas de inibição do crescimento microbiano para *Enterococcus* spp.

Antimicrobiano**	Concentração	Diâmetro do halo total de inibição em mm		
		R ^b	I ^c	S ^d
AMP	10 µg	≤ 16	-	≥ 17
CIP	5 µg	≤ 15	16 - 20	≥ 21
CLO	30 µg	≤ 12	13 - 17	≥ 18
ERI	15 µg	≤ 13	14 - 22	≥ 23
EST	300 µg	≤ 6	7 - 9	≥ 10
GEN ^a	120 µg	≤ 6	7 - 9	≥ 10
LNZ	50 µg	≤ 20	21 - 22	≥ 23
NIT	300 µg	≤ 14	15 - 16	≥ 17
NOR	10 µg	≤ 12	13 - 16	≥ 17
RIF	5 µg	≤ 16	17 - 19	≥ 20
TET	30 µg	≤ 14	15 - 18	≥ 19
VAN	30 µg	≤ 14	15 - 16	≥ 17

Fonte – CLSI (2016)

*: AMP: Ampicilina; CIP: Ciprofloxacina; CLO: Clorofenicol; ERI: Eritromicina; EST: Estraptomicina; GEN: Gentamicina; LIN: Linezolida; NIT: Nitrofurantoina; NOR: Norfloxacina; RIF: Rifampicina; TET: Tetraciclina; VAN: Vancomicina.^a Aminoglicosídeos resistentes a altos níveis; ^b Resistente; ^c Intermediário; ^d Sensível.

4.6.1 Determinação da Susceptibilidade aos Antimicrobianos pelo Método de Difusão em Ágar

Foi utilizado o método de difusão em ágar (JORGENSEN *et al.*, 2005) e os resultados interpretados seguindo as normas do CLSI (2016).

As cepas identificadas foram semeadas em tubos com Ágar BHI e incubadas a 35^o C por 24 horas. Posteriormente uma alçada de cada cultura foi emulsionada em solução salina estéril 0,85% e comparada com o padrão de turbidez 0,5 da Escala de McFarland. A turbidez foi comparada ao padrão da Escala de McFarland equivalente a uma suspensão contendo aproximadamente 10⁸ Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/mL (CLSI, 2015).

Foram semeadas três placas contendo ágar BHI com o auxílio de um swab esterilizado umedecido de cada emulsão bacteriana. Em seguida, as placas foram mantidas entreabertas por um período de 3 minutos, a fim de se permitir que o excesso de umidade fosse absorvido. Os discos dos antimicrobianos foram

depositados individualmente, com o auxílio de uma pinça, previamente esterilizada, na superfície do ágar. Foram dispostos quatro discos de antimicrobianos por placa. Após a aplicação dos discos, as placas foram invertidas e incubadas em estufa a 35°C por 18-24 horas. A medida dos halos de inibição do crescimento microbiano foi efetuada utilizando-se paquímetro.

4.6.2 Concentração Mínima Inibitória (MIC)

Para os antimicrobianos Vancomicina (VAN), Gentamicina (GEN) e Estreptomina (EST) foram realizados os ensaios de determinação de concentração mínima inibitória para confirmar o perfil de resistência. Para a MIC, utilizou-se a técnica de microdiluição em caldo, conforme recomendações do CLSI (2016). Os sais dos antimicrobianos foram estocados a - 20°C. As soluções concentradas dos antimicrobianos foram diluídas em água destilada esterilizada, considerando a concentração de cada antimicrobiano fornecida pelos fabricantes dos mesmos.

Os ensaios seguiram por um protocolo adaptado sob as recomendações do CLSI (2016). Os isolados preservados foram inoculados em meio sólido BHI a 35°C por 24 horas. A partir das culturas de 24 horas, preparou-se suspensões bacterianas em solução salina 0,85 % de NaCl estéril, e foram ajustadas de acordo com a escala de 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). A técnica de microdiluição em caldo foi realizada em placa de 96 poços estéril, contendo caldo Miller Hilton, suspensão bacteriana e solução dos antimicrobianos.

4.6.2.1 Determinações da Concentração Inibitória Mínima para Isolados não Susceptíveis à Vancomicina

Foram analisados quanto a concentração inibitória mínima, os isolados que demonstraram resistente-intermediário ou resistente ao antimicrobiano Vancomicina (30 µg) pelo método de disco de difusão, conforme recomendações do CLSI (2017). Testou-se a vancomicina nas concentrações de 32 µg mL⁻¹ a 0,5 µg mL⁻¹.

Foi utilizada como controle positivo a cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e como controle negativo apenas caldo MH e antimicrobiano. Após a inoculação dos controles e das amostras em duplicata, as placas foram incubadas a

35°C, por 16-20 horas. A leitura da MIC foi realizada após esse período de incubação e o resultado considerado foi a menor concentração de antibiótico na qual não se observou visualmente o crescimento bacteriano. Os critérios de suscetibilidade e resistência adotados para cada antimicrobiano foram os recomendados pelo CLSI (2016).

4.6.2.2 Determinação da concentração inibitória mínima para isolados resistentes a gentamicina e a estreptomicina

Determinou-se a concentração inibitória mínima para os isolados com halos inferiores ao diâmetro de 9 mm nos discos de gentamicina (120 µg) e estreptomicina (300 µg) no teste de disco-difusão. Foram preparadas soluções dos antimicrobianos a serem testados, uma solução de Estreptomicina na concentração de 1000µg/mL, e uma solução de Gentamicina na concentração de 500µg/mL.

Utilizou-se como controle positivo a cepa de *E. faecalis* ATCC 29212, que é sensível a ambos os antimicrobianos, e como controle negativo apenas caldo MH e o antimicrobiano. Os isolados e os controles (positivo e negativo) foram submetidos aos mesmos testes de microdiluição em triplicata, e incubados a 35°C, por 24 horas para gentamicina, e por 24-48 horas para estreptomicina. Considerou-se resistente o isolado capaz de crescer na presença do antimicrobiano, representado por um depósito visível de sedimento celular e pelo aumento de turbidez no meio de cultivo.

4.7 Determinação dos genes de resistência nos isolados de *Enterococcus* sp. por PCR

A verificação dos genes de resistência foi realizada somente nos isolados que apresentaram fenótipo de resistentes-intermediárias ou resistentes aos antimicrobianos eritromicina (genes *ermA*, *ermB*, *ermC* e *msrC*), ciprofloxacina e/ou norfloxacina (gene *gyrA*), tetraciclina (genes *tetL*, *tetM*, *tetS*) e gentamicina (gene *aac(6')/aph(2')*). As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores estão descritas na tabela 3.

TABELA 3 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as reações de PCR e tamanhos dos fragmentos gerados. *tetM*, *tetL*, *tetS*, *ermA*, *ermB*, *ermC*, *gyrA*, *msrC* e *aac(6')/aph(2')*.

Oligonucleotídeos iniciadores	Sequência (5'- 3')	Temperatura de anelamento (°C)	Produto (pb)	Referência
<i>tet(M)_F</i>	GTTAAATAGTGTTCTTGGAG	52	657	Aarestrup <i>et al.</i> (2000)
<i>tet(M)_R</i>	CTAAGATATGGCTCTAACAA			
<i>tet(L)_F</i>	ACTCGTAATGGTGTAGTTGC	54	625	Frazzon <i>et al.</i> (2010)
<i>tet(L)_R</i>	TGTAACCTCCGATGTTTAACACG			
<i>tet(S)_F</i>	TGGAACGCCAGAGAGGTATT	58	720	Aarestrup <i>et al.</i> (2000)
<i>tet(S)_R</i>	ACATAGACAAGCCGTTGACC			
<i>erm(A)_F</i>	TCTAAAAAGCATGTAAGAA	52	420	Sutcliffe <i>et al.</i> (1996)
<i>erm(A)_R</i>	CTTCGATAGTTTATTAATATTAGT			
<i>erm(B)_F</i>	GAAAAGGTAACAACCAATA	52	546	Sutcliffe <i>et al.</i> (1996)
<i>erm(B)_R</i>	AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC			
<i>erm(C)_F</i>	TCAAAACATAATATAGATAAA	52	837	Sutcliffe <i>et al.</i> (1996)
<i>erm(C)_R</i>	GCTAATATTGTTTAAATCGTCAAT			
<i>gyr(A)_F</i>	ATGAACGAATTGGGTGTG	52	250	Rathnayake <i>et al.</i> (2011)
<i>gyr(A)_R</i>	AAGGAATCCTTCTCTCTCCG			
<i>msrC 3</i>	AAGGAATCCTTCTCTCTCCG	52	343	Werner <i>et al.</i> (2001)
<i>msrC 4</i>	GTAACAAAATCGTTCCCG			
GN-R	CACTATCATAACCACTACCG	56	220	Wei Jia <i>et al.</i> (2014)
GN-F	CCAAGAGCAATAAGGGCATA			

¹Tetraciclina – gene *tetM* (*tetM_F* e *tetM_R*); gene *tetL* (*tetL_F* e *tetL_R*); gene *tetS* (*tetS_F* e *tetS_R*);

¹Eritromicina – gene *ermA* (*ermA_F* e *ermA_R*); gene *ermB* (*ermB_F* e *ermB_R*); *ermC* (*ermC_F* e *ermC_R*); gene *msrC* (*msrC 3* e *msrC 4*);

¹Ciprofloxacina e Norfloxacina – gene *gyrA* (*gyrA_F* e *gyrA_R*);

¹Gentamicina – gene *aac(6')/aph(2')* (GN-R e GN-F);

Realizou-se a reação de PCR em um volume total de 25 µL, contendo 1x de tampão de PCR (Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen®), 200 µM de dNTPs (Ludwig Biotecnologia), 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Invitrogen®), 1U de *Taq* DNA polimerase (4G®), 100 ng de DNA e água miliQ estéril para completar o volume da reação. Para o gene *gyrA*, a reação da PCR foi realizada como descrito acima com exceção do MgCl₂ que foi empregado na concentração de 3,0 mM.

