



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS



**Graciela Fujimoto**

Graduada em Tecnologia em Industrialização de Alimentos

**ESTUDO DE FATORES DE VIRULÊNCIA E  
PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS DE CULTURAS  
DE *Enterococcus* spp ISOLADAS DE QUEIJO DE  
COALHO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

**Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye**

**Co-Orientadora: Dra. Maria de Fátima Borges**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

F955e Fujimoto, Graciela  
Estudo de fatores de virulência e propriedades tecnológicas de culturas de *Enterococcus* spp isoladas de queijo de coalho / Graciela Fujimoto. -- Campinas, SP: [s.n], 2011.

Orientador: Arnaldo Yoshiteru Kuaye  
Co-orientador: Maria de Fátima Borges  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Enterococcus*. 2. Gelatinase. 3. Hemolisina. 4. Bactéria produtoras de ácido láctico. I. Kuaye, Arnaldo. II. Borges, Maria de Fátima. III. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

cars/bibfea

Título em inglês: Virulence factors and technological properties of *Enterococcus* spp isolates from coalho cheese

Palavras-chave em inglês (Keywords): *Enterococcus*, Gelatinase, Hemolysin, Lactic acid Bacteria

Titulação: Mestre em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Arnaldo Yoshiteru Kuaye  
Maristela da Silva do Nascimento  
Márcio José da Silva

Programa de Pós Graduação: Programa em Tecnologia de Alimentos

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação defendida em  
\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ por Graciela Fujimoto aprovado pela comissão julgadora em  
\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

---

Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye  
(Orientador)

---

Dra Maristela da Silva do Nascimento  
(Membro)

---

Prof. Dr. Márcio José da Silva  
(Membro)

---

Prof. Dr. José Luiz Pereira  
(Membro)

---

Prof. Dra. Lucia Regina Durrant  
(Membro)



*Dedico este trabalho aos meus amigos e a toda a minha família:  
meus pais Bernadete e Roberto, e minhas irmãs, Ju e Angel, por  
todo apoio e ensinamentos que me incentivaram a amadurecer e  
a nunca desistir dos meus sonhos.*



## **Agradecimentos**

À minha mãe, Bernadete e ao meu pai Roberto, por todo carinho, conselhos, incentivo e por estarem presentes em todos os momentos importantes da minha vida.

Às minhas irmãs Ju e Angel, por estarem sempre presentes nos momentos que precisei.

Aos meus queridos e eternos mestres Célio e Marco, por acreditarem no meu potencial, pelos conselhos e por me incentivarem a seguir adiante.

Ao meu orientador, Arnaldo, pela orientação, paciência, incentivo e conselhos em momentos oportunos.

À minha co-orientadora, Fátima, pelo grande projeto e por todo o incentivo dado durante todo o desenvolvimento deste.

À Dirce pela disposição em ajudar, por todos os ensinamentos, conselhos e incentivo.

À Dra Juliane D. G. Carvalho e à Dra Celina M. Soares pelo apoio no desenvolvimento do projeto.

Ao prof. Dr. Márcio José da Silva, do CBMEG, pelo incentivo, apoio e ensinamentos no sequenciamento.

À Dani e Aline, também do CBMEG, pelo apoio no sequenciamento e ensinamentos.

À Dra Maristela S. Nascimento pelas correções e sugestões para o desenvolvimento do projeto.

Ao meu amigo Dãã, pela ajuda, conselhos e por ter me passado um pedacinho de todo o seu conhecimento, que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha amiga e “irmãzinha” postixa Fabíola, pela amizade, carinho, incentivo e por sempre me ouvir nos momentos que mais precisei.

Aos meus amigos de sempre Edivânia, Adriana e Thiago, pela imensa ajuda e grande incentivo.

Aos meus amigos que fiz em Campinas: Cecília, Diogo, Eto, Evandro, Karina, Karol e Simone, pela amizade, apoio e pelos momentos de alegria e descontração.

Às minhas companheiras de laboratório: Dona Denir, Meg, Marisa, Marcília, Isa, Aninha, Lu e Maria Amélia, pela amizade, apoio e conselhos.

Ao CNPQ pelo financiamento do projeto e bolsa concedida.





*“A arte de interrogar não é tão fácil como se pensa. É mais uma arte de mestres do que de discípulos; é preciso ter aprendido muitas coisas para saber perguntar o que não se sabe.”*

***Jean Jacques Rousseau***



## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS .....	xiii
LISTA DE TABELAS .....	xiv
RESUMO.....	xvii
SUMMARY .....	xix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS DA PESQUISA .....	4
2.1 Objetivo geral.....	4
2.2 Objetivos específicos.....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	5
3.1 Características do gênero <i>Enterococcus</i> .....	5
3.2 <i>Enterococcus</i> em alimentos.....	8
3.3 Propriedades tecnológicas dos <i>Enterococcus</i> .....	9
3.3.1 Culturas iniciadoras .....	9
3.3.2 Produção de bacteriocinas .....	10
3.4 Patogenicidade de <i>Enterococcus</i> .....	13
3.5 Resistência a antimicrobianos .....	16
3.6 <i>Enterococcus</i> em queijo de coalho .....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	21
4.1 Origem e manutenção dos micro-organismos .....	21
4.2 Identificação das espécies de <i>Enterococcus</i> pela técnica da PCR.....	22
4.2.1 Extração do DNA .....	22
4.2.2 Reação em cadeia da polimerase – PCR.....	22
4.3 Avaliação da resistência a antibióticos .....	23

4.4	Avaliação de fatores de virulência dos isolados de <i>Enterococcus</i> spp .....	24
4.4.1	Fatores fenotípicos de virulência .....	24
4.4.2	Fatores genotípicos de virulência .....	25
4.5	Avaliação de propriedades tecnológicas de culturas de <i>Enterococcus</i> .....	29
4.5.1	Seleção das culturas de <i>Enterococcus</i> .....	29
4.5.2	Atividade proteolítica .....	29
4.5.3	Atividade lipolítica .....	30
4.5.4	Perfil das culturas em leite tornassolado .....	30
4.5.5	Avaliação da produção de diacetil .....	31
4.6	Avaliação do espectro de atividade antimicrobiana de isolados não patogênicos.....	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	33
5.1	Identificação das espécies de <i>Enterococcus</i> spp .....	33
5.2	Avaliação da resistência a antibióticos .....	38
5.3	Fatores fenotípicos de virulência .....	43
5.4	Fatores genotípicos de virulência .....	46
5.5	Relação entre determinantes genotípicos e fenotípicos de virulência .....	55
5.6	Confirmação do gene <i>ge/E</i> por sequenciamento .....	60
5.7	Propriedades tecnológicas.....	67
5.8	Avaliação do espectro de atividade antimicrobiana de isolados não patogênicos.....	73
6	CONCLUSÕES.....	77
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	79
	APÊNDICES.....	88

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Matriz de similaridade demonstrando a relação filogenética das espécies de <i>Enterococcus</i> baseada na comparação de sequências do RNAr 16S. ....	6
<b>Figura 2</b> - Fluxograma de processamento artesanal de queijo de coalho .....	20
<b>Figura 3</b> - Foto do gel de agarose para a identificação das espécies por PCR....	34
<b>Figura 4</b> - Distribuição das espécies dos 150 isolados de <i>Enterococcus</i> das amostras de queijo de coalho.....	35
<b>Figura 5</b> - Perfil de resistência dos 129 isolados de enterococos avaliados pelo teste de disco-difusão.....	39
<b>Figura 6</b> - Perfil de expressão fenotípica das espécies de enterococos isoladas das amostras de queijos de coalho. ....	44
<b>Figura 7</b> – Foto da eletroforese do gel de agarose para a identificação dos genes de virulência por PCR.....	47
<b>Figura 8</b> – Foto da eletroforese do gel de agarose da multiplex PCR para a identificação dos genes <i>ge/E</i> e <i>cy/B</i> . ....	47
<b>Figura 9</b> – Foto da eletroforese do gel de agarose para identificação do gene <i>ge/E</i> por PCR.....	61
<b>Figura 10</b> – Perfil em leite tornassolado das culturas de <i>E. faecium</i> e <i>E. faecalis</i> após 14 dias de incubação a 35 °C. ....	69
<b>Figura 11</b> - Produção de diacetil pelos isolado de <i>E. faecium</i> e <i>E. faecalis</i> .....	69
<b>Figura 12</b> – Avaliação da inibição do crescimento das culturas <i>L. monocytogenes</i> E1-007 pelos sobrenadantes de <i>E. faecium</i> , através da formação de halos de inibição.....	73

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Principais fatores de virulência encontrados em alguns *Enterococcus* e possíveis associações com o estágio de virulência..... 14
- Tabela 2** - Aquisição de resistência a antibióticos por *Enterococcus*..... 17
- Tabela 3** - Identificação e origem dos enterococos isolados de queijos de coalho... 21
- Tabela 4** - *Primers* utilizados na identificação das espécies *E. faecium* e *E. faecalis*..... 23
- Tabela 5** - Padrões de interpretação dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento das culturas de *Enterococcus* isoladas de queijos de coalho..... 24
- Tabela 6** - Sequências dos *primers* e tamanho dos fragmentos dos genes de virulência avaliados por PCR ..... 27
- Tabela 7** - Reações ocasionadas por culturas lácteas em leite tornassolado..... 30
- Tabela 8** - Comparação da Identificação das espécies do gênero *Enterococcus* pelas análises de fermentação de carboidratos (API20) e amplificação de genes por PCR..... 37
- Tabela 9** - Perfil de isolados resistentes e intermediariamente resistentes nas amostras de queijos de coalho..... 40
- Tabela 10** - Relação dos perfis de expressão fenotípica dos isolados de cada amostra de queijo de coalho provenientes das regiões do Vale do Jaguaribe e Sertões Cearenses ..... 44
- Tabela 11** - Distribuição dos genes de virulência de *E. faecium*, *E. faecalis* e *Enterococcus* spp..... 50
- Tabela 12** - Distribuição dos perfis de múltiplos determinantes de virulência nos isolados de *E. faecium*, *E. faecalis* e *Enterococcus* spp..... 52

<b>Tabela 13</b> - Relação dos determinantes fenotípicos e genotípicos de enterococos .....	57
<b>Tabela 14</b> - Relação entre as sequências dos fragmentos dos isolados de enterococos e as culturas depositadas no <i>Genbank</i> . ....	64
<b>Tabela 15</b> - Mutações nas regiões conservadas das sequencias de enterococos. .....	65
<b>Tabela 16</b> - Perfil de propriedades tecnológicas dos isolados de <i>E. faecium</i> que produziram diacetil e /ou apresentaram atividade lipolítica. ....	70
<b>Tabela 17</b> - Distribuição da inibição do crescimento das culturas <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> e <i>B. cereus</i> pelos isolados de <i>E. faecium</i> . ....	74