Os ciclos de amplificação foram conduzidos sob as seguintes condições: 5 minutos a 94°C, seguido por 35 ciclos consecutivos de 94°C por 1 minuto, 1 minuto a 52°C (*tet(M)*, *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *gyr(A)* e *msr(C)*), ou 54°C (*tet(L)*), ou 56°C (GN), ou 58°C (*tet(S)*), 72°C por 1 minuto; e uma etapa final de 5 minutos a 72°C. Em seguida, os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% e visualizados em Transiluminador L. Pix (Loccus Biotecnologia®, Molecular Imaging).

4.8 Análise Estatística

Os resultados obtidos quanto à incidência, aos padrões de suscetibilidade a antimicrobianos e os genes de resistência do gênero estudado foram, organizados em tabelas e os valores convertidos em percentuais.

A análise comparativa com os dados encontrados em 2006 foi realizada juntamente com o NAE – Núcleo de Assessoria Estatística da UFRGS, utilizando qui-quadrado para o teste exato de Fischer pelo programa SPSS versão 18.

5. RESULTADOS

5.1 Distribuição e Identificação dos Isolados das Amostras de Alimentos

As amostras de alimento foram adquiridas em três diferentes mercados de Porto Alegre, com o intuito de obter uma amostragem em triplicata de cada um dos alimentos utilizados no presente estudo. De cada um das amostras de alimentos foram selecionadas 12 colônias aleatórias, totalizando 36 isolados por cada tipo de alimento. Nas amostras de aipim, batata-doce, batata-inglesa, carne de frango crua, queijo colonial e ricota conseguiu-se isolar e confirmar como gênero *Enterococcus* todos 36 isolados, entretanto das amostras de beterraba; cenoura; couve; e salsa, das 36 colônias selecionadas, 24, 3, 33 e 34 confirmaram como enterococos, respectivamente.

Ao total foram obtidos 324 isolados bacterianos das amostras de alimentos, os quais foram classificadas presuntivamente por testes fenotípicos como *Enterococcus* sp., sendo que destes 310 (95,67%) confirmaram pertencer ao gênero pela técnica de PCR (Tabela 4).

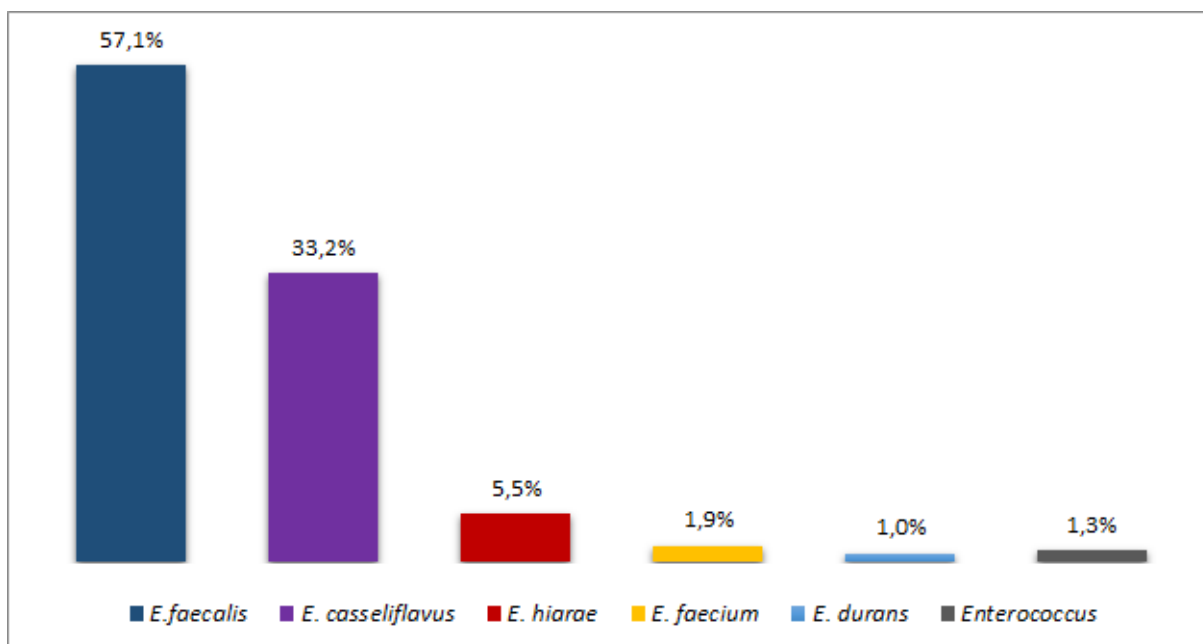
TABELA 4 - Origem de *Enterococcus* isolados de alimento de Porto Alegre, RS

Número (%) de enterococos isolados por alimento									
AP	BI	BD	BT	CE	CV	FR	QJ	RT	AS
36	36	36	24	3	33	36	36	36	34
(11,6)	(11,6)	(11,6)	(7,7)	(1,0)	(10,6)	(11,6)	(11,6)	(11,6)	(11,0)

AP: Aipim; BI: Batata-inglesa; BD: Batata-doce; BT: Beterraba; CE: Cenoura; CV: Couve; FR: carne de frango cru; QJ: Queijo colonial; RT: Ricota; e SA: Salsa.

Nos isolados confirmados como enterococos, foram identificadas cinco espécies distintas, das quais mostrou-se dominante a espécie *Enterococcus faecalis* (57,1%; n = 177), seguida de *Enterococcus casseliflavus* (33,2%; n = 103), e em menores quantidades *Enterococcus hirae* (5,5%; n = 17), *Enterococcus faecium* (1,9%; n = 6) e *Enterococcus durans* (0,96%; n = 3) e *Enterococcus* spp. (1,29%; n = 4) (Figura 2).

FIGURA 2 - Frequência das espécies de *Enterococcus* isoladas de alimentos de Porto Alegre-RS em 2016.



Na tabela 5, estão expressas as quantidades de cepas identificadas de acordo com as amostras de alimentos das quais foram isoladas. *Enterococcus faecalis* (n=177) foi a espécie mais frequente dentre os isolados, ocorrendo em praticamente todas as amostras, sendo predominando nas amostras de carne de frango crua (n=36), e queijo colonial (n=36), não sendo isolada apenas de beterraba. A espécie *E. casseliflavus* (n=103) também ocorreu com grande frequência, onde os maiores valores foram encontrados nas amostras de beterraba (n=24), batata-doce (n=21) e salsa (n=22). Enquanto que as demais espécies *E. hirae* (n=17), *E. faecium* (n=6), *Enterococcus* spp. (n=4) e *E. durans* (n=3) ocorreram com frequência bem inferior nos alimentos avaliados.

Em 2006 foram isolados 56 cepas de *Enterococcus* provenientes dos alimentos obtido em Porto Alegre, que identificou-se como *E. faecalis* (n=27), *E. faecium* (n=23), *E. mindtii* (n=1) e *Enterococcus* sp. (n=5). Em relação à distribuição das espécies nos alimentos, *E. faecalis* foi a espécie mais prevalente dentre as amostras de carne e queijo, assim como no presente estudo. Entretanto nas amostras vegetais a espécie mais predominante foi *E. faecium* em 2006 e *E. casseliflavus* em 2016.

TABELA 5 – Espécies de *Enterococcus* spp. identificadas por amostra de alimento.

Amostras	Número de espécies de enterococos					
	<i>E. faecalis</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus</i> spp
AP	24	12	-	-	-	-
BD	12	21	-	-	1	2
BI	17	19	-	-	-	-
BT	-	24	-	-	-	-
CE	3	-	-	-	-	-
CV	26	5	1	-	1	-
FR	36	-	-	-	-	-
QJ	36	-	-	-	-	-
RT	17	-	12	3	4	-
AS	6	22	4	-	-	2
	177	103	17	3	6	4

AP: Aipim; BI: Batata-inglesa; BD: Batata-doce; BT: Beterraba; CE: Cenoura; CV: Couve; FR: carne de frango cru; QJ: Queijo colonial; RT: Ricota; e SA: Salsa.

5.2 Perfis de Resistência aos Antimicrobianos

Os isolados foram classificados quanto a sua susceptibilidade aos antimicrobianos de acordo com CLSI (2016) (Tabela 6). Dos 310 isolados, 33 (10,64%) foram susceptíveis a todos os antimicrobianos testados, enquanto que 277 (89,35%) apresentaram resistência a pelo menos um dos fármacos estudados. Dentre os antimicrobianos testados, ampicilina, cloranfenicol, gentamicina e vancomicina apresentaram maior eficácia frente as cepas isoladas.

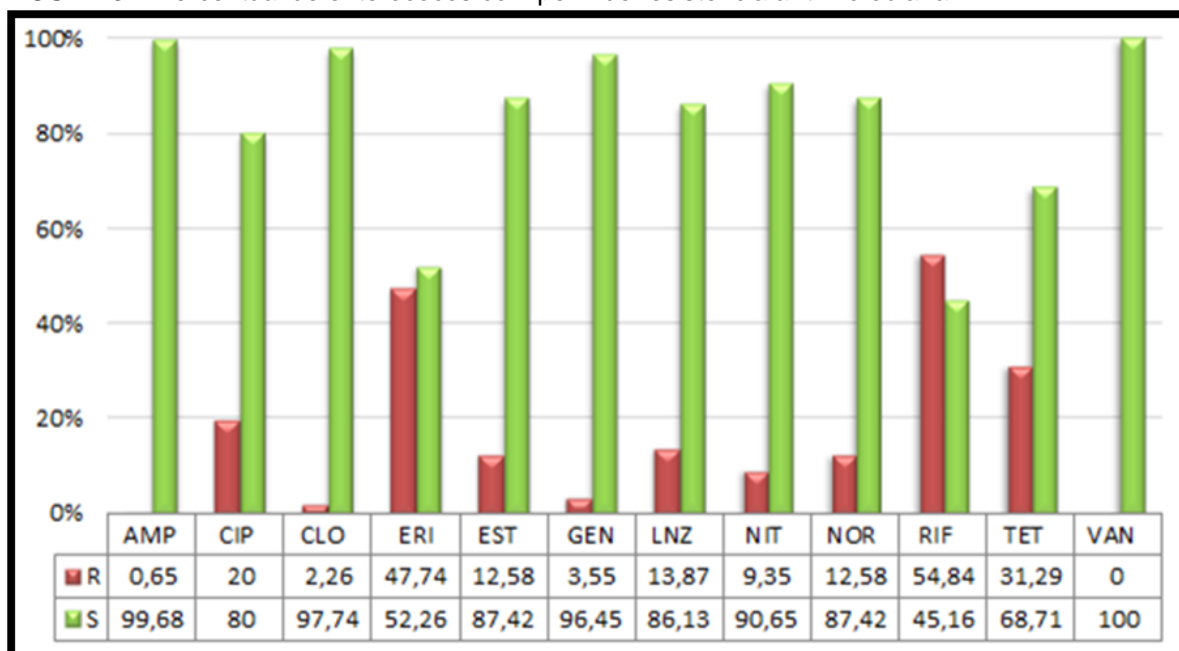
TABELA 6. Perfil de susceptibilidade das cepas de *Enterococcus* em relação ao alimento que foram isoladas.

Antimicrobiano*	Número (%) de <i>Enterococcus</i> classificados como		
	Susceptível (%)	Intermediário (%)	Resistente (%)
AMP	308 (99,35)	-	2 (0,65)
CIP	248 (80)	57 (18,39)	5 (1,61)
CLO	303 (97,74)	3 (0,97)	4 (1,29)
ERI	162 (52,26)	93 (90)	55 (17,74)
EST	271 (87,42)	-	39 (12,58)
GEN	299 (96,45)	-	11 (3,55)
LNZ	267 (86,13)	22 (7,10)	21 (6,77)
NIT	281 (90,65)	8 (2,58)	21 (6,77)
NOR	271 (87,42)	23 (7,42)	16 (5,16)
RIF	140 (45,16)	56 (18,06)	114 (36,77)
TET	213 (68,71)	12 (3,87)	85 (27,42)
VAN	310 (100,0)-	-	-

*: AMP – Ampicilina; CIP – Ciprofloxacina; CLO – Cloranfenicol; ERI – Eritromicina; EST – Estreptomicina; GEN – Gentamicina; LNZ – Linezolida; NIT – Nitrofurantoína; NOR – Norfloxacina; RIF – Rifampicina; TET – Tetraciclina; VAN – Vancomicina

Os maiores números de cepas de resistência foram observados para os antibióticos: rifampicina (54,8%; n=170), eritromicina (47,74%; n=148), tetraciclina (31,29%; n=97) e ciprofloxacina (20%; n=62) (Figura 3).

FIGURA 3 – Percentual de enterococos com perfil de resistência antimicrobiana



OBS: Optou-se unir os dados obtidos como resistentes-intermediário e resistentes, em um só grupo de cepas resistentes;

R: Resistente; S: Suscetível; AMP: Ampicilina; CIP: Ciprofloxacina; CLO: Clorofenicol; ERI: Eritromicina; EST: Estreptomicina; GEN: Gentamicina; LN: Linezolida; NIT: Nitrofurantoina; NOR: Norfloxacin; RIF: Rifampicina; TET: Tetraciclina; VAN: Vancomicina.

Na tabela 7 pode-se observar os perfis de resistência encontrados nos isolados em relação às espécies. *E. faecalis* e *E. casseliflavus* tiveram maior frequência de cepas resistentes, com perfis de resistência a quase todos antimicrobianos testados, exceto à vancomicina. Já as demais espécies apresentaram perfis de resistência a um número menor de antimicrobianos, os *E. durans* mostraram resistência a CIP, ERI, LNZ, NIT e TET, os *E. faecium* à CIP, ERI, RIF e TET, os *E. hirae* à ERI, LNZ, RIF e TET, e *Enterococcus* sp. à NIT, NOR, RIF e TET.

Os 45 isolados (35 *E. faecalis*, 9 *E. casseliflavus* e 1 *E. faecium*) que apresentaram perfil fenotípico de resistência à estreptomicina pelo disco difusão foram submetidos à MIC. Os resultados da concentração mínima inibitória foram valores equivalentes a 1000,0 µg mL⁻¹, considerando então 86,7% (n=39) das cepas (33 *E. faecalis* e 5 *E. faecium*) resistentes ao antimicrobiano estreptomicina.

Um isolado de *E. casseliflavus* e 10 de *E. faecalis* que apresentaram perfil fenotípico de resistência à gentamicina pelo disco difusão também foram submetidos à MIC. Os resultados foram valores equivalentes a 500,0 µg mL⁻¹, considerando

então 72,7% (n = 8) das cepas, todas elas *E. faecalis* resistentes ao antimicrobiano gentamicina.

TABELA 7 - Perfil de resistência total (%) de amostras resistente e resistentes-intermediárias.

Antimicrobiano*	<i>E.casseliflavus</i> (n=103)	<i>E.durans</i> (n=3)	<i>E. faecalis</i> (n=177)	<i>E. fecium</i> (n=6)	<i>E.hirae</i> (n=17)	<i>Enterococcus</i> spp. (n=4)
AMP	0,97	-	0,56	-	-	-
CIP	13,59	33,33	24,29	66,67	-	-
CLO	1,94	-	2,82	-	-	-
ERI	37,86	66,67	54,8	83,33	29,41	-
EST	4,85	-	19,21	-	-	-
GEN	0,97	-	5,65	-	-	-
LNZ	8,74	33,33	15,82	-	29,41	-
NIT	16,5	66,67	5,08	-	-	25
NOR	11,65	-	14,69	-	-	25
RIF	62,14	-	53,67	16,67	52,94	25
TET	15,53	66,67	37,29	16,67	58,82	50
VAN	-	-	-	-	-	-

OBS: Optou-se unir os dados obtidos como resistentes-intermediário e resistentes, em um só grupo de cepas resistentes;

*: AMP: Ampicilina; CIP: Ciprofloxacina; CLO: Clorofenicol; ERI: Eritromicina; EST: Estraptomicina; GEN: Gentamicina; LIN: Linezolida; NIT: Nitrofurantoina; NOR: Norfloxacina; RIF: Rifampicina; TET: Tetraciclina; VAN: Vancomicina.

Os perfis de resistência encontrados nos isolados em relação a distribuição nos alimentos, estão ilustrados na tabela 8. Todos os alimentos avaliados neste estudo apresentaram elevada frequência de cepas resistentes, principalmente à eritromicina (47,74%; n=148) e à rifampicina (74,8%; n=170).

Os isolados de batata-inglesa e cenoura foram os que se mostraram mais susceptíveis aos antimicrobianos utilizados, sendo resistentes a apenas 3 (ERI, LNZ e RIF) e 4 (ERI, NIT, NOR e RIF) dos fármacos testados, respectivamente. As amostras de aipim apresentaram cepas com resistência a quase todos os antimicrobianos, exceto à vancomicina. Cepas resistentes à tetraciclina não foram detectadas somente nas amostras de batata inglesa e cenoura.

Os isolados das amostras de frango apresentaram resistência à nove dos antimicrobianos testados (CIP, ERI, EST, GEN, LNZ, NIT, NOR, RIF e TET), enquanto que os isolados das amostras de queijo colonial e couve mostraram-se resistentes à oito dos antimicrobianos (CIP, CLO, ERI, EST, NOR, RIF e TET), variando apenas na resistência para ampicilina nas amostras de queijo e linezolida nas amostras de couve.

As duas cepas resistentes à ampicilina foram isoladas das amostras de aipim (n=1) e queijo colonial (n=1), os sete isolados resistentes ao cloranfenicol foram provenientes de aipim (n=1), beterraba (n=1), couve (n=4) e queijo colonial (n=1), já as onze cepas resistentes à gentamicina, foram isoladas de aipim (n=1) e frango (n=10).

TABELA 8 – Perfil de resistência total de amostras resistente e resistentes-intermediárias.

AMOSTRA ²	Número (%) de cepas resistentes ao antimicrobianos ¹											
	AMP	CIP	CLO	ERI	EST	GEN	LIN	NIT	NOR	RIF	TET	VAN
AP	1 (2,8)	9 (25)	1 (2,8)	32 (88,9)	4 (11,1)	1 (2,8)	10 (27,8)	7 (19,4)	6 (16,7)	15 (41,7)	6 (16,7)	-
BD	-	1 (2,8)	-	5 (13,9)	-	-	-	11 (30,6)	8 (22,2)	32 (88,9)	1 (2,8)	-
BI	-	-	-	1 (2,8)	-	-	2 (5,6)	-	-	24 (66,7)	-	-
BT	-	4 (16,7)	1 (4,2)	11 (45,8)	1 (4,2)	-	-	-	-	23 (95,8)	1 (4,2)	-
CE	-	-	-	1 (33,3)	-	-	-	2 (66,7)	1 (33,3)	3 (100)	-	-
CV	-	19 (57,6)	4 (12,1)	25 (75,8)	13 (39,4)	-	9 (27,3)	-	7 (21,2)	14 (42,4)	13 (39,4)	-
FR	-	6 (16,7)	-	21 (58,3)	7 (19,4)	10 (27,8)	14 (38,9)	1 (2,8)	7 (19,4)	9 (25)	24 (66,7)	-
QJ	1 (2,8)	7 (19,4)	1 (2,8)	33 (91,7)	12 (33,3)	-	-	-	1 (2,8)	25 (69,4)	23 (63,9)	-
RT	-	11 (30,6)	-	12 (33,3)	-	-	8 (22,2)	2 (5,6)	2 (5,6)	11 (30,6)	16 (44,4)	-
SA	-	5 (14,7)	-	7 (20,6)	-	-	-	6 (17,6)	7 (20,6)	14 (41,2)	13 (38,2)	-

OBS: Optou-se unir os dados obtidos como resistentes-intermediário e resistentes, em um só grupo de cepas resistentes;

1: AMP: Ampicilina; CIP: Ciprofloxacina; CLO: Cloranfenicol; ERI: Eritromicina; EST: Estreptomicina; GEN: Gentamicina; LIN: Linezolida; NIT: Nitrofurantoina; NOR: Norfloxacin; RIF: Rifampicina; TET: Tetraciclina; VAN: Vancomicina.

2: AP: Aipim; BI: Batata-inglesa; BD: Batata-doce; BT: Beterraba; CE: Cenoura; CV: Couve; FR: carne de frango cru; QJ: Queijo colonial; RT: Ricota; e SA: Salsa.