## RESUMO

*Enterococcus* spp são bactérias conhecidas pela sua natureza ambígua, uma vez que podem promover características de interesse tecnológico em produtos fermentados, mas também, estão entre os principais patógenos nosocomiais. São bactérias onipresentes e sua prevalência ocorre principalmente em queijos de produção artesanal, como o queijo de coalho, produto bastante consumido na região nordeste do Brasil. Assim, o presente estudo objetivou: avaliar os principais determinantes fenotípicos ( $\beta$ -hemólise e gelatinase) e genotípicos (*ace*, *as*, *cyIA*, *cyIB*, *cyIM*, *efaA*, *esp*, *gelE* e *vanA*) de virulência; verificar a atuação do gênero como cultura iniciadora no queijo de coalho (produção de diacetil, proteólise, lipólise e perfil em leite tornassolado); avaliar a produção de atividade antimicrobiana por isolados sem potencial de patogenicidade. A avaliação de determinantes de virulência foi realizada com 150 *Enterococcus* spp isolados de 14 amostras de queijos de coalho provenientes de duas regiões de produção artesanal do estado do Ceará. Utilizando-se a técnica molecular da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), identificou-se a presença de 90% (135/150) de *E. faecium*, 2,7% (4/150) de *E. faecalis* e 7,3% (11/150) de *Enterococcus* spp. Entre os determinantes genotípicos avaliados por PCR, apenas o gene *as*, foi negativo para todos os 150 isolados. Todos os *E. faecalis* apresentaram pelo menos um determinante genotípico de virulência, com 25% (1/4) para *ace* e *gelE*, 50% (2/4) e 100% (4/4), para *efaA* e *esp*, respectivamente. Entre os *E. faecium* também se observou que 16,3% (22/135) foram positivos para os genes *efaA* e *esp*. A atividade  $\beta$ -hemolítica foi observada em 36,3% (49/135) dos *E. faecium* e 50,0% (2/4) dos *E. faecalis*, destes, apenas, 1 *E. faecium* apresentou todos os genes do *operon* da citolisina (*cyIA*, B, M). Outros 12 *E. faecium* apresentaram um ou dois genes *cyl*, mas não expressaram atividade  $\beta$ -hemolítica. A atividade da gelatinase foi observada para 2,9% (4/135) dos *E. faecium*, no entanto, o gene *gelE*, foi confirmado para apenas 2 desses *E. faecium*. O gene *gelE* foi confirmado por sequenciamento para 25% (1/4) dos *E. faecalis* e 20% (27/135) dos *E. faecium*

que não expressaram a atividade gelatinase. A resistência a antibióticos foi determinada para 129 enterococos. Para os isolados de *E. faecium* 17,5 % (20/114) foram resistentes a eritromicina, 10,5 % (12/114) a tetraciclina e 0,9 % (1/114) a teicoplanina e a vancomicina (que não apresentou o gene *vanA*). O gene *vanA* foi observado em 6 *E. faecium* que foram sensíveis a vancomicina. Para os isolados de *E. faecalis*, 75 % (3/4) foram resistentes a tetraciclina. O perfil de características tecnológicas de 43 *E. faecium* e 2 *E. faecalis*, demonstrou que tanto isolados que não apresentaram determinantes de virulência quanto os que apresentaram múltiplos determinantes de virulência, foram capazes de produzir ácido láctico, diacetil e atividade lipolítica. Apenas 1 isolado de *E. faecium* foi capaz de produzir atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes*. A presença de pelo menos um fator de virulência ou resistência a antibióticos foi observada em 82% dos enterococos, alertando sobre a necessidade de estudos cuidadosos quanto ao uso destes no processamento de alimentos.

Palavras-chave: *Enterococcus*, hemolisina, gelatinase, determinante genotípicos, bactérias ácido-lácticas

## SUMMARY

*Enterococcus* spp bacteria are known for their ambiguous nature, since they can promote features of technological interest in fermented products, but also are among the leading nosocomial pathogens. They are ubiquitous and their prevalence occurs mainly in artisanal cheeses production, like “Coalho” cheese, product pretty consumed in the northeastern region of Brazil. Thus, this stud aimed to evaluate the major phenotypic ( $\beta$ -hemolysin and gelatinase) and genotypic (*ace*, *as*, *cylA*, *cylB*, *cylM*, *efaA*, *esp*, *gelE* e *vanA*) virulence determinants; check the performance of the genre as starter culture in Coalho cheese (production of proteolysis, diacetyl, lipolysis and profile on Litmus Milk); evaluate the production of antimicrobial activity by isolated without potential for pathogenicity. The assessment of virulence determinants was made with 150 strains of enterococci obtained from 14 samples of Coalho cheese made by artisanal production from two different regions in the state of Ceara. Using molecular technique of PCR (Polymerase Chain Reaction), it was identified the presence of 90% (135/150) *E. faecium*, 2.7% (4/150) *E. faecalis* and 7.3% (11/150) *Enterococcus* spp. Among genotypic determinants evaluated by PCR only *as* gene was negative for all 150 isolates. All *E. faecalis* showed at least one genotypic virulence determinant, with 25% (1/4) to *ace* and *gelE*, 50% (2 / 4) and 100% (4/4), respectively for *efaA* and *esp*. Amongst *E. faecium* was also noted that 16.3% (22/135) were positive for *efaA* and *esp*. genes  $\beta$ -hemolytic activity was observed in 36.3% (49/135) of *E. faecium* and 50.0% (2/4) of *E. faecalis*, however only one *E. faecium* strains, showed all cytolysin genes (*cylA*, B, M). Another 12 *E. faecium* showed one or two *cyl* genes but haven't expressed  $\beta$ -hemolysin. Gelatinase activite was observed in 2.9% (4/135) of *E. faecium*, however *gelE* gene was observed in only two of these strains. The *gelE* gene was confirmed by sequencing for 25% (1/4) of *E. faecalis* and 20% (27/135) *E. faecium* that haven't expressed gelatinase activite. Antibiotic resistance was determined in 129 enterococci. For *E. faecium* strains, 17.5% (20/114) were resistant to erythromycin, 10.5% (12/114) to tetracycline and 0.9%

(1/114) to teicoplanin and vancomycin (that haven't had *vanA* gene). About *E.faecalis* strains, 75% (3/4) were resistant to tetracycline. The *vanA* gene was observed in 6 *E. faecium* that were susceptible to vancomycin. Technological characteristics of 43 *E. faecium* and 2 *E. faecalis* were observed in nonpathogenic strains and in strains that showed multiple virulence determinants. All of this groups produced lactic acid, dyacetil and lypolisis. Only one *E.faecium* has showed antimicrobial activit against *L. monocytogenes*. The presence of at least a factor of virulence determinants or antibiotic resistance was observed in 82 % of *Enterococcus* strains, alerting about the necessity of careful studies regarding the use of enterococci in food processing.

Key Words: *Enterococcus*, hemolysin, gelatinase, genotypic determinant, Lactic acid bacteria.

## 1. INTRODUÇÃO

*Enterococcus* são bactérias ácido-lácticas (BAL) de grande importância nas áreas de microbiologia de alimentos, ambiental e clínica. São bactérias autóctones do trato gastrointestinal de humanos e animais, mas também são considerados microrganismos onipresentes, fazendo parte da microbiota de águas, vegetais, solos e alimentos. Nos últimos anos, o gênero *Enterococcus* tem merecido destaque em diversas pesquisas, por ser considerado de natureza “ambígua”. Esta característica faz com que, por um lado, tenha o seu uso desejável na produção de alguns alimentos e, por outro, seja motivo de preocupação, por serem patógenos oportunistas para os seres humanos (FRANZ; HOLZAPFEL, 2006; GIRAFFA, 2002; OGIER; SERROR, 2008).

Enterococos são bactérias onipresentes com capacidade de adaptação a diversos ambientes, por isso fazem parte da microbiota predominante de alimentos, como produtos cárneos e derivados lácteos. Essa predominância, associada a sua natureza homofermentativa ou heterofermentativa, fez com que o uso de enterococos como culturas iniciadoras passasse a ser difundido em alimentos fermentados (GIRAFFA, 2002; OGGIER; SERROR, 2008).

Estudos conduzidos com o uso de enterococos como culturas iniciadoras demonstraram que estes foram capazes de desenvolver aroma e textura característicos nos processos de fermentação de embutidos e maturação de queijos. Essas propriedades são promovidas pela capacidade de culturas de enterococos produzirem compostos aromáticos como o diacetil e a acetoína, pela liberação de ácidos graxos de baixo peso molecular, dada a sua atividade lipolítica e pela atividade proteolítica, a qual afeta significativamente a textura de queijos (CENTENO et al., 1999; GARCÍA et al., 2004; HUGAS et al., 2003; SARANTINOPOULOS et al., 2002).

Culturas de enterococos têm sido caracterizadas em diversos estudos pela capacidade de sintetizarem enterocinas, que são peptídeos com atividade

antimicrobiana que promoveram a inibição de patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* e *Vibrio cholerae* (FOULQUIÉ-MORENO, et al., 2006; GONZÁLEZ et al., 2007; HOSSEINI et al., 2009). Essas características, associadas à natureza gastrointestinal deste gênero, conduziram ao uso como culturas probióticas (FRANZ; HOLZAPFEL, 2006; HOSSEINI et al., 2009).

Por outro lado, bactérias do gênero *Enterococcus* estão entre os principais patógenos nosocomiais em pacientes imunodeprimidos, por estarem envolvidos com o desenvolvimento de endocardites, bacteremia e infecções das vias urinárias. A atuação dos enterococos como patógenos oportunistas ocorre devido às características de aquisição e transferência de genes de virulência e sua relação de resistência a múltiplos antibióticos, em especial, à vancomicina, que está relacionada à presença de múltiplas determinantes de virulência em *E. faecium* e *E. faecalis* (GIRAFFA, 2002; KHAN et al., 2005; OGGIER; SERROR, 2008).

A presença de determinantes fenotípicos e genotípicos de virulência é predominante em *Enterococcus* de origem clínica, mas diversos estudos têm constatado a presença dessas determinantes em enterococos utilizados como culturas iniciadoras e isolados de alimentos, especialmente de queijos, nos quais foram observadas múltiplas determinantes de virulência em *E. faecium* e, principalmente *E. faecalis* (EATON; GASSON, 2001; DE VUYST, L.; FOULQUIÉ-MORENO; REVETS, 2003; SEMEDO et al., 2003b; VALENZUELA et al., 2009).