Dentre os isolados, 97 cepas (31,3%) foram resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos, sendo consideradas, segundo Magiorakos *et al.* (2012), resistentes a múltiplas drogas (RMD) (Tabela 9). Apenas as cepas de *Enterococcus* spp. não foram classificadas como RMD. O perfil RMD para eritromicina, estreptomicina, rifampicina e tetraciclina (9,0%; n=9) foi o mais frequentemente

encontrado. De forma geral, as cepas RMD apresentaram resistência variando entre 3 a 7 classes de antimicrobianos, com 3 classes (n=49) ocorreram 20 perfis diferentes, com 4 classes (n=26) 16 perfis diferentes, 5 classes (n=15) 10 perfis diferentes, com 6 (n=2) 2 perfis diferentes e com 7 classes (n=1) apenas 1 perfil.

Em relação às espécies e seus perfis de RMD, *E. faecalis* (67,0%; n=65) e *E. casseliflavus* (23,7%; n=23) tiveram a maior frequência de cepas RMD, quando comparados com as demais espécies.

Com análise estatística foi possível observar uma diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os perfis de resistência encontrados neste estudo e 2006. Houve diminuição na porcentagem de cepas resistentes à ampicilima, ciprofloxacina, clorofenicol, gentamicina e vancomicina, presente nas amostras de alimentos. Em 2006, 34% das cepas eram resistentes à ciprofloxacina (n= 19), 25% ao clorofenicol (n=14), 16% à gentamicina (n=9), 5,35% à ampicilina (n= 3) e 1,78% à vancomicina (n=3).

TABELA 9 – Perfis de resistência verificados para as espécies de *Enterococcus* spp. isoladas

Perfis de resistência*	Numero de espécies de enterococos resistentes						Σ
	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. hirae</i>	<i>Enterococcus</i> spp.	
CIP	-	1	9	-	-	-	10
CLO	-	-	1	-	-	-	1
ERI	3	-	10	1	-	-	14
LIN	-	-	6	-	-	-	6
RIF	22	-	28	1	-	-	50
TET	10	-	-	-	-	2	12
(CIP + NOR)*	-	-	2	-	-	-	2
CIP + ERI	-	-	5	3	-	-	8
CIP + LIN	-	-	1	-	-	-	1
CIP + RIF	4	-	-	-	-	-	4
CLO + LIN	-	-	1	-	-	-	1
ERI + EST	-	-	1	-	-	-	1
ERI + LIN	2	-	1	-	-	-	3
ERI + NIT	1	-	-	-	-	-	1
ERI + RIF	16	-	1	-	1	-	17
ERI + TET	-	-	6	-	2	-	8
EST + RIF	1	-	-	-	-	-	1
EST + TET	-	-	1	-	-	-	1
LIN + RIF	1	-	1	-	1	-	3
LIN + TET	-	-	1	-	2	-	3
NIT + NOR	2	-	-	-	-	-	2
NIT + RIF	-	-	4	-	-	-	4
NOR + RIF	-	-	1	-	-	-	1
(CIP + NOR) + NIT*	-	-	2	-	-	-	2
(CIP + NOR) + TET*	1	-	-	-	-	-	1
CIP + CLO + ERI	-	-	1	-	-	-	1
CIP + ERI + TET	-	-	-	1	-	-	1
CIP + ERI + RIF	2	-	4	-	-	-	6
CIP + LIN + RIF	-	-	1	-	-	-	1
CIP + RIF + TET	1	-	-	-	-	-	1
CLO + ERI + RIF	2	-	-	-	-	-	2
ERI + EST + NIT	1	-	-	-	-	-	1
ERI + EST + TET	-	-	6	-	-	-	6
ERI + GEN + TET	-	-	4	-	-	-	4
ERI + LIN + RIF	1	-	-	-	-	-	1
ERI + LIN + TET	-	-	2	-	-	-	2
ERI + NIT + TET	-	1	-	-	-	-	1
ERI + NOR + RIF	-	-	3	-	-	-	3
ERI + RIF + TET	1	-	7	-	-	-	8
GEN + LIN + TET	-	-	1	-	-	-	1
LIN + NIT + TET	1	-	-	-	-	-	1

LIN + RIF + TET	-	-	-	-	1	-	1
NIT + NOR + RIF	6	-	-	-	-	-	6
(CIP + NOR) + ERI + LIN*	-	-	1	-	-	-	1
(CIP + NOR) + ERI + RIF*	1	-	-	-	-	-	1
CIP + ERI + EST + TET	-	-	2	-	-	-	2
CIP + ERI + RIF + TET	-	-	1	-	-	-	1
CLO + ERI + EST + TET	-	-	1	-	-	-	1
ERI + EST + NOR + TET	-	-	1	-	-	-	1
ERI + EST + RIF + TET	-	-	9	-	-	-	9
ERI + GEN + LIN + TET	-	-	1	-	-	-	1
ERI + GEN + RIF + TET	-	-	1	-	-	-	1
ERI + LIN + NIT + TET	-	1	-	-	-	-	1
ERI + LIN + RIF + TET	-	-	-	-	1	-	1
ERI + NIT + NOR + RIF	1	-	-	-	-	-	1
NIT + NOR + RIF + TET	1	-	-	-	-	-	1
CIP + ERI + (EST + GEN) + LIN*	1	-	-	-	-	-	1
(CIP + NOR) + ERI + LIN + RIF*	-	-	2	-	-	-	2
(CIP + NOR) + ERI + LIN + TET*	-	-	1	-	-	-	1
(CIP + NOR)* + ERI + RIF + TET	-	-	1	-	-	-	1
ERI + (EST + GEN)* + LIN + TET	-	-	1	-	-	-	1
AMP + ERI + EST + RIF + TET	-	-	1	-	-	-	1
CIP + ERI + EST + LIN + RIF	-	-	1	-	-	-	1
CIP + ERI + EST + LIN + TET	-	-	1	-	-	-	1
CIP + ERI + EST + RIF + TET	-	-	1	-	-	-	1
CIP + ERI + LIN + NIT + RIF	1	-	-	-	-	-	1
CIP + ERI + LIN + NIT + TET	1	-	-	-	-	-	1
ERI + EST + LIN + NIT + TET	1	-	-	-	-	-	1
ERI + GEN + LIN + RIF + TET	-	-	1	-	-	-	1
(CIP + NOR) + ERI + EST + LIN + TET *	-	-	2	-	-	-	2
(CIP + NOR) + ERI + EST + RIF + TET *	-	-	5	-	-	-	5
CLO + ERI + EST + LIN + NOR + TET	-	-	1	-	-	-	1
(CIP + NOR) + ERI + GEN + LIN + RIF + TET*	-	-	1	-	-	-	1
AMP + (CIP + NOR) + CLO + ERI + EST + NIT + RIF + TET*	1	-	-	-	-	-	1
Σ	86	3	147	6	8	2	252

OBS: Optou-se unir os dados obtidos como resistentes-intermediário e resistentes, em um só grupo de cepas resistentes;

* Entre “()” estão os antimicrobianos pertencentes a uma mesma classe;

AMP: Ampicilina; CIP: Ciprofloxacina; CLO: Clorofenicol; ERI: Eritromicina; EST: Estraptomicina; GEN: Gentamicina; LIN: Linezolida; NIT: Nitrofurantoina; NOR: Norfloxacinina; RIF: Rifampicina; TET: Tetraciclina; VAN: Vancomicina.

5.3 Presença de Genes de Resistência aos Antimicrobianos nos Isolados Identificados

Dos 148 isolados com perfil de resistência à eritromicina, 63 (42,56%) foram positivos para o gene *ermB* e sete (4,72%) para o gene *mrsC*. Os genes *ermA* e *ermC* não foram detectados para nenhuma das cepas resistentes analisadas. Entre os 78 isolados com perfil de resistência aos antimicrobianos ciprofloxacina e norfloxacina, apenas 10 (12,82%) apresentaram resultado positivo quando testados para o gene *gyrA*. Os genes que conferem resistência à tetraciclina foram positivos em 79 (81,44%) das cepas com o perfil de resistência à tetraciclina, dentre eles 56 (70,8%) apresentaram o gene *tetM*, três (3,79%) o gene *tetL*, 20 (25,31%) os dois genes *tetM* e *tetL*. Nenhuma das cepas resistentes a tetraciclina foi positiva para o gene *tetS*. Já o gene *aac(6')/aph(2')* foi detectado em 10 (90,9%) cepas resistentes à gentamicina.

Em relação a distribuição dos genes nos alimentos, na tabela 10 está a frequência dos genes de resistência detectados. O gene que apresentou maior prevalência entre as amostras foi *tetM* (24,51%), seguido por *ermB* (20,32%), *tetL* (2,42%), *aac(6')/aph(2')* e *gyrA* (3,22%) e *mrsC* (2,25%) quando calculados em relação ao número total de cepas isoladas neste trabalho. O gene *aac(6')/aph(2')* foi detectado apenas nas amostras de frango.

TABELA 10 – Detecção de genes de resistência nas estirpes isoladas das amostras de alimentos coletados em mercados de Porto Alegre – RS

Amostras*	Número de genes de resistencia						Σ
	<i>aac(6')/aph(2')</i>	<i>gyrA</i>	<i>ermB</i>	<i>mrsC</i>	<i>tetM</i>	<i>tetL</i>	
AP	-	4	12	-	2	2	20
BD	-	-	-	-	-	-	-
BI	-	-	-	-	-	-	-
BT	-	-	-	-	-	-	-
CE	-	-	-	-	-	-	-
CV	-	2	14	3	12	-	19
FR	10	-	14	-	21	21	45
QJ	-	-	19	2	23	-	44
RT	-	3	4	2	6	-	15
AS	-	1	-	-	12	-	13
Σ	10	10	63	7	76	23	156

*: AP: Aipim; BI: Batata-inglesa; BD: Batata-doce; BT: Beterraba; CE: Cenoura; CV: Couve; FR: Frango; QJ: Queijo colonial; RT: Ricota; e SA: Salsa.

Na tabela 11, estão apresentados os números de genes de resistência detectados entre as espécies de enterococos. A espécie *E. faecalis* apresentou

todos os genes de resistência testados, nas demais espécies detectou-se os genes *gyrA*, *ermB* e *tetM* em *E. casseliflavus*, *gyrA*, *msrC* e *tetM* em *E. faecium*, *gyrA* e *ermB* em *E. durans*, *ermB* e *tetM* em *E. hirae* e *tetM* em *Enterococcus* spp.

TABELA 11 – Número de genes de resistência detectados divididos por espécies

GENES	Numero de cepas de enterococos						Σ
	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. hirae</i>	<i>Enterococcus</i> spp.	
<i>aac(6')/aph(2')</i>	-	-	10	-	-	-	10
<i>gyrA</i>	5	1	2	2	-	-	10
<i>ermB</i>	8	1	53	-	1	-	63
<i>msrC</i>	-	-	5	2	-	-	7
<i>tetM</i>	10	-	58	1	5	2	76
<i>tetL</i>	-	-	23	-	-	-	23

6. DISCUSSÃO

6.1 Origem e Identificação dos Isolados das Amostras de Alimentos

Micro-organismos do gênero *Enterococcus* foram durante muito tempo considerados como comensais, entretanto nas últimas décadas passaram a ser reconhecidos como importantes patógenos oportunistas (Edwards, 2000), devido a suas características de resistência intrínseca ou adquirida aos antimicrobianos, seu arsenal de características diferenciais, que contribuem para a virulência do micro-organismo. Além disto, sua capacidade de sobrevivência em condições ambientais bastante adversas lhes confere facilidade de disseminação e representatividade nos ambientes nosocomiais (Gilmore *et al.*, 2002; Giraffa *et al.*, 2002).

A natureza ubíqua dos enterococos faz com que seja comum seu isolamento de uma ampla variedade de alimentos, mesmo aqueles que passam por processamentos na tecnologia de produção onde os micro-organismos presentes são submetidos a condições extremas de temperatura, pH e salinidade são passíveis de os apresentarem viáveis no final do processo (Giraffa, 2002; Foulquié-Moreno *et al.*, 2006). Neste estudo, 90,0% das amostras alimentares analisadas foram positivas para enterococos. Ao total foram isoladas 310 isolados caracterizadas como enterococos, com 6 espécies distintas, sendo 57,1% *E. faecalis*, 33,2% de *E. casseliflavus*, 5,5% de *E. hirae*, 1,9% de *E. faecium*, 1% de *E. durans* e 1,3% de *Enterococcus* spp., confirmadas apenas em nível de gênero. A presença destas espécies em alimentos está de acordo com dados da literatura.

No Brasil, a prevalência de *Enterococcus* em queijos foi demonstrada por Gomes *et al.* (2008) como sendo de 83,3%, com predominância de *E. faecium*. Fracalanza *et al.* (2007) após a análise de carne e leite pasteurizado no estado de Rio de Janeiro, demonstraram a incidência de *Enterococcus* de 56,8% em carnes e 43,2% no leite, e estabeleceram *E. faecalis* como predominante sob as demais espécies, seguido por *E. casseliflavus* (26,3%), no leite pasteurizado e *E. durans* (12,6%). Riboldi *et al.* (2009) e Frazzon *et al.* (2010) também isolaram enterococos de amostras de alimentos (carne, queijo e vegetais) da cidade de Porto Alegre. Riboldi *et al.* (2009) isolou 56 cepas de *Enterococcus* sp., sendo 48,2% *E. faecalis*, 41,07% *E. faecium* e 1,07% *Enterococcus* sp., e Frazzon *et al.* (2010) obtiveram

112 isolados, onde 72,3% eram *E. faecalis*, 16,07% *E. faecium*, 6,25% *E. gallinarum*, 2,67% *E. casseliflavus*, 1,78% *Enterococcus* sp. e 0,89% *E. hirae*.

A espécie mais frequente nas amostras alimentares foi *E. faecalis*, detectada em quase todos alimentos, com exceção da beterraba e predominante nas amostras de frango e queijo colonial. A presença desta espécie nas amostras de alimentos como frango, queijo colonial e ricota podem ser justificada pelo fato de que são alimentos muito manipulados, sugerindo uma contaminação durante o processo de fabricação. A ocorrência de isolados de *E. faecalis* em carne de frango foi relatada por vários autores (Chajęcka-Wierzchowska *et al.*, 2016; Kin *et al.*, 2017; Tyson *et al.*, 2017). Os enterococos são frequentemente isolados de carne de gado, aves e carcaças de frango procedentes de abatedouros (Campos *et al.*, 2013; Kin *et al.*, 2017). Quando presentes nos alimentos crus, esses micro-organismos são capazes de sobreviver a alguns processos como, por exemplo, a pasteurização, a fermentação e se multiplicar sob refrigeração (Giraffa *et al.*, 2002). Entretanto, a contaminação pelos enterococos ocorre não apenas em produtos cárneos crus, sendo frequentemente encontrados também em produtos cárneos processados, pois suas características de robustez, eles são capazes de permanecer como contaminantes até o produto final (Jahan *et al.*, 2015; Chajęcka-Wierzchowska *et al.*, 2016; Chotinantakul *et al.*, 2018).

A prevalência de enterococos no leite e queijo pode ser considerada resultado de condições precárias de higiene durante a produção e o processamento do leite, assim como contaminação direta pelo animal e pelos manipuladores. Sua presença também pode ser associada indiretamente a fontes de água contaminadas, as carcaças dos animais, ao equipamento de processamento do leite e aos tanques de armazenagem. Entretanto, atualmente estes micro-organismos podem ser considerados como componentes normais da microbiota de alimentos lácteos e não só um indicador de pouca higiene (Giraffa, 2002; Foulquie-Moreno *et al.* 2006; Gomes *et al.*, 2008).

A espécie *E. casseliflavus* ocorreu com grande frequência nos vegetais, foram encontrados em maiores porcentagens nas amostras de beterraba (100%), salsa (64,7%) e batata-doce (58,3%). A presença de enterococos em vegetais é geralmente resultado de contaminação fecal através da água de irrigação ou do solo. Estudos têm mostrado que os *Enterococcus* spp encontram seu caminho para o ambiente através de fezes humanas e animais e, devido à sua adaptabilidade,

colonizam-no facilmente. Assim, sua ocorrência comum é no solo, na água, no esgoto e nas plantas, de onde chegam as matérias-primas de origem animal (Giraffa, 2002). Entretanto, dados da literatura sobre o isolamento e caracterização de enterococos de tais produtos são escassos. As demais espécies foram isoladas principalmente das amostras de ricota, sendo 33,3% dos isolados *E. hirae*, 8,3% *E. durans* e 11,1% *E. faecium*.

6.2 Perfis de Resistência aos Antimicrobianos e Genes de Resistência

A resistência a antibióticos é uma ameaça crescente à saúde pública em todo o mundo. Portanto, esforços urgentes e multifacetados são necessários para reduzir a seleção de cepas resistentes tanto no ambiente clínico humano, quanto na produção de alimentos.

O número de bactérias resistentes a antibióticos encontrados no meio ambiente vem crescendo nos últimos anos. A presença de enterococos resistentes aos antibióticos nos alimentos, pode atuar como um reservatório de cepas resistentes, criando uma rota potencial de transferência horizontal de genes (Girafa, 2002; Frazzon *et al.*, 2010; Chajicka-Wierzchowska *et al.*, 2016). Enterococos multirresistentes são um grande problema e estão sendo cada vez mais relatados em todo o mundo. O surgimento e disseminação da resistência a antibióticos em bactérias é considerado um grande problema de saúde pública (Kin *et al.*, 2017). Segundo Molton *et al.* (2013), uma das principais causas de aumento da resistência em bactérias é o intenso e indevido uso de antibióticos na pecuária.

Além do tratamento da infecção humana, agentes antimicrobianos são usados na conservação de alimentos, para tratar e promover o crescimento de animais, na produção de plantas, e para outros fins não relacionados à saúde (Lebreton, 2014) Os enterococos resistentes a antibióticos ocorrem em produtos cárneos, lácteos e até mesmo em cepas usadas como probióticos (Giraffa, 2002). Ronconi *et al.* (2002) avaliaram a presença de enterococos altamente resistentes a aminoglicosídeos e glicopeptídeos em alimentos crus.

Neste estudo, relatou-se que 89,35% das cepas apresentaram resistência à pelo menos um dos fármacos estudados. Todas as cepas investigadas foram susceptíveis à vancomicina. Todos os alimentos avaliados neste estudo

apresentaram elevada frequência de cepas resistentes, principalmente à eritromicina (47,74%) e à rifampicina (74,8%).

Embora a rifampicina não seja utilizada para tratar infecções enterocócicas, essas bactérias normalmente são resistentes a esse antimicrobiano. Kim *et al.* (2017) demonstraram a presença de cepas resistentes em isolados de carcaça de frango; Enne *et al.* (2004) isolaram cepas resistentes de amostras fecais de porcos; Valenzuela (2009) em amostras de alimentos de origem animal, como queijo e leite; Schwaiger *et al.* (2011) com isolados de origem vegetal; e Bessa *et al.* (2014) em amostras de água proveniente de rios. A rifampicina é um fármaco presente na maioria das combinações escolhidas para o tratamento da tuberculose humana causada por *Mycobacterium tuberculosis*. A resistência à rifampicina surge a partir de mutações no gene *rpoB*, que já foi identificada em diversas espécies de bactérias, enquanto a inativação enzimática também foi observada em alguns estudos. A presença de cepas resistentes à rifampicina entre enterococos isolados de alimentos reflete a consequência de enterococos comensais sendo expostos a este antimicrobiano (Kristich *et al.*, 2014).