As espécies *E. faecium* e *E. faecalis* são predominantes em diversos queijos de produção artesanal por estarem presentes naturalmente no leite *in natura* e por serem capazes de resistir a tratamentos térmicos como a pasteurização (CARLOS et al., 2009; SARANTINOPOULOS et al., 2002). Devido à importância dos *Enterococcus* em queijos de produção artesanal, diversos estudos envolvendo tanto o potencial tecnológico, síntese de bacteriocinas e fatores de

virulência desse gênero vêm sendo conduzidos (GARCÍA et al., 2002; SARANTINOPOULOS et al., 2002; VALENZUELA et al., 2009).

Na região nordeste do Brasil a produção artesanal de queijo de coalho constitui uma das principais fontes de renda da população rural, sendo este um produto de elevada aceitabilidade também na região sudeste do país. As principais regiões de produção artesanal de queijos de coalho estão localizadas no estado do Ceará, destacando-se as regiões do Vale do Jaguaribe e Sertões Cearenses (CARVALHO, 2007; MAMEDE, 2008).

Devido a importância dos queijos de coalho artesanais para a economia da população rural do estado do Ceará, Carvalho (2007) isolou BAL de queijo de coalho proveniente das regiões do Vale do Jaguaribe e Sertões Cearenses para se conhecer melhor a importância desse grupo nas características dos queijos de coalho. Entre as BAL isoladas do queijo de coalho, foi observada a predominância de *Enterococcus* para 59,6 % de 643 isolados. Alguns destes enterococos foram estudados quanto à presença de algumas determinantes fenotípicas de virulência, porém, sua importância e potencial genotípico de virulência não foram completamente elucidados.

A prevalência de *Enterococcus* na microbiota láctica de queijo de coalho aponta para a importância de trabalhos de caracterização das espécies isoladas deste produto, considerando-se a sua importância econômica e característica ambígua. Assim, estudos do potencial de virulência, produção de bacteriocinas e propriedades tecnológicas de *Enterococcus* isolados de queijo de coalho são relevantes à manutenção da Saúde Pública e ao desenvolvimento tecnológico de fermentos lácteos, sendo este o enfoque desta pesquisa, utilizando as culturas isoladas por Carvalho (2007), através de recursos de caracterização fenotípica e de biologia molecular.

## 2. OBJETIVOS DA PESQUISA

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar culturas de *Enterococcus* spp isoladas de queijos de coalho artesanais em relação aos principais determinantes fenotípicos e genotípicos de virulência, assim como a atuação deste gênero como culturas iniciadoras no queijo de coalho, e quanto a produção de atividade antimicrobiana por isolados sem potencial de patogenicidade.

### 2.2 Objetivos específicos

- Identificar as espécies de *Enterococcus* predominantes pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR).
- Comparar a técnica de identificação molecular das espécies por PCR com a técnica de identificação bioquímica API 20 Strep para alguns isolados.
- Detectar os determinantes fenotípicos de virulência: gelatinase e hemolisinas.
- Detectar nove determinantes genotípicos de virulência por PCR: *ace*, *as*, *cyIA*, *cyIB*, *cyIM*, *efaA*, *esp*, *gelE* e *vanA*.
- Confirmar o gene mais prevalente por sequenciamento.
- Avaliar a resistência a múltiplos antibióticos.
- Avaliar as características de interesse tecnológico: atividade lipolítica, proteolítica, produção de diacetil e perfil em leite tornassolado, em algumas culturas selecionadas de acordo com o perfil de virulência.
- Avaliar a produção de atividade antimicrobiana por culturas sem potencial de virulência contra *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*.



### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

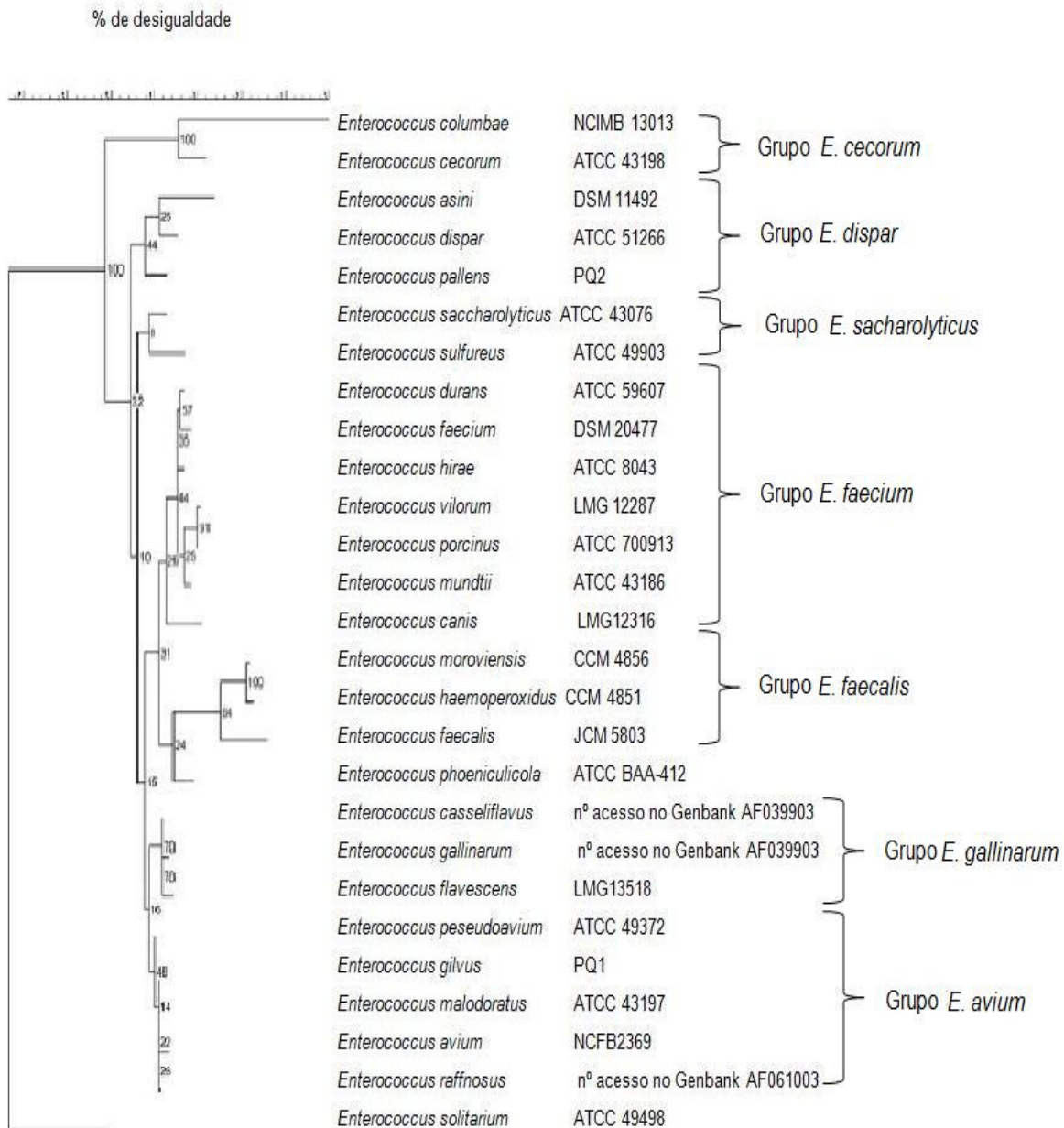
#### 3.1 Características do gênero *Enterococcus*

O gênero *Enterococcus* é formado por bactérias Gram-positivas, que possuem cocos pareados ou em cadeias e estão estreitamente relacionadas com os gêneros *Lactococcus* e *Streptococcus*, por isso, inicialmente foram agrupadas no gênero *Streptococcus* (FRANZ; HOLZAPFEL, 2004; HARTMAN et al., 2001).

Enterococos eram classificados como *Streptococcus* do grupo sorológico D de Lancefield, devido à presença do antígeno relacionado aos isolados provenientes do trato gastrointestinal. Diferenças fisiológicas e estudos moleculares, baseados na hibridização e sequenciamento do RNAr 16S, levaram a divisão deste grupo em *Streptococcus*, *Lactococcus* e *Enterococcus*, a partir de 1984 (FRANZ; HOLZAPFEL, 2004; GIRAFFA, 2002; HARTMAN et al., 2001).

A identificação molecular do gênero *Enterococcus* baseada no sequenciamento do RNAr 16S levou a classificação de mais de 28 espécies do gênero, as quais foram divididas em sete grupos, e têm sua relação filogenética demonstrada na Figura 1 (FRANZ; HOLZAPFEL, 2004).

Entre as diversas espécies caracterizadas para este gênero *E. faecium* e *E. faecalis* são predominantes em isolados alimentos e de origem clínica. Estas espécies são comensais do trato gastrointestinal, onde estão presentes em concentrações entre  $10^4$  e  $10^8$  UFC/ g de material digestivo (BRADLEY; FRAISE; 1996; SILVA et al., 2007).



**Figura 1** - Matriz de similaridade demonstrando a relação filogenética das espécies de *Enterococcus* baseada na comparação de sequências do RNAr 16S. *E. solitarius* foi incluída em um grupo a parte, as probabilidades de valores (%) de similaridade estão apresentados nos ramos.

Fonte: adaptado de Franz; Holzapfel (2004)

Bactérias do gênero *Enterococcus* são aeróbios facultativos, não esporogênicos, catalase-negativo, porém, ocasionalmente produzem pseudo-catalase, podendo apresentar um fenótipo catalase positivo. São capazes de fermentar carboidratos sintetizando predominantemente ácido lático, sem a produção de CO<sub>2</sub>, o que as caracteriza como bactérias de metabolismo homofermentativo. No entanto para algumas espécies foi verificada a presença de metabolismo heterofermentativo, caracterizado pela produção de metabólitos como o diacetil e a acetoína (GIRAFFA, 2002; SILVA et al., 2007).

São microrganismos mesofílicos, com faixa ótima de temperatura de crescimento entre 35 e 37 °C, mas são capazes de se reproduzirem na faixa de 10 a 45 °C. Diferenciam-se das demais bactérias de metabolismo homofermentativo por possuírem capacidade de crescimento em solução de NaCl a 6,5%, na presença de 40 % de sais biliares e a pH 9,6. Além disso, sintetizam as enzimas aminopeptidase (PYR) e leucina aminopeptidase (LAP), e hidrolisam esculina (HARTMAN et al., 2001; SILVA et al., 2007).