Dentre os isolados que apresentaram perfil de resistência à eritromicina, a espécie mais frequente foi *E. faecalis* (n=97), seguido por *E. casseliflavus* (n=39), *E. faecium* (n=5), *E. hirae* (n=5) e *E. durans* (n=2). Os micro-organismos do gênero *Enterococcus* apresentam resistência adquirida a este antimicrobiano. A eritromicina é um antibiótico utilizado no tratamento clínico de infecções causadas por enterococos (Garrido *et al.* 2014). Seu uso disseminado, tanto no ambiente clínico, quanto em animais para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-positivas, levou ao aumento do número de enterococos resistentes a esses antimicrobianos (Jaglic *et al.*, 2011). Os genes *ermB* e *mrsC*, que conferem resistência à eritromicina, foram positivos em 42,56% e 4,72% dos enterococos resistentes analisados, respectivamente. Já os genes *ermA* e *ermC* não ocorreram nas cepas resistentes analisadas. Entre os genes *erm*, o *ermB* é frequentemente encontrado no genoma de enterococos (Jensen *et al.*, 1998). A presença dos genes *erm* em cepas de *Enterococcus* isoladas de alimentos já foi relatada por Guerreiro-Ramos *et al.* (2016), que detectaram resistência à eritromicina em enterococos isolados de carnes de caça, e relataram a presença dos genes *ermB* e *ermC*, Chajacka-Wierzchowska *et al.* (2016) relataram a presenças de *ermB* (33,8%), *ermA* (18,9%), *ermC* (3,3%) e *mrsC* (1%) em enterococos isolados de alimentos. Zou *et al.*

(2011) efetuaram uma pesquisa em *E. faecalis* isolados de suínos na China e observaram que 54 cepas apresentaram o gene *ermB* e 37 o gene *ermA*. Diversos estudos relatam a presença dos genes *ermB* e *msrC* em *E. faecalis* de isolados clínicos (Emanini *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016), também detectaram os genes *ermB* ou *msrC* em enterococos isolados de animais selvagens (Santestevan, 2014; Pereira, 2016).

A resistência à tetraciclina foi observada em 97 (31,29%) das cepas isoladas dos alimentos, destas 34 foram das amostras de vegetais (AP, BD, BT, CV e SA), 24 da carne de frango crua e 39 dos queijos (QJ e RT). Esse grupo de antibióticos é muito empregado na agricultura e piscicultura, principalmente como promotor de crescimentos em países europeus (HUYS *et al.*, 2003). Observou-se que o maior número de cepas positivas para os genes de resistência foi isolado das amostras de frango, que podemos atribuir ao fato de que antibióticos são usados como promotores de crescimento na ração animal ou até mesmo no tratamento de doenças destes animais.

Em relação à presença dos genes de resistência à tetraciclina, 78,35% das cepas resistentes à tetraciclina no antibiograma apresentaram o gene *tetM* (n=76) e 23,7% o gene *tetL* (n=23). A resistência à tetraciclinas nas cepas de *E. faecalis* foram codificadas pelo gene *tetM* (n=38), ou pelo gene *tetL* (n=3), ou pela combinação dos genes *tetM* + *tetL* (n=20). Já nas cepas de *E. casseliflavus* (n=10), *E. hirae* (n=5) e *Enterococcus* spp. (n=2) a resistência à tetraciclina foi codificada a pelo gene *tetM*. O gene mais frequente em enterococos com resistência à tetraciclina é o gene *tetM*, normalmente está localizado no cromossomo bacteriano, podendo ser carregado por transposons conjugativos. Já o gene *tetL* é cromossomal ou plasmidial (pAM α 1), articula efluxo ativo de tetraciclina a partir de células (Cauwerts *et al.*, 2007; Choi & Woo, 2015). A associação do gene *tetM* com elementos conjugativos é um fator importante para a disseminação da resistência à tetraciclina em enterococos, o que apoia a perspectiva de que espécies de *Enterococcus* são fontes de genes resistentes a antibióticos pela transferência horizontal de genes em bactérias potencialmente patogênicas cadeia alimentar (Rizzotti *et al.* 2009; Frazzon *et al.* 2010).

Chotinantakul *et al.* (2018) avaliaram a prevalência de fenótipos e genes de resistência a antimicrobianos de *Enterococcus* spp. isolados de carne de porco

fermentada tradicional tailandesa, e detectaram que o gene *tetL* (43,8%) foi mais prevalente do que o gene *tetM* (31,3%). Guerrero-Ramos *et al.* (2016) observaram em isolados de *E. faecium* e *E. faecalis* resistentes à tetraciclina, uma prevalência de 62,2% de gene *tetM*, 13,5% de *tetL* e 21,6% da combinação desses dois genes. Frazzon *et al.* (2010) relatou a presença do gene *tetM* em 38% dos isolados, *tetL* em 9% e, em 13% isolados abrigam os genes *tetM* e *tetL*, em cepas de *Enterococcus* spp. isolados de alimentos no sul do Brasil.

Nossos resultados revelaram que apenas 9,35% dos isolados de enterococos de alimentos testados apresentaram resistência à nitrofurantoína. Destes, 17 isolados foram identificadas como *E. casseliflavus* (5,5%) procedentes das amostras de aipim, batata-doce e salsa, 9 isolados como *E. faecalis* (2,9%) das amostras de bata-doce, cenoura e carne de frango, dois isolados sendo *E. durans* (0,65%) da ricota e *Enterococcus* spp. (n=1) da batata-doce. A nitrofurantoína é um antibiótico que vem sendo usado a muito tempo na medicina veterinária e humana por apresentarem amplo espectro de ação e baixa capacidade de seleção de bactérias resistentes. A aquisição de resistência a nitrofunatoínas é bastante incomum, isso se deve ao seu complexo mecanismo de ação, que inibe sistemas enzimáticos bacterianos, como a acetilcoenzima A, ou pela interrupção da síntese da parede celular (Meena *et al.*, 2017).

Neste estudo os resultados obtidos em relação ao cloranfenicol apontaram uma taxa de 2,6% de resistência envolvendo *E. faecalis* e *E. casseliflavus* provenientes de aipim (n=1), beterraba (n=1), couve (n=4) e queijo colonial (n=1). Há poucos relatos sobre a ocorrência de resistência ao cloranfenicol entre enterococos isolados de animais que pode estar relacionado à restrição de uso do cloranfenicol, que foi banido na produção de alimentos de origem animal por mais de 30 anos e é utilizado com cautela na medicina humana (Lebreton *et al.*, 2014). Entretanto nossos dados discordam de outros que observaram percentuais de resistência ao cloranfenicol bem mais elevados entre enterococos isolados a partir de alimentos (Franz *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2012; Chotinantakul *et al.*, 2018).

A resistência à linezolida foi observada em 13,87% dos isolados, envolvendo quatro espécies de enterococos, *E. casseliflavus* (n=9), *E. faecalis* (n=28), *E. durans* (n=1) e *E. hirae* (n=5). Kim *et al.* (2017) observaram resistência à linezolida em 15,3% dos isolados das amostras de carcaça de frango. A linezolida é um agente bacteriostático com ampla atividade contra bactérias Gram-positivas. Ela

atua no ribossomo ao se ligar a um sítio ativo conservado em 23S rRNA da subunidade 50S do ribossomo inibindo assim o alongamento da cadeia polipeptídica (Prieto *et al.* 2016).

A resistência aos antimicrobianos ciprofloxacina e norfloxacina, se dá pela substituição de um aminoácido na girase e/ou na topoisomerase IV, comprometendo a afinidade do antibiótico com a molécula alvo (Lebreton *et al.*, 2014; Miller *et al.*, 2015). Foi encontrado perfil de resistência a ciprofloxacina e norfloxacina em 78 isolados de amostras de alimentos, porém apenas 10 (12,82%) apresentaram resultado positivo quando testados para o gene *gyrA*, que está relacionado a mutação na girase. A utilização destes antibióticos no tratamento de infecções no trato urinário em humanos causou um aumento de uma moderada resistência para enterococos (Garrido *et al.*, 2014; Miller *et al.*, 2015). No estudo de Prichula *et al.* (2016), os enterococos isolados de espécies marinhas silvestres possuem maior frequência de resistência à rifampicina (59,68%), seguidos por eritromicina (32,25%), ciprofloxacina (20,96%), tetraciclina (14,51%) e norfloxacina (12,90%). Os percentuais de resistência a ciprofloxacina e norfloxacina foram similares aos encontrados no presente estudo.

Em relação aos aminoglicosídeos, os percentuais de resistência para a gentamicina foram significativamente mais baixos (3,5%) do que com relação aos resultados obtidos com a estreptomicina (12,58%), totalizando em 16% das cepas resistentes a aminoglicosídeos. As amostras que apresentaram resistência à gentamicina foram identificadas como *E. faecalis* (n=10) e *E. casseliflavus* (n=1), isoladas de carne de frango e aipim, respectivamente. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Poeta *et al.* (2006) e Guerrero-Ramos *et al.* (2016), que obtiveram percentuais baixos de enterococos resistentes a gentamicina (1 a 9%), e mais frequentemente associados a *E. faecalis*.

Dentre as cepas consideradas resistentes à gentamicina, 90,9% apresentaram o gene *aac*-(6')-Ie-aph(2'')-Ia. Os enterococos demonstram tolerância intrínseca aos aminoglicosídeos, a qual pode ser mediada por dois fatores: má captação do antibiótico, o que requer altas concentrações para promover a entrada no espaço intracelular, e diminuição da ligação ao alvo ribossomal (Miller *et al.*, 2014). O alto nível de resistência de gentamicina em enterococos é reportado como sendo predominantemente mediado pelo gene *aac*(6')-Ie-aph(2'')-Ia, que codifica um aminoglicosídeo bifuncional que modifica essa enzima (Boehr *et al.*, 2001). Com o

aumento do uso de antibióticos em animais de fazendo e na agricultura, a disseminação desses genes de resistência tem sido evidente em produtos alimentícios (Jaimee e Halami, 2017).

Comparando com os perfis de resistência encontrados em 2006, observou-se que houve diminuição na porcentagem de cepas resistentes à ampicilima, ciprofloxacina, clorofenicol, gentamicina e vancomicina, presente nas amostras de alimentos. Isso pode ser justificado, com implantação da RDC 20/2011 onde restringe o uso de antimicrobianos, podendo apenas ser adquirido sob prescrição médica. O uso inadequado de antibióticos, de uso humano ou veterinário, acelera o processo de desenvolvimento de mecanismos de resistência pelas bactérias, por isso é importante o seu uso racional.

7. CONCLUSÃO

A ocorrência de bactérias do gênero *Enterococcus* foi verificada em quantidades relevantes em quase todos os alimentos analisados neste estudo. Foi possível detectar 6 espécies diferentes, sendo: *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae* e *Enterococcus* spp. Tal ocorrência pode servir como indicativo de uma higienização ineficiente nesses alimentos, o que pode vir a comprometer a qualidade desses produtos e a disseminação destes microorganismos para os consumidores.