### 3.2 *Enterococcus* em alimentos

*Enterococcus* são frequentemente isolados de diversos alimentos e de ambientes de plantas de processamento. Por serem bactérias autóctones associadas ao trato gastrointestinal de mamíferos, têm a sua relação de contaminação com os alimentos bastante associada a práticas de higiene deficientes durante a elaboração destes. Porém a sua elevada resistência a condições ambientais inóspitas a outras bactérias de origem intestinal, assim como a sua natureza onipresente, não os tornam indicadores de contaminação como as enterobactérias (FRANZ et al, 2003, GIRAFFA, 2003, SILVA et al., 2007).

Por meio de contaminação fecal ou ambiental tornam-se contaminantes naturais das matérias-primas de alguns alimentos, como carnes e leites, são capazes de se multiplicarem em alimentos submetidos a processos de fermentação (GIRAFFA, 2002; OGGIER; SERROR, 2008).

Entre os diversos tipos de alimentos dos quais foram isolados enterococos, destacam-se os queijos, especialmente os produzidos artesanalmente, onde foram encontradas concentrações variáveis de  $10^4$  a  $10^7$  UFC/ g (ANDRADE, 2009; CARVALHO, 2007; PERRI, 2010).

As espécies *E. faecium* e *E. faecalis* são predominantes em queijos de produção artesanal, onde foram identificadas para mais de 80 % da população de isolados de enterococos de diversos tipos de queijos (ANDRADE, 2009; FERNANDES, 2010; PERRI, 2010). Ambas as espécies além de estarem associadas naturalmente ao trato gastrointestinal, são tolerantes ao sal e principalmente, a processos de pasteurização (GIRAFFA, 2002).

### 3.3 Propriedades tecnológicas dos *Enterococcus*

#### 3.3.1 Culturas iniciadoras

Em produtos fermentados, como embutidos e queijos, os enterococos podem ser utilizados como culturas iniciadoras por promoverem melhorias nas propriedades de textura e desenvolvimento de sabor. Em queijos, o desenvolvimento dessas características ocorre pela promoção de proteólise, lipólise e quebra do citrato (FOULQUIE´MORENO et al., 2006; OGIER; SERROR, 2008).

A habilidade de metabolizar citrato está relacionada aos plasmídeos que possuem genes transportadores responsáveis pelo metabolismo do citrato no meio. Durante o processo de degradação do citrato são sintetizados uma série de produtos metabólicos como o diacetil, acetaldeído, acetoína e 2,3 butanediol, responsáveis pela formação de compostos essenciais para a formação de aroma característico de produtos lácteos fermentados (FOULQUIE´ MORENO et al., 2006; FRANZ; HOLZAPFEL, 2006).

A proteólise ocorre pela degradação primária da caseína e secundária de alguns aminoácidos ocasionando o desenvolvimento de textura e sabor em queijos maturados. BAL como os enterococos estão associadas à parede celular de proteinases e intracelular de peptidases, promovendo lise celular e consequente hidrólise da caseína durante o processo de maturação (DURLU-OZKAYA et al., 2001; FOULQUIE´ MORENO et al., 2006). Sarantinopoulos et al., 2001 estudaram a adição de *Enterococcus faecium* como cultura “starter” na elaboração de queijo curado, obtendo-se aumento da proteólise da caseína quando comparada a cura do queijo sem a adição de *E. faecium*.

A atividade lipolítica dos enterococos pode contribuir para as propriedades de textura e sabor pela quebra de ácidos graxos, como os de cadeia

curta que se convertem a compostos aromáticos como metil-quetonas e lactonas (FOULQUIE´ MORENO et al., 2006; GIRAFFA, 2003).

As propriedades sensoriais de *E. faecalis* var. *liquefaciens* e *E. faecalis* var. *faecalis* em queijo cebreiro foram estudadas por Centeno et al. (1999). Para ambas as culturas foram observadas atividade lipolítica, proteolítica, produção de diacetil e acetoína, com sabor ácido mais intenso para *E. faecalis* var. *faecalis* e sabor amargo mais intenso para *E. faecalis* var. *liquefaciens*. Quando comparadas a cultura *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, microrganismo tradicionalmente adicionado ao tipo de queijo estudado, as culturas demonstraram menor atividade proteolítica para a *E. faecalis* var. *liquefaciens* e moderada atividade lipolítica para *E. faecalis* var. *faecalis*.

### 3.3.2 Produção de bacteriocinas

As bacteriocinas são peptídeos produzidos por algumas bactérias que possuem atividade letal ou inibitória a alguns micro-organismos (O'SULLIVAN, 2007). Sua utilização tem merecido destaque na área de alimentos por apresentarem atividade contra diversos microrganismos deteriorantes e patogênicos e por serem considerados agentes antimicrobianos geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) (FERREIRA, 2005; HOOVER; CHEN, 2005).

As BAL são produtoras de uma série de fatores antagonistas incluindo a produção de compostos metabólicos, e de agentes antimicrobianos, como as bacteriocinas. O mecanismo de ação das bacteriocinas de BAL está relacionado à absorção de receptores localizados na membrana celular de microrganismos específicos, ocasionando mudanças metabólicas, biológicas e morfológicas nas células resultando assim na morte bacteriana. Devido à relação da ação das bacteriocinas produzidas por BAL sobre a membrana celular, seu espectro de ação se restringe às bactérias gram positivas, uma vez que as bactérias Gram-

negativas possuem uma camada de lipopolissacarídeos que as protegem contra a ação de bacteriocinas (NAIDU et al., 2006; O'SULLIVAN, 2007).

De acordo com Hoover e Chen (2005) as bacteriocinas sintetizadas por BAL são comumente divididas em três classes:

**Classe I:** São denominadas lantibióticos, que contém peptídeos de baixa massa molecular (<5kDa), compostos pelos aminoácidos lantionina, metilantionina, dehidrolanina e deidrobutirina. Esta classe é subdividida em Tipo A e Tipo B, as bacteriocinas Tipo A são compostas por peptídeos alongados de carga positiva que possuem mecanismos de ação relacionados à formação de poros na membrana celular, já as bacteriocinas de tipo B formam peptídeos globulares de carga negativa, que possuem mecanismo de ação relacionado à inibição de enzimas específicas. São exemplos do tipo A nisina e lactocina S e do tipo B a mersacidina.

**Classe II:** São bacteriocinas de massa molecular inferior a 10 kDa, termotolerantes e não possuem lantionina. Pode ser subdividida em três grupos: classe IIa, classe IIb e classe IIc. A classe IIa é caracterizada por possuir peptídeos com a sequência de aminoácidos -Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys, o que a caracteriza por possuir atividade contra *Listeria*, são exemplos a pediocina, enterocina A e leucocina. A classe IIb é caracterizada por bacteriocinas que requerem dois peptídeos para apresentarem atividade, são exemplos as lactococinas G e M, lactacina F e a plantaricina A. A classe IIc possui peptídeos remanescentes, e possui como exemplos a acidocina B, a carnobacteriocina A e as enterocinas P e B.

**Classe III:** São bacteriocinas de elevada massa molecular (> 30 kDa), termolábeis e que possuem proteínas que ainda não são bem caracterizadas, mas requerem lipídios ou carboidratos para serem ativas.

As bacteriocinas sintetizadas por *Enterococcus* são chamadas de enterocinas. Algumas dessas enterocinas demonstram atividade inibitória de microrganismos deteriorantes e patogênicos como *Listeria monocytogenes*,

*Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium* spp e *Bacillus* spp (FERREIRA, 2005).

Ferreira (2005) realizou um estudo com enterocinas sintetizadas por *E. faecium*, *E. faecalis* e *E. mundtii* isolados de fezes humanas, no qual obteve a inibição do crescimento de *Listeria*, *Lactobacillus plantarum* e *Salmonella* Enteritidis. Outro estudo realizado por García et al. (2004) demonstrou atividade antimicrobiana de enterocina sintetizada por *E. faecalis* EJ97 sobre o desenvolvimento de *Listeria monocytogenes*, com melhor atividade anti-*Listeria* quando esta foi associada a nitrato de potássio.

Carvalho (2007) estudou a atividade de enterocinas sintetizadas por *Enterococcus* não patogênicos provenientes da matéria-prima e produto final no processamento de queijo de coalho, contra *Listeria monocytogenes*. Quando comparado a enterocinas de outras BAL, foi observada maior atividade anti-*Listeria* das enterocinas provenientes de *Enterococcus*.

A produção de enterocinas por *Enterococcus* não é uma característica relacionada a todas as culturas do gênero, sendo específica a alguns isolados. Andrade (2009) estudou a inibição do crescimento de *Listeria monocytogenes* por *E. faecium* isolados de queijo Serra da Canastra, não obtendo a inibição deste microrganismo por nenhuma das 56 culturas isoladas.



### 3.4 Patogenicidade de *Enterococcus*

Nas últimas duas décadas, enterococos vêm sendo considerados importantes patógenos nosocomiais, sendo responsáveis pela terceira maior causa de bacteremia e segunda maior causa infecções do trato urinário (JARVIS; MARTONE, 1992; RICHARDS et al., 2000) . A patogenicidade deste gênero pode ser explicada pela sua capacidade de sobreviver à ambientes estressantes, de resistir a antibióticos e de adquirir genes de virulência a outros microrganismos patogênicos (FRANZ; HOLZAPFEL, 2006; GIRAFFA, 2002). Estas características podem estar relacionadas a capacidade dos enterococos adquirirem plasmídeos, os quais são responsáveis pela transferência de genes de virulência e de resistência antimicrobiana (MUNDY et al., 2000).

A patogenicidade causada por bactérias do gênero *Enterococcus* é multifatorial e complexa, ocorre devido à capacidade destes produzirem substâncias que podem causar algum tipo de dano ao hospedeiro, denominadas fatores de virulência (MUNDY et al, 2000). Os fatores de virulência seguem uma sequência de eventos ocasionando as infecções, os quais são determinados pela colonização, invasão do tecido e mecanismos de defesa do hospedeiro (FRANZ HOLZAPFEL.; STILES, 1999).

As principais substâncias associadas a fatores de virulência responsáveis pela geração do processo infeccioso por enterococos são: hemolisinas, geralmente relacionadas às citolisinas, proteínas de superfície, adesinas de parede celular, adesinas de colágeno, substância de agregação e gelatinase (EATON; GASSON, 2002; MANNU et al, 2003; FOULQUIÉ-MORENO et al, 2006). Os principais fatores de virulência de *Enterococcus* estão relacionados a genes específicos são apresentados na Tabela 1, assim como a indicação da possível associação da presença destes genes com o estágio de virulência do hospedeiro (FRANZ; HOLZAPFEL 2006).

**Tabela 1** - Principais fatores de virulência encontrados em alguns *Enterococcus* e possíveis associações com o estágio de virulência.

Determinante de virulência	Possível associação com o estágio de virulência
Substâncias de agregação ( <i>agg</i> )	Adesão de células eucarióticas (adesina)/ promoção de colonização.  Adesão da matriz protéica extracelular (podendo promover deslocamento).  Invasão das células eucarióticas (invasina)  Aumento da sobrevivência das células imunes (evasão da resposta imune do hospedeiro).
Citolisinas ( <i>cyl</i> )	Toxina da célula eucariótica  Lise das células imunes (evasão da resposta imune do hospedeiro).
Gelatinase ( <i>gel</i> )	Pode hidrolisar diversos peptídeos biológicos (ex: colágeno e fibrina)  Pode hidrolisar peptídeos antibacterianos (evasão da resposta imune natural do hospedeiro).
Proteínas de superfície ( <i>esp</i> )	Adesinas promotoras de colonização.  Exibem características de invasão da resposta imune.
Adesinas de colágeno ( <i>ace</i> )	Adesão da matriz protéica extracelular (podendo promover deslocamento).  Exibem características de invasão da resposta imune.
Adesinas de parede celular ( <i>efaA<sub>fs</sub></i> e <i>efaA<sub>fm</sub></i> )	Adesinas que promovem o desenvolvimento de endocardites.

Fonte: Adaptado de Franz; Holzapfel (2006)

*Enterococcus* podem apresentar um conjunto específico de genes, denominados “Ilha de Patogenicidade”, capazes de codificar fatores de virulência que promoverão a patogenicidade da bactéria.

Esta *Ilha de Patogenicidade* é formada através da presença de genes que codificam transposases, reguladores de transcrição ou adaptação e sobrevivência em diferentes ambientes (SHANKAR et al., 2002). Em enterococos, genes como proteínas de superfície (*esp*), operon da citolisina, substância de agregação (*asc10*), e da proteína induzível por *stress* (*gls24-like*) contribuem para

a agregação bacteriana, sobrevivência em neutrófilos e aderência ao tecido do hospedeiro.

Isolados de enterococos provenientes de diversos ambientes e produtos alimentícios foram relacionados a presença de fatores de virulência. Camargo (2005) estudou os fatores de virulência de *E. faecium* e *E. faecalis* isolados de fezes de animais, voluntários saudáveis e de pacientes que sofreram hospitalização por infecção. Foi verificada a presença de Ilhas de Patogenicidade em 32 de 146 isolados de *E. faecalis* e dos genes de adesinas em 98 % dos isolados de *E. faecium*.

Em produtos alimentícios foi observada maior incidência de fatores de virulência em isolados de *E. faecalis* quando comparados aos isolados de *E. faecium*. Cariolato (2008) verificou a presença de mais determinantes de fatores de virulência de *E. faecalis* em relação a *E. faecium* isolados de produtos lácteos e de seres humanos. Mannu et al. (2003) encontraram simultaneamente proteínas de superfície e substâncias de agregação em *E. faecalis* mas não em *E. faecium* isolados de queijo. Estas constatações indicam que as culturas de *E. faecalis* apresentam maior probabilidade de ocasionarem infecções que as culturas de *E. faecium*.

### 3.5 Resistência a antimicrobianos

*Enterococcus* são micro-organismos comensais cujos estudos têm demonstrado serem capazes de desenvolverem uma série de mecanismos de resistência a diversas classes de agentes antimicrobianos como penicilinas, aminoglicosídeos, vancomicina, polimixinas e outros. Esta resistência está associada principalmente à seleção de cepas multirresistentes pelo uso indiscriminado destes antibióticos em ambientes hospitalares e na criação animal (GIRAFFA, 2002; KLARE et al., 2003; SHEPARD; GILMORE, 2002).

A aquisição de resistência a antibióticos ocorre segundo uma série de fatores como o potencial genético do microrganismo (acumulação de mutações do DNA gerando resistência ou transferência de genes de resistência) e a seleção de cepas resistentes pelo uso de antibióticos em doses terapêuticas. A forma de aquisição de resistência por enterococos varia de acordo com o tipo de antibiótico. Na Tabela 2 são apresentados os principais antimicrobianos associados aos *Enterococcus*, sua forma de atuação e os genes associados a sua resistência (KLARE et al., 2003)

Entre os antimicrobianos associados à resistência de *Enterococcus*, o glicopeptídeo vancomicina se tornou motivo de grande preocupação por estar associado à maior parte dos óbitos relacionados à infecções hospitalares por enterococos nos anos 90 (CHIVERS, 2003). Enterococos possuem sete fenótipos de glicopeptídeos resistentes já identificados para resistência a vancomicina. A resistência destes glicopeptídeos resulta na síntese de peptidoglicanos precursores que reduzem a atividade da vancomicina como agente antimicrobiano (SHEPARD; GILMORE, 2002).

**Tabela 2** - Aquisição de resistência a antibióticos por *Enterococcus*.

Antibiótico	Mecanismo de ação	Genes de resistência
Penicilinas	Inibição de enzimas para a biosíntese da parede celular	<i>pbp5</i> <i>blaZ</i>
Aminoglicosídeos	Inibição da biosíntese protéica por ligação do RNAr 16s da cadeia 30S.	<i>aph</i> <i>aac</i> <i>ant</i>
Glicopeptídeos	Inibição da síntese da parede celular por ligação ao peptidoglicano precursor e inibição da transglicosilação.	<i>vanA</i> , <i>vanB</i> , <i>vanC</i> , <i>vanD</i> <i>vanE</i>
Cloranfenicol	Inibição da biosíntese protéica por ligação da subunidade ribossômica 50S e pela inibição da peptidiltransferase.	<i>cat<sub>p</sub></i>
Tetraciclina	Inibição da biosíntese protéica por afinidades a regiões do microrganismo.	<i>tet</i>

Fonte: Adaptado de Klare et al.(2003).

A resistência a antimicrobianos tradicionalmente aplicados em ambientes hospitalares não é restrita a isolados destes ambientes. No estudo realizado por Andrade (2009), que consistiu na avaliação de resistência a antimicrobianos por *E. faecium* isolados de queijo Serra da Canastra, observou-se a resistência aos antimicrobianos: vancomicina, gentamicina, clorofenicol, eritromicina, ampicilina, teicoplanina e tetraciclina. Outro estudo realizado por Valenzuela et al. (2009) verificou-se a resistência ao antimicrobiano vancomicina por *E. faecalis* e *E. faecium* isolados de produtos de origem animal incluindo leite e queijo.

### 3.6 *Enterococcus* em queijo de coalho

O queijo de coalho é definido como o produto obtido por coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas e comercializado normalmente com até dez dias de fabricação (BRASIL, 2001). É um produto típico da região Nordeste do Brasil, onde a fabricação artesanal constitui a principal fonte de renda da população rural. Como consequência, o produto apresenta elevada carga microbiana, incluindo bactérias patogênicas, microrganismos deterioradores e bactérias ácido-lácticas (BORGES et al. 2003; CARVALHO, 2007 ; FEITOSA et al., 2003).

A contaminação de queijos por enterococos pode ser proveniente da matéria-prima, uma vez que são BAL e, portanto fazem parte da flora natural do leite. As características de sobrevivência dos enterococos a condições adversas, como elevada concentração de sal, condições extremas de pH e termoresistência acarretam na seleção natural de culturas resistentes em produtos processados como o queijo (POZNANSKI et al., 2004; RINCE et al., 2000)

No processamento de queijo coalho, conforme a Figura 2, *Enterococcus* provenientes da matéria-prima são capazes de sobreviver, aos tratamentos térmicos de pasteurização (a qual pode não ser frequente no processamento artesanal) e cozimento da massa. Este fato pôde ser constatado em um estudo realizado por Carvalho (2007), que verificou aumento na incidência de *Enterococcus* da matéria-prima para o produto final no processamento de queijo de coalho. No mesmo estudo foi constatada a prevalência de *Enterococcus* entre as BAL presentes tanto na matéria-prima, quanto ao longo do processamento e no queijo de coalho.

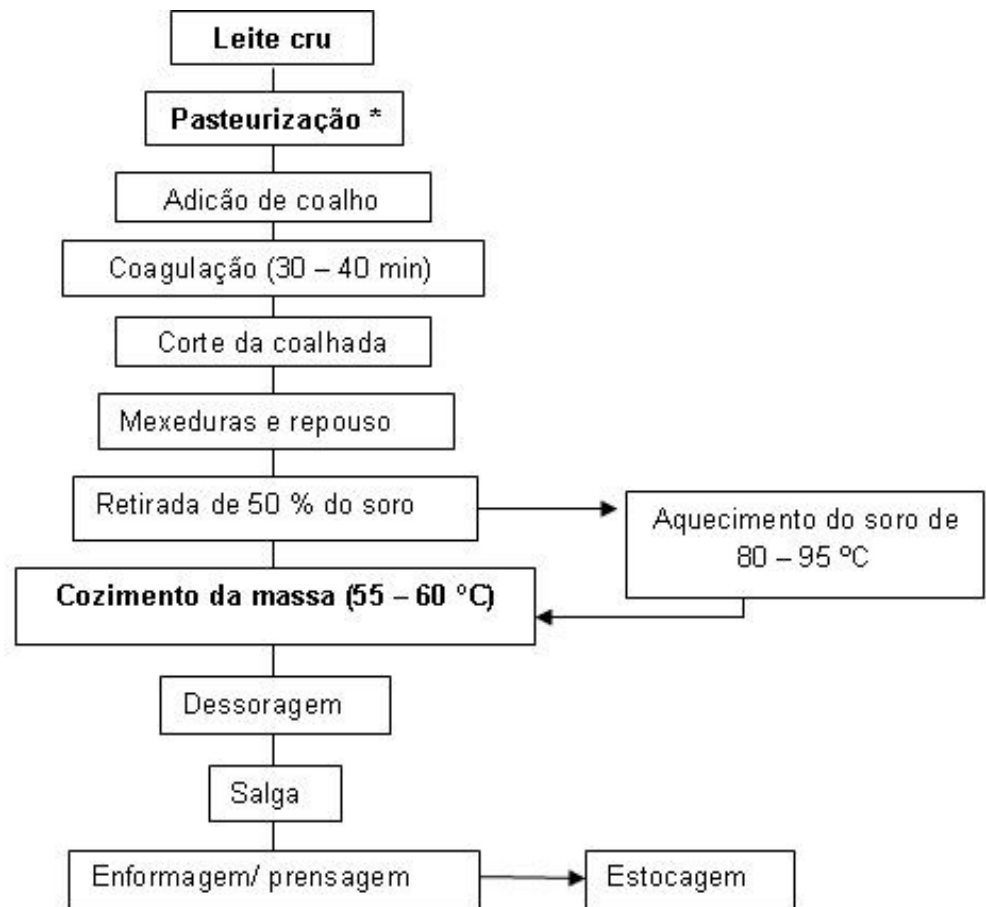
As culturas lácteas em geral podem apresentar duas vias metabólicas de fermentação da lactose do leite: homofermentativa e heterofermentativa.