Dentre os enterococos isolados a partir dos alimentos analisados, 89,35% apresentaram perfis de resistência à pelo menos um dos fármacos testados e, foi confirmada a presença de 6 genes de resistência para os isolados que apresentaram este perfil fenotipicamente. Tais padrões de resistência são de extrema relevância, visto que estes microrganismos, uma vez ingeridos, possuem a capacidade tanto de permanecerem no trato gastrointestinal, como de trocar informações genéticas com outros representantes do gênero, podendo desta forma colonizar o consumidor e, por conseguinte, disseminar o perfil resistente.

Comparando os dados do presente estudo com os obtidos em 2006, pode-se observar que houve um aumento significativo na presença e na diversidade dos enterococos isolados. Esse aumento pode ser justificado pelo aperfeiçoamento das técnicas de isolamento e identificação das bactérias. Entretanto, *E. faecalis* foi a espécie mais prevalente nas amostras analisadas tanto em 2006 como em 2016.

Em relação aos perfis de resistência encontrados em 2006 e 2016, verificouse que os enterococos resistentes isolados em 2016 apresentaram uma diminuição na porcentagem de cepas resistentes à ampicilima, ciprofloxacina, clorofenicol, gentamicina e vancomicina. Podendo se concluir que a população tem se conscientizado da importância da correta administração de antimicrobianos. Pois o uso inadequado de antibióticos, tanto de uso humano ou veterinário, acelera o processo de desenvolvimento de mecanismos de resistência pelas bactérias, sendo de grande importância o seu uso racional.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

Abriouel H, Omar NB, Molinos AC, López RL, Grande MJ, Viedma PM, Ortega E, Cañamero MM, Galvez A. 2008. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. *International Journal of Food Microbiology*. 123:38-49.

Arias CA, Murray BE. 2012. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nature Reviews Microbiology*. 10(4):266-278.

Bell JM, Paton JC, Turnidge J. 1998. Emergence of Vancomycin-resistant enterococci in Australia: Phenotypic and genotypic characteristics of isolates. *J Clin Microbiol*. 36:2187-2190.

Bessa L, Barbosa-Vasconcelos A, Mendes A, Vaz-Pires P, Costa PM. 2014. High prevalence of multidrug-resistant *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. in river water, upstream and downstream of wastewater treatment plant. *Journal of Water Health*. 12:426-435.

Boehr DD, Lane WS, Wright GD. 2001. Active site labeling of the gentamicin resistance enzyme AAC(6P)-APH(2Q) by the lipid kinase inhibitor wortmannin. *Chemistry & Biology*. 8:791-800.

Butt T, Leghari MJ, Mahmood A. 2004. In-vitro activity of nitrofurantoin in enterococcus urinary tract infection. *Journal-Pakistan Medical Association*. 54:466-468.

Cauwerts K, Decostere A, Graef EM, Haesebrouck F, Pasmans F. 2007. High prevalence of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from broilers carrying the *erm(B)* gene. *Avian Pathol*. 36:395-399.

Choi JM, Woo, GJ. 2015. Transfer of Tetracycline Resistance Genes with Aggregation Substance in Food-Borne *Enterococcus faecalis*. *Curr Microbiol*, 70:476–484.

Chopra I, Roberts M. 2001. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 65(2):232–260.

Chotinantakula K, Chansiwa N, Okadab S. 2017. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolated from Thai fermented pork in Chiang Rai Province, Thailand. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 12:143–148.

Clinical and Laboratory Standards Institute - (CLSI). 2015. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Twenty-Fifth Informational Supplement (M100-S25)**. Clinicaland Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Clinical and Laboratory Standards Institute - (CLSI). 2017. **M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**: 27th informational supplement M100.

Connell SR, Tracz DM, Nierhaus KH, Taylor DE. 2003. Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47(12):3675-3681.

Courvalin P. 2006. Vancomycin Resistance in Gram-Positive Cocci. *Clinical Infectious Disease*. 42:S25-S34.

Creti R, Imperi M, Bertuccini L, Fabretti F, Orefici G, Rosa RD, Baldassarri L. 2004. Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. *Journal of Medical Microbiology*. 53:13-20.

Devriese LA, Pot B, Collins MD. 1993. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *Journal of Applied Bacteriology*. 75(5):399-408.

Diarra MS, Rempel H, Champagne J, Masson, L, Pritchard J, Topp E. 2010. Distribution of Antimicrobial Resistance and Virulence Genes in *Enterococcus* spp. and Characterization of Isolates from Broiler Chickens. *Applied and Environmental Microbiology*. 76(24):8033–8043.

Eaton TJ, Gasson MJ. 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(4):1628-1635.

Edwards, DD. 2000. Enterococci attract attention of concerned microbiologists. *ASM News*. 66:540-545.

Emanieni M, Khoramian B, Jabalameli F, Beigverdi R, Asadollahi K, Taherikalani M, Lari AR. 2016. Prevalence of high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in an Iranian hospital. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*. 57:E197-E200.

Enne VI, Delsol AA, Roe JM, Bennett PM. 2004. Rifampicin resistance and its fitness cost in *Enterococcus faecium*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 53:203-207.

Fisher K, Phillips C. 2009. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*. 155:1749-1757.

Foulquié-Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De-Vuyst L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*. 106:1–24.

Fracalanza SAP, Scheideggerl EMD, Santos PF, Leite PC, Teixeiral LM. 2007. Antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from poultry meat and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(7):853-859.

Franz CMAP, Holzapfel WH, Stiles ME. 1999. Enterococci at the crossroads of food safety? *International Journal Food Microbiology*, 47:1–24.

Franz CMAP, Muscholl-Silberhorn AB, Yousif NMK, Vancanneyt M, Swings J, Holzapfel WH. 2001. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl. Environ. Microbiology*. 67:4385–4389.

Franz CMAP, Stiles ME, Schleifer KH, Holzapfel WH. 2003. Enterococci in foods – a conundrum for food safety. In: *International Journal of Microbiology*. 88:105-122.

Frazzon APG, Gama BA, Hermes V, Bierhals CG, Pereira RI, Guedes AG, d’Azevedo PA, Frazzon, J. 2010. Prevalence of antimicrobial resistance and molecular characterization of tetracycline resistance mediated by *tet(M)* and *tet(L)* genes in *Enterococcus* spp. isolated from food in Southern Brazil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 26:365-370.

Freitas, S. **Proposta de metodologia de projeto de sistemas de disposição oceânica de esgotos sanitários, em localidades de pequeno porte**. 2010. 91 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010

Fung HB, Kirschenbaum HL, Ojofeitimi BO. 2001. Linezolid: an oxazolidinone antimicrobial agent. *Clinical therapeutics*. 23(3):356-391.

Garrido AM, Gálvez A, Pulido RP. 2014. Antimicrobial Resistance in Enterococci. *Journal of Infections Diseases & Therapy*. 2(4):1-7.

Gilmore MS, Coburn PS, Nallapareddy SR, Murray B. 2002. **The Enterococci Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance**. ASM Press, Washington, DC. 439 p.

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

Giraffa, G. 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *Int J Food Microbiology*. 88:215–222.

Gomes BC, Esteves CT, Palazzo ICV, Darini ALC, Felis GE, Sechi LA, Franco BDGM, Martinis ECP. 2008. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. *Food Microbiology*. 25:668-675.

Guerrero-Ramos E, Cordero J, Molina-González D, Poeta P, Igrejas G, Alonso-Calleja C, Capita R. 2016. Antimicrobial resistance and virulence genes in enterococci from wild game meat in Spain. *Food Microbiol*. 53:156-64.

Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger V, Huis J. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol*. 41:84–101.

Hörner R, Liscano MGH, Maraschin MM, Salla A, Meneghetti B, Forno NLF, Rigui RA. 2005. Susceptibilidade antimicrobiana entre amostras de *Enterococcus* no

Hospital Universitário de Santa Maria. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 41(6):391-395.

Huys G, Pearson M, Kampfer P, Denys R, Cnockaert M, Inglis V, Swings J. (2003). *Aeromonas hydrophila* subsp. *ranae* subsp. nov., isolated from septicemic farmed frogs in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53:885-891.

Huys G, D'haene K, Collard J-M, Swings J. 2004. Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from food. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(3):1555-1562.

Iversen A, Kühn I, Franklin A, Mølby R. 2000. High prevalence of vancomycin resistant enterococci in Swedish sewage. *J. Clin. Microbiology*. 68:2838–2842.

Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Barrett JB. 2004. Use of a Genus - and Species Specific Multiplex PCR for Identification of Enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*. 42(8):3558-3565.

Jaglic Z, Vlkova H, Bardon J, Michu E, Cervinkova D, Babak V. (2012). Distribution, characterization and genetic bases of erythromycin resistance in staphylococci and enterococci originating from livestock. *Zoonoses Public Health*. 59:202–211.

Jahan M, Zhanel GG, Sparling R, Holley RA. 2015. Horizontal transfer of antibiotic resistance from *Enterococcus faecium* of fermented meat origin to clinical isolates of *E. faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Int J Food Microbiol*. 199:78–85.

Jahan N, Islam A, Alam F, Gan SH, Khalil I. 2015. Prolonged Heating Of Honey Increases Its Antioxidant Potential But Decreases Its Antimicrobial Activity. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 12(4):134-144.

Jaimee G, Halami Pm. 2017. Conjugal Transfer of *aac(6')Ie-aph(2'')Ia* Gene from Native Species and Mechanism of Regulation and Cross Resistance in *Enterococcus faecalis* MCC3063 by Real Time-PCR. *Microb Pathog*. 110:546-553.

Jensen LB, Frimodt-Müller N, Aarestrup FM. 1999. Presence of erm gene classes in Gram-positive bacteria of animal and human origin in Denmark. *FEMS Microbiology Letters*. 170(1):151-158.

Jia W, Li G, Wang W. 2014. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Enterococcus* Species: A Hospital-Based Study in China. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 11:3424-3442.

Jiménez E, Ladero V, Chico I, Maldonado-Barragán A, López M, Martín V, Fernández L, Fernández M, Álvarez MA, Torres C, Rodríguez JM. 2013. Antibiotic resistance, virulence determinants and production of biogenic amines among enterococci from ovine, feline, canine, porcine and human milk. *BioMed C. Microbiology*. 13(288):1-12.

Johnston LM; Jaykus LA. 2004. Antimicrobial Resistance of *Enterococcus* Species Isolated from Produce. *Appl Environ Microbiol.* 70(5):3133-3137.