Culturas homofermentativas metabolizam a lactose prioritariamente em ácido láctico enquanto as culturas heterofermentativas metabolizam a lactose em outros compostos que auxiliam na formação do aroma e textura característicos do queijo, como o diacetil (JAY, 2005; WALSTRA et al., 2006).

A prevalência de enterococos em queijos de coalho pode ser um indicativo de que eles contribuem para as características sensoriais deste produto, uma vez que muitas culturas apresentam atividade proteolítica, lipolítica e sintetizam o diacetil, que confere ao produto aroma característico de manteiga (VALENZUELA et al., 2009; OGIER e SERROR, 2008).

Perri (2010) observou que culturas de enterococos isoladas do processamento de queijo de coalho resistiram ao processo de pasteurização e foram capazes de produzir diacetil, atividade proteolítica e lipolítica.

Embora culturas de enterocococs demonstraram-se capazes de produzir propriedades tecnológicas de interesse para o processamento de queijo de coalho, observou-se também que muitas expressaram atividades fenotípicas de virulência, como a gelatinase e a  $\beta$ -hemólise (CARVALHO, 2007; PERRI, 2010).



\* Em processos artesanais o leite pode ser processado sem pasteurização

**Figura 2** - Fluxograma de processamento artesanal do queijo de coalho  
Fonte: Adaptado de Carvalho (2007).



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Origem e manutenção dos micro-organismos

Os 150 isolados de *Enterococcus* avaliados neste estudo pertencem à coleção de bactérias ácido lácticas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Embrapa Agroindústria Tropical. Estas culturas foram isoladas e identificadas bioquimicamente para o gênero *Enterococcus* por Carvalho (2007). O isolamento foi realizado a partir de 14 amostras de queijos de coalho provenientes de duas regiões de produção artesanal do estado do Ceará: Vale do Jaguaribe e Sertões Cearenses, codificadas de acordo com a Tabela 3.

Os isolados de enterococos foram recuperados em caldo *Main Rugosa Sharpe* (MRS, Difco, Sparks, EUA), a 35 °C por 24 horas e, após a adição de 15%, de glicerol foram mantidos a - 80 °C. Para realização dos testes de fatores de virulência, cada cultura foi reativada em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, Difco, Sparks, EUA) a 35 °C por 18 a 24 horas (DURLU-OZKAYA et al., 2001).

**Tabela 3** – Identificação e origem dos enterococos isolados de queijos de coalho.

Origem	Código dos queijos	Números de identificação dos isolados
Vale do Jaguaribe	QC01	01 a 12
Vale do Jaguaribe	QC02	13 a 25
Vale do Jaguaribe	QC03	26 a 37
Vale do Jaguaribe	QC04	38 a 49
Vale do Jaguaribe	QC05	50 a 62
Vale do Jaguaribe	QC06	63 a 74
Sertões Cearenses	QC07	75 a 86
Sertões Cearenses	QC08	87 a 91
Vale do Jaguaribe	QC09	92 a 104
Vale do Jaguaribe	QC10	105 a 114
Vale do Jaguaribe	QC11	115 a 125
Vale do Jaguaribe	QC12	126 a 136
Sertões Cearenses	QC13	137 a 141
Vale do Jaguaribe	QC14	142 a 150

## 4.2 Identificação das espécies de *Enterococcus* pela técnica da PCR

As 150 culturas de enterococos foram identificadas para as espécies *E. faecium* e *E. faecalis* pela técnica molecular da Reação da cadeia da Polimerase (PCR).

### 4.2.1 Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada com 600 µl da cultura ativada, submetida à centrifugação a 13.000 xg por 10 minutos (centrífuga Eppendorf 5415D). O sobrenadante foi descartado e os *pellets* foram re-suspendidos em 95 µl de tampão PCR 1X (10 mM de tris-HCl, 50 mM de KCl) (Invitrogen Life Technologies, EUA), adicionados de 4 µl de lisozima (50 mg/ml) (Sigma-Aldrich, Alemanha) e mantidos a temperatura ambiente por 15 minutos. A seguir, foi adicionado 1 µl de proteinase K (20 mg/ml) (Invitrogen Life Technologies, EUA) e mantido em banho de água a 60 °C por 60 minutos, com tratamento final a 95 °C por 8 minutos (FURRER et al., 1991). O DNA de cada isolado foi mantido a – 20 °C até o momento de realização das análises pela técnica da PCR.

### 4.2.2 Reação em cadeia da polimerase – PCR

As sequências de *primers* utilizadas para a identificação das espécies *E. faecium* e *E. faecalis* foram desenhadas por Dutka-Malen et al. (1995), e estão apresentadas na Tabela 4. As cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 7080 e *Enterococcus faecium* ATCC 6569 foram utilizadas como controles positivos. O volume total de cada PCR foi de 25 µl: 1 µl de DNA molde, 0,2 µM de cada *primer*, 1X de tampão PCR, 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, e 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, EUA). As condições operacionais da PCR no termociclador (Eppendorf 5345) foram: etapa inicial a 94 °C por 1 minuto, 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 54 °C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 1 minuto, e uma etapa final a 72 °C por 10 minutos (DUTKA-

MALEN et al, 1995) . A eletroforese dos produtos da PCR foi realizada em gel de agarose a 1,5% e corada com Sybr Safe (Invitrogen Life Technologies, EUA) por 15 a 20 minutos. A visualização dos produtos foi realizada através de transiluminador UV (Kodak D320).

**Tabela 4** - Primers utilizados na identificação das espécies *E. faecium* e *E. faecalis*.

Espécie	Gene amplificado	Primer	Seqüência (5' – 3')	Produto (pb)
<i>E. faecalis</i>	<i>ddl<sub>E. faecalis</sub></i>	Fk1	ATCAAGTAC AGTTAGTCTT	941
		Fk2	ACGATTCAAAGCTAACTG	
<i>E. faecium</i>	<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	Fae1	GCAAGG CTTCTTAGAGA	550
		Fae2	CATCGTGTA AGCTAACTTC	

Fonte: Dutka-Malen et al. (1995).

### 4.3 Avaliação da resistência a antibióticos

A sensibilidade a antibióticos das culturas de *Enterococcus* foi avaliada utilizando-se o método de disco-difusão, conforme estabelecido pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2003).

As culturas reativadas foram repicadas em caldo BHI e incubadas a 35 °C por 4 a 6 h. A concentração de cada inóculo foi padronizada pelo ajuste da densidade óptica para a escala 0,5 de Mc Farland, em solução salina estéril (0,85% de NaCl). As suspensões foram semeadas em ágar Mueller-Hinton com o auxílio de um suabe estéril. Cada disco de antimicrobiano (Tabela 6) foi colocado na superfície do agar inoculado. As placas foram então incubadas a 35 °C por 18 a 24h. Com o auxílio de uma régua, os halos de inibição foram medidos e a resistência aos antibióticos, foi avaliada de acordo com os diâmetros dos halos de inibição estabelecidos na Tabela 5.

**Tabela 5** - Padrões de interpretação dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento das culturas de *Enterococcus* isoladas de queijos de coalho.

Antimicrobiano	Concentração (µg)	Diâmetro (mm)		
		S*	I*	R*
ampicilina	10	16	---	17
cloranfenicol	30	12	13-17	18
eritromicina	15	13	14-22	23
norfloxacina	15	12	13-16	17
teicoplanina	30	10	11-13	14
tetraciclina	30	14	15-18	19
vancomicina	30	14	15-16	17

\* Diâmetros dos halos de inibição para a cultura ser considerada: sensível (S), intermediária (I), resistente (R).

Fonte: NCCLS (2003)

#### 4.4 Avaliação de fatores de virulência dos isolados de *Enterococcus* spp

A avaliação dos fatores de virulência foi realizada com os 150 isolados de enterococos para as seguintes determinantes de virulência: hidrólise da gelatina e atividade hemolítica (fatores fenotípicos), presença de genes de virulência (*ace*, *as*, *cyIA*, *cyIB*, *cyIM*, *efaA*, *esp*, *gelE* e *vanA*) e a resistência a múltiplos antibióticos.

##### 4.4.1 Fatores fenotípicos de virulência

###### 4.4.1.1 Hidrólise da gelatina

A avaliação da atividade de gelatinase foi realizada em tubos contendo ágar gelatina nutriente (Difco, Sparks, EUA) aos quais cada cultura ativada foi inoculada com o auxílio de uma agulha de inoculação estéril e incubadas a 35 °C por 5 dias. Os tubos foram então incubados a 4 °C por mais 2 horas . A hidrólise da gelatina foi confirmada pela verificação da liquefação do meio, utilizando-se a cultura *Bacillus cereus* NCTC 1143 como controle positivo (BROLAZO, 2003).

#### 4.4.1.2 Atividade hemolítica

A atividade hemolítica foi realizada em ágar BHI suplementado de 5% de hemácias de equino. Os isolados reativados foram estriados em placas deste meio e incubados a 37 °C por 24 - 48 horas. A atividade  $\beta$ -hemolítica foi confirmada pela formação de um halo claro ao redor das colônias, utilizando-se a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 27154 como controle positivo, para as culturas negativas foi considerada atividade  $\gamma$ -hemolítica (EATON; GASSON, 2001).

#### 4.4.2 Fatores genotípicos de virulência

O DNA foi extraído conforme o Item 4.2.1. Para identificação dos genes de virulência, foram utilizados como controle positivo: *E. faecalis* ATCC 29212 para os genes *gelE*, *cyIA*, *cyIB*, *cyIM*; *E. faecium* 329/99 para o gene *vanA* (coleção do Laboratório de Higiene – FEA/ Unicamp); *E. faecalis* 594 para o gene *esp* (MARQUES; SUZART, 2004); *E. faecalis* 341 para os genes *ace* e *efaA* (GOMES et al., 2008) e *E. faecalis* 574 para o gene *as* (GOMES et al., 2008). As sequências dos *primers* utilizados para a identificação dos genes de virulência avaliados estão apresentadas na Tabela 6.

O volume total da PCR para os genes *ace*, *as*, *efaA*, *esp* e *vanA* foi de 25  $\mu$ l que consistiu em 1  $\mu$ l de DNA molde, 0,2  $\mu$ M de cada *primer*, 1X de tampão PCR, 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, e 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, EUA). As condições operacionais da PCR no termociclador (Eppendorf 5345) foram: etapa inicial a 94 °C por 1 minuto, 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento (a temperatura de acordo com a Tabela 5) por 1 minuto, extensão a 72 °C por 1 minuto, e uma etapa final a 72 °C por 10 minutos (EATON; GASSON, 2001). A eletroforese dos produtos da PCR foi realizada em gel de agarose a 1,5% e corada com Sybr Safe (Invitrogen Life

Technologies, EUA) por 15 a 20 minutos. A visualização dos produtos foi realizada através de transiluminador UV (Kodak D320).

Para os demais genes foram realizadas reações de multiplex PCR, analisando-se simultaneamente os seguintes genes: *ge/E* e *cy/B*; *cy/A* e *cy/M*. O volume total da reação de PCR foi de 25 µl que consistiu em 1 µl de DNA molde, 0,2 µM de cada *primer*, 1X de tampão PCR, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, e 1U de *Platinum Taq* DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, EUA). As operacionais da PCR no termociclador (Eppendorf 5345) foram: etapa inicial a 94 °C por 3 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento (a temperatura de acordo com a Tabela 5) por 1 minuto, extensão a 72 °C por 1 minuto, e uma etapa final a 72 °C por 10 minutos (GOMES et al., 2008; VANKERCKHOVEN et al., 2004). A eletroforese dos produtos da PCR foi realizada em gel de agarose a 1,5% e corada com Sybr Safe (Invitrogen Life Technologies, EUA) por 15 a 20 minutos. A visualização dos produtos foi realizada através de transiluminador UV (Kodak D320).

**Tabela 6** - Sequências dos *primers* e tamanho dos fragmentos dos genes de virulência avaliados por PCR

Gene	Marcador de Virulência	Primers	Sequência (5' – 3')	Tamanho Produto (pb)	Temperatura de anelamento (°C)	Referência
<i>ace</i>	Adesinas de colágeno	ACE1 ACE2	AAAGTAGAATTA GATCCACAC TCTATCACATTTCGGTTGCG	320	50	MANNU et al., 2003
<i>as</i>	Substâncias de agregação	AS1 AS2	CCAGTAATCAGTCCAGAAACAACC TAGCTTTTTTCATTCTTGTTGTTGTT	406	58	MANNU et al., 2003
<i>cyM</i>	Citolisinas	TE13 TE14	CTGATGGAAAGAAGATAGTAT TGAGTTGGTCTGATTACATTT	742	56	EATON; GASSON, 2001
<i>cyB</i>	Citolisinas	TE15 TE16	ATTCCTACCTATGTTCTGTTA AATAAACTCTTCTTTTCCAAC	843	54	EATON; GASSON, 2001
<i>cyA</i>	Citolisinas	TE17 TE18	TGGATGATAGTGATAGGAAGT TCTACAGTAAATCTTTCGTCA	517	56	EATON; GASSON, 2001
<i>efaA</i>	Adesinas de parede celular	efaA1 efaA2	CGTGAGAAAGAAATGGAGGA CTACTAACACGTCACGAATG	499	60	MANNU et al., 2003
<i>esp</i>	Proteínas de superfície	TE34 TE36	TTGCTAATGCTAGTCCACGACC GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA	933	65	EATON; GASSON, 2001
<i>gelE</i>	Gelatinase	TE9 TE10	ACCCCGTATCATTGGTTT ACGCATTGCTTTTCCATC	419	54	EATON; GASSON, 2001
<i>vanA</i>	Resistência a vancomicina	VA1 VA2	CCCCTTTAACGCTAATACGATCAA CATGAATAGAATAAAAGTTGCAAT	1030	52	MANNU et al., 2003

#### 4.4.2.1 Confirmação do gene *gelE* por sequenciamento

A confirmação da presença do gene *gelE* foi realizada por seqüenciamento de 50 isolados que apresentaram o seguinte perfil na eletroforese deste gene: bandas com 419 pb nítidas, bandas com 419 pb pouco nítidas e não formaram necessariamente bandas com 419 pb, mas expressaram o fenótipo gelatinase. Para estes isolados, o DNA extraído conforme o Item 4.2.1 foi submetido a PCR que teve volume total de 25 µl que consistiu em 1 µl de DNA molde, 0,2 µM de cada *primer*, 1X de tampão PCR, 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada DNTP, e 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitogen). As condições da PCR foram: etapa inicial a 94 °C por 1 minuto, 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento (a temperatura de acordo com a tabela 3) por 1 minuto, extensão a 72 °C por 1 minuto, e uma etapa final a 72 °C por 10 minutos.

Os produtos de PCR foram observados por eletroforese em gel de agarose (1,5%) e submetidos a sequenciamento em sequenciador capilar automático (ABI PRISM 3700 DNA Analyzer - Applied Biosystems – HITACHI), realizado pelo Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética da UNICAMP (CBMEG, UNICAMP, SP). As sequências obtidas foram comparadas com as sequências disponíveis no Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) e alinhadas no programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>).



## 4.5 Avaliação de propriedades tecnológicas de culturas de *Enterococcus*

Para se verificar se as culturas de *Enterococcus* atuam como culturas iniciadoras na produção de queijo de coalho artesanal, foram avaliadas as seguintes propriedades tecnológicas inerentes às culturas lácteas: produção de diacetil, atividade proteolítica, perfil em leite tornassolado e atividade proteolítica.

### 4.5.1 Seleção das culturas de *Enterococcus*

A avaliação das propriedades tecnológicas foi realizada com 45 culturas de *Enterococcus*, com o seguinte perfil: 27 culturas que não apresentaram nenhuma característica fenotípica ou genotípica de virulência, todas caracterizadas como *E. faecium*; 12 culturas que apresentaram três ou mais fatores genotípicos e fenotípicos de virulência, caracterizadas como *E. faecium* (10) e *E. faecalis* (2) e 6 culturas que apresentaram três ou mais fatores genotípicos de virulência, mas não obtiveram expressão fenotípica de virulência, caracterizadas como *E. faecium* (5) e *E. faecalis* (1).

### 4.5.2 Atividade proteolítica

A avaliação da hidrólise das proteínas do leite foi realizada em ágar para contagem padrão (PCA, Difco, Sparks, EUA) acrescido de 1% de leite desnatado reconstituído. As culturas reativadas em caldo MRS (35° C por 18 a 24 horas) foram estriadas no em placas deste meio e incubadas a 35 °C por 72 horas. A confirmação do resultado positivo foi obtida pela formação de um halo translúcido ao redor das colônias após a adição de 0,2 ml de ácido acético a 10% por 1 minuto. A cepa de *Bacillus cereus* NCTC 1143 foi utilizada como controle positivo (HARTMAN et al., 2001).

### 4.5.3 Atividade lipolítica

A detecção da atividade lipolítica foi realizada em ágar spirit blue (Difco, Sparks, EUA) suplemento de 3% de reagente lipase (Difco, Sparks, EUA). As culturas reativadas em caldo MRS (35° C por 18 a 24 horas) foram estriadas em placas deste meio e incubadas a 35 °C por 3 a 7 dias. Os resultados foram considerados positivos pela formação de um halo claro ao redor das colônias. A cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 6539 foi utilizada como controle positivo (ELSNER et al., 2000; HARRIGAN, 1998).

### 4.5.4 Perfil das culturas em leite tornassolado

O perfil em leite tornassolado foi realizado em Litmus Milk (Difco, Sparks, EUA). As culturas reativadas em caldo MRS (35° C por 18 a 24 horas) foram repicadas em tubos contendo 5 ml de Litmus Milk e incubadas a 35°C por até 14 dias. Utilizando-se um tubo não inoculado como controle negativo, a interpretação dos resultados foi realizada de acordo com a Tabela 7, conforme proposto por Harrigan (1998).

**Tabela 7** – Reações ocasionadas por culturas lácteas em leite tornassolado.

Alteração em Litmus Milk	Reação
Desenvolvimento de coloração rosa	Produção de ácido láctico através da fermentação da lactose.
Coagulação e desenvolvimento de coloração rosa	Consumo de lactose com consequente produção de ácido láctico suficiente para coagular o leite.
Coagulação e desenvolvimento de coloração azul	Coagulação resultante da ação de enzimas proteolíticas que atuam sobre a caseína.
Clareamento e perda de opacidade do meio	Hidrólise da caseína como resultado da atividade de enzimas proteolíticas, resultando na produção de amônia.
Desenvolvimento de coloração azul escuro	Utilização do citrato resultando na produção de reação alcalina.

**Fonte:** adaptado de Harrigan (1998).

#### 4.5.5 Avaliação da produção de diacetil

A avaliação da produção de diacetil pelas estripes de *Enterococcus* avaliadas foi adaptada do método de Barrit (1936) citado por Harrigan (1998). Em tubos de ensaio estéreis foram adicionados 1 ml de álcool etílico (96%), 0,2 ml de NaOH (40%), 0,6 ml de  $\alpha$ -naftol em solução alcoólica (5%) e 2,5 ml de cultura reativada em caldo BHI (35° C por 18 a 24 horas). As culturas foram incubadas a 35 °C por até 120 minutos, considerando-se como resultado positivo, o desenvolvimento de coloração vermelha na superfície do meio. A cepa comercial de *Lactobacillus helveticus* (Ezal®) foi utilizada como controle positivo e a cultura mista de *Lactococcus lactis* e *Lactococcus cremoris* (R-704, CHR Hansen®), foi utilizada como controle negativo.

#### 4.6 Avaliação do espectro de atividade antimicrobiana de isolados não patogênicos

O espectro de atividade antimicrobiana foi avaliado para dez culturas de *Enterococcus faecium* que não apresentaram nenhuma determinante de virulência, representando um isolado de cada amostra de queijo e selecionado aleatoriamente, foram testadas contra seis culturas patogênicas relacionadas à contaminação de produtos lácteos.