Jorgensen JH, Turnidge JD, Washington JA. Antimicrobial susceptibility testing: dilution and disk diffusion. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenoer FC, Tenover RH. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington: American Society for Microbiology. 2005. cap. 118.

Kak V, Chow JW. Acquired antibiotic resistances in enterococci. In: Gilmore MS, Clewell DB, Courvalin P, Dunny GM, Murray BE, Rice LB. *The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*. Washington, ASM. 2002.

Kim YJ, Park JH, Seo KH. 2017. Comparison of the loads and antibiotic-resistance profiles of *Enterococcus* species from conventional and organic chicken carcasses in South Korea. *Poultry Science.* 97(1):271–278.

Konemann EW, Allen, SD, Janda WD, Schreckenberger PC, Winn WC. *Diagnóstico microbiológico*. 5 ed. Rio de Janeiro, MEDSI, 2001.

Kristich CJ, Rice LB, Arias CA. 2014. **Enterococcal Infection – Treatment and Antibiotic Resistance**. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary. 674 p.

Kristich CJ, Rice LB, Arias CA. Enterococcal infection— treatment and antibiotic resistance. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y. (ed). *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014.

Leavis HL, Willems RJL, Top J, Bonten MJM. 2006. High-Level Ciprofloxacin Resistance from Point Mutations in *gyrA* and *parC* Confined to Global Hospital Adapted Clonal Lineage CC17 of *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology.* 44(3):1059-1064.

Lebreton F, Willems RJL, Gilmore MS. 2014. *Enterococcus* Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190427/>>. Acesso em: 12 mar 2018.

Lehner A, Loy A, Behr T, Gaenge H, Ludwig W, Wagner M, Schleifer M. 2005. Oligonucleotide Microarray for Identification of *Enterococcus* Species. *FEMS Microbiology Letters.* 246:133–142.

Ligozzi M, Pittaluga F, Fontana R. 1996. Modification of penicillin-binding protein 5 associated with high-level ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 40(2):354-357.

Liu X, Resch J, Rush T, Lobner D. 2012. Functional upregulation of system xc⁻ by fibroblast growth factor-2. *Neuropharmacology.* 62(2):901–906.

Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. 2012. Multidrug-

resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin microbiol infect.* 18(3):268-81.

Meena S, Mohapatra S, Sood S, Dhawan B, Das BK, Kapil A. 2017. Revisiting Nitrofurantoin for Vancomycin Resistant Enterococci. *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* 11(6):DC19-DC22.

Miller WR, Munita JM, Arias CA. 2015. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 12(10):1221–1236.

Molton JS, Tambyah PA, Ang BSP, Ling ML, Fisher DA. 2013. The global spread of healthcare-associated multidrug-resistant bacteria: a perspective from Asia. *Clinical Infectious Diseases.* 56(9):1310–1318.

Moura TM, Campos FS, Caierão J, Franco AC, Roehe PM, d’Azevedo PV, Frazzon J, Frazzon APG. 2015. Influence of a subinhibitory concentration of vancomycin on the in vitro expression of virulence-related genes in the vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 48(5):617-621.

Munita JM, Arias CA. 2016. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum.* 4(2). Murray, BE. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 3(1):46-65.

Murray BE. 1998. Diversity among Multidrug-Resistant Enterococci. *Emerging Infectious Diseases.* 4(1):37-47.

Ness IF, Dzung BD, Yasuyoshi I. 2014. Enterococcal Bacteriocins and Antimicrobial Proteins that Contribute to Niche Control. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190428/>>. Acesso em: 30 jul. 2016.

Ogier JC, Serror P. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: *Enterococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology.* 136:291-301.

Ono S, Muratani T, Matsumoto T. 2005. Mechanisms of resistance to imipenem and ampicillin in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* 49(7):2954-2958.

Parte, AC. LPSN — list of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic acids research,* 42(D1):D613-D616. 2013.

Pereira RI. 2016. **Diversidade genética e fatores de virulência de *Enterococcus* spp. isolados de amostras fecais de tartarugas marinhas recuperadas no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul.

Pieniz S, Moura TM, Cassenego APV, Andrezza R, Frazzon APG, Camargo FAO, Brandelli A. 2015. Evaluation of resistance genes and virulence factors in a food isolated *Enterococcus durans* with potential probiotic effect. *Food Control*. 51:49-54.

Poeta P, Costa D, Rodrigues J, Torres C. 2006. Antimicrobial resistance and the mechanisms implicate in faecal enterococci from healthy humans, poultry and pets in Portugal. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 27:131–137.

Prichula J, Pereira RI, Wachholz GR, Cardoso LA, Tolfo NCC, Santestevan NA, Medeiros AW, Tavares M, Frazzon J, D'Azevedo PA, Frazzon APG. 2016. Resistance to antimicrobial agents among enterococci isolated from fecal samples of wild marine species in the southern coast of Brazil. *Marine Pollution Bulletin*. 105(1):51-57.

Prieto AMG, Schaik WV, Rogers MR, Coque TM, Baquero F, Corander J, Willems RJ. 2016. Global Emergence and Dissemination of Enterococci as Nosocomial Pathogens: Attack of the Clones? *Front Microbiol*. 7(788):1-15.

Prystowsky J, Siddiqui F, Chosay J, Shinabarger DL, Millichap J, Peterson LR, Noskin GA. 2001. Resistance to linezolid: characterization of mutations in rRNA and comparison of their occurrences in vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(7):2154-2156.

Raj H, Wiebe WJ, Liston J. 1961. Detection and enumeration of fecal indicator organisms in frozen sea foods. *Enterococci*. *Appl Microbiology*. 9:295–303.

Riboldi GP, Frazzon J, D'Azevedo PA, Frazzon APG. 2009. Antimicrobial resistance profile of *Enterococcus* spp. isolated food in Southern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 40:125-128.

Rizzotti L, Gioia F, Dellaglio F, Torriani S. 2009. Molecular diversity and transferability of the tetracycline resistance gene *tet(M)*, carried on Tn916-1545 family transposons, in enterococci from a total food chain. *Antonie van Leeuwenhoek*. 96:43–52.

Santestevan NA, Zvoboda DA, Prichula J, Pereira RI, Wachholz GR, Cardoso LA, Moura TM, Medeiros AW, Amorin DB, Tavares M, D'Azevedo PA, Franco AC, Frazzon J, Frazzon APG. 2015. Antimicrobial resistance and virulence factor gene profiles of *Enterococcus* spp. isolates from wild *Arctocephalus australis* (South America fur seal) and *Arctocephalus tropicalis* (Subantartic fur seal). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 31(12):1935-1946.

Schwaiger K, Helmke L, Holzel CS, Bauer J. 2011. Antibiotic resistance in bacteria isolated from vegetables with regards to the marketing stage (farm vs. supermarket). *International Journal in Food Microbiology*. 148:191-196.

Shepard BD, Gilmore MS. 2002. Differential Expression of Virulence-Related Genes in *Enterococcus faecalis* in Response to Biological Cues in Serum and Urine. *Infection and Immunity*. 70(8):4344-4352.

Soares-Santos V, Barreto AS, Semedo-Lemsaddek T. 2015. Characterization of Enterococci from Food and Food-Related Settings. *J Food Prot.* 78(7):1320-6.

Sorensen TL, Blom M, Monnet DL, Frimodt-Moller N, Poulsen RL, Espersen F. 2001. Transient intestinal carriage after ingestion of antibiotic resistant *Enterococcus faecium* from chicken and pork. *N Engl J Med* 345:1161–1166.

Speer BS, Shoemaker NB, Salyers AA. 1992. Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clinical Microbiology Reviews.* 5(4):387-399.

Tavares W. *Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Anti-infecciosos.* 3 ed. São Paulo. Atheneu. 2002.

Teixeira LM, Carvalho MG, Shewmaker PL, Facklam RR. *Enterococcus*, In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Joergensen JH, Landry ML, Warnock DW. 2011. *Manual of Clinical Microbiology.* 10^o edição. 350-364.

Teixeira LM, Facklam RR. Special phenotypic methods for detecting antibacterial resistance, In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of Clinical Microbiology.* 8 ed. Washington, DC. ASM Press. 2004.

Tendolkar PM, Baghdayan AS, Gilmore MS, Shankar N. 2004. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infection Immunology.* 72:6032–6039.

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

Tyson GH, Nyirabahizi E, Creary E, Kabera C, Lam C, Rice-Trujillo C, McDermott PF, Tate H. 2017. Prevalence and Antimicrobial Resistance of Enterococci Isolated from Retail Meats in the United States, 2002 to 2014. *Appl Environ Microbiol.* 15(84):1-25.

Ulrich A, Müller T. 1998. Heterogeneity of plant associated streptococci as characterized by phenotypic and restriction analyses of PCR amplified 16S rRNA. *J. Applied Microbiology.* 84:293–303.

Valdes DL, Muguercia HL, Torres MIH, Arias ER, Marín RZ, Praderes LJ. 1998. Penicilinas. *Acta Medica.* 8(1):28-39.

Valenzuela AS, Omar NB, Abriouel H, López RL, Veljovic K, Cañamero MM, Topisirovc MKLT, Gálvez A. 2009. Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in enterococci from artisan foods of animal origin. *Food Control.* 20:381-385.

Wang Y, Zhang M, Deng F, Shen Z, Wu C, Zhang J, Zhang Q, Shen J. (2014). Emergence of multidrug-resistant *Campylobacter* species isolates with a horizontally acquired rRNA methylase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58 5405–5412.

Werner G, Coque TM, Franz CM, Grohmann E, Hegstad K, Jensen L, Schaik W, Weaver K. 2013. Antibiotic resistant enterococci - tales of a drug resistance gene trafficker. *International Journal of Medical Microbiology*. 303(6):360-379.

Werner G, Strommenger B, Witte W. 2008. Acquired vancomycin resistance in clinically relevant pathogens. *Future Microbiology*. 3(5):547-562.

Zou LK, Wang HN, Zeng B, Li JN, Li XT, Zhang AY, Zhou YS, Yang X, Xu CW, Xia QQ. 2011. Erythromycin resistance and virulence genes in *Enterococcus faecalis* from swine in China. *New Microbiologica*. 34:73-80.