As culturas patogênicas foram: *Bacillus cereus* R1-132, *Bacillus cereus* E1-048, *Listeria monocytogenes* E1-007, *Listeria monocytogenes* C1-030, *Staphylococcus aureus* E1-090 (isoladas de produtos lácteos, pertencentes a Coleção de Culturas do Laboratório de Higiene do DTA-FEA/ UNICAMP) e *Staphylococcus aureus* ATCC 6539.

A sensibilidade das culturas patogênicas aos *Enterococcus* foi avaliada utilizando-se o método de difusão em ágar proposto por Nascimento et al. (2010). As culturas patogênicas reativadas em caldo BHI (a 35 °C por 18 a 24 h) (GONZALEZ et al., 2007). As culturas de *B. cereus* e *S. aureus* foram inoculadas

na proporção de 1% (0,2 ml) em ágar tripticase de soja (TSA, Difco, Sparks, EUA) semi-sólido (0,9% de ágar), adicionado de 2% de  $\beta$ -glicerofosfato de sódio (Merck, Darmstadt, Alemanha) e, para as culturas de *L. momocytogenes*, inoculou-se a mesma proporção de cultura, no mesmo meio de cultura suplementado com 0,6% de extrato de levedura. Nas placas contendo os ágares inoculados foram feitos até cinco orifícios de 5 mm de diâmetro, aos quais foram adicionadas alíquotas de 50  $\mu$ l dos sobrenadantes das culturas de enterococos. Os sobrenadantes das culturas de enterococos reativadas em caldo MRS (35 °C por 18 a 24h) foram obtidos por centrifugação a 7500 xg /15 minutos a 4°C (Centrífuga J2-21 Beckman, Palo Alto, EUA). Após a centrifugação os sobrenadantes tiveram seu pH corrigido para 6,5 com NaOH 1 M (Merck, Darmstadt, Alemanha), para então serem centrifugados em membrana de 0,22  $\mu$ M (TPP, Su). As placas foram incubadas a 35 °C por 24 h e a leitura dos halos de inibição foi realizada com o auxílio de uma régua, sendo obtida a média dos halos de inibição, dos ensaios realizados em triplicata.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Identificação das espécies de *Enterococcus* spp

Entre os 150 isolados caracterizados bioquimicamente para o gênero enterococos, através da técnica molecular da PCR, identificou-se a presença de 90,0% (135/150) *E. faecium*, 2,7% (4/150) *E. faecalis* e 7,3% (11/150) não identificadas para os *primers* disponíveis. A Figura 3 ilustra o perfil da eletroforese obtido com os produtos da PCR específicos para identificar as espécies *E. faecium* e *E. faecalis*.

Em relação às amostras de queijos de coalho avaliadas (Figura 4) foi possível verificar a distribuição da espécie *E. faecalis* em 4 das 14 amostras de queijos, com 3 isolados provenientes de queijos da região do Vale do Jaguaribe e 1 isolado proveniente dos Sertões Cearenses. Em 5 amostras de queijos de coalho foi caracterizada apenas a espécie *E. faecium* para todos os isolados, sendo 1 das amostras proveniente da Região dos Sertões Cearenses.

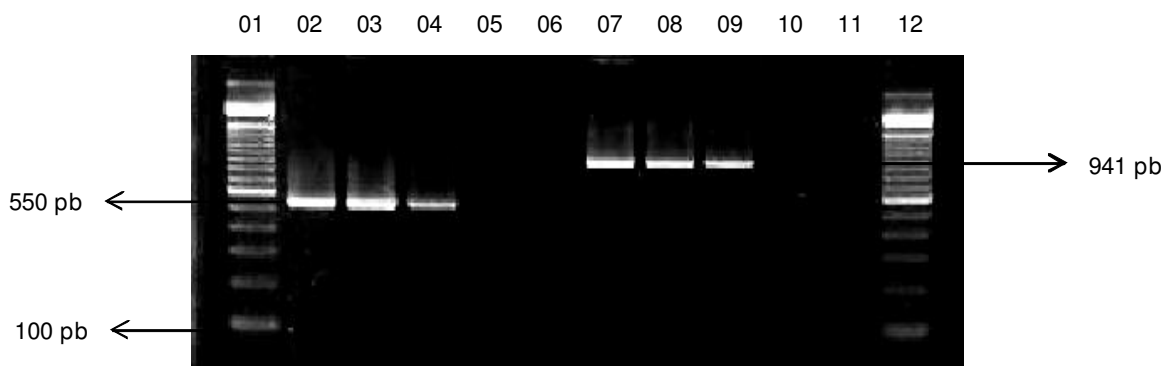
A predominância da espécie *E. faecium* entre enterococos isolados de diversos tipos de queijos também foi verificada em outro estudos, onde constatou-se a presença dessa espécie em mais de 60 % dos isolados (ANDRADE, 2009; FERNANDES, 2010; GOMES et al., PERRI, 2010).

Em queijos de coalho, Perri (2010) observou a presença de 84,0% (136/162) de *E. faecium*, 0,6% (1/162) de *E. faecalis* e 15,4% (25/162) pertencentes a outras espécies do gênero *Enterococcus* spp. Resultados similares foram obtidos por Andrade (2009), que isolou *Enterococcus* spp em amostras de queijos da Serra da Canastra, onde foi identificada a presença de 82,3% (121/147) *E. faecium*, nenhum isolado de *E. faecalis* e 17,7% (26/147) de *Enterococcus* sp.

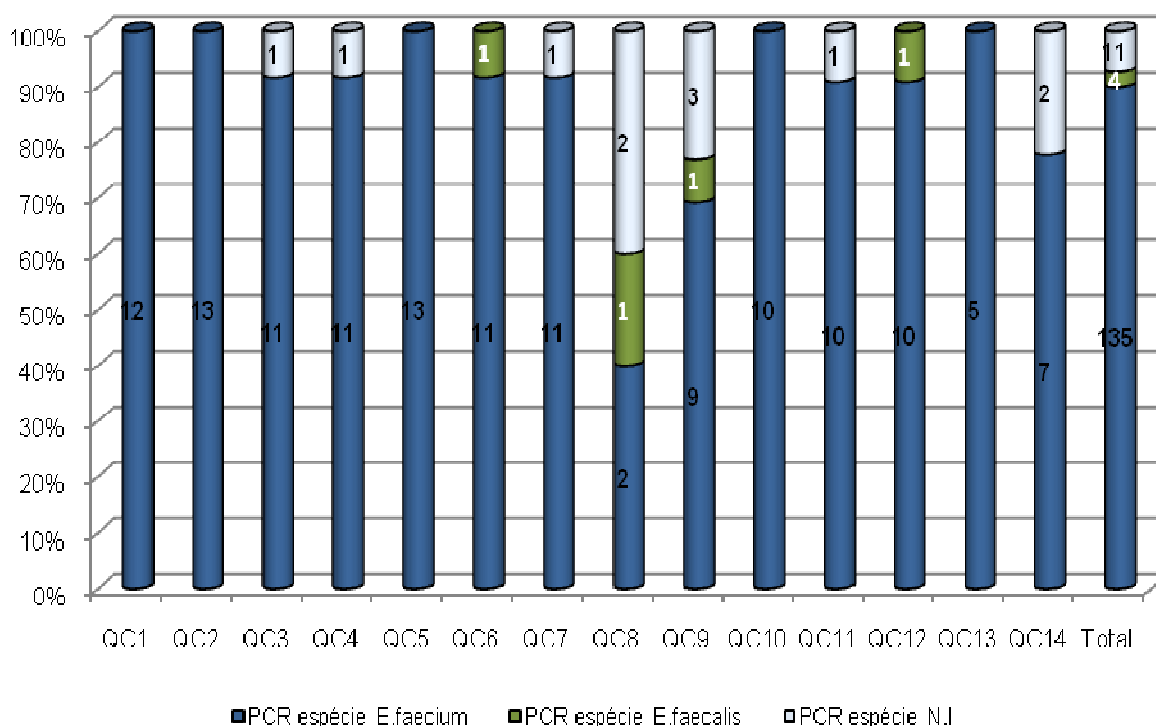
Em outros estudos realizados por Fernandes (2010), que isolou enterococos de ricota e por Gomes et al. (2008), que isolaram enterococos de

diversos tipos de queijos, apesar da predominância da espécie *E. faecium*, observou-se maior incidência da espécie *E. faecalis* que foi identificada em 20,6% (28/136) e 28,3% (41/145) dos isolados de *Enterococcus* spp, respectivamente.

A predominância da espécie *E. faecium* nos queijos de coalho, pode ser um fator indicativo de resistência desta espécie a condições de estresse. Estas condições são desenvolvidas ao longo do processamento, e podem acarretar na morte da população sensível e seleção da população resistente. Os principais fatores que influenciam nesta seleção são: higiene de equipamentos, ambiente e manipuladores, tratamento térmico, variação do pH e adição de sal (FRANZ e HOLZAPFEL, 2006; GIRAFFA, 2002). Assim, diante dos fatores apontados acredita-se na maior resistência da espécie *E. faecium* comparada às demais espécies de *Enterococcus* sp presentes em queijos.



**Figura 3** – Foto do gel de agarose para a identificação das espécies por PCR. 01 e 12) Marcador 100 bp; 02) *E. faecium* ATCC 6569; 03) Isolado 138: *E. faecium* ; 04) isolado 139: *E. faecium*; 05) controle negativo para *E. faecium*: sem DNA ; 06) isolado não identificado como *E. faecium*; 07) *E. faecalis* ATCC 7080; 08) Isolado 64: *E. faecalis*; 09) Isolado 87: *E. faecalis*; 10) controle negativo para *E. faecalis*: sem DNA; 11) isolado não identificado para *E. faecalis*.



**Figura 4** - Distribuição das espécies dos 150 isolados de *Enterococcus* das amostras de queijo de coalho.

Ao se comparar a identificação das espécies pelo teste bioquímico do sistema API 20 STREP, realizado por Carvalho (2007) com a técnica molecular da PCR, observou-se uma discordância de 25,8% para 31 isolados avaliados pelos dois métodos, conforme demonstrado na Tabela 8. Foi verificado que de 5 isolados caracterizados como *E. faecium* por PCR, 3 foram caracterizados como *E. faecalis* e 2 como *E. durans* no sistema API. Dois isolados caracterizados como *E. faecalis* por PCR, foram caracterizados como *E. faecium* no sistema API e um isolado caracterizado como *E. faecalis* neste método, não foi caracterizado para esta espécie por PCR.

Em relação à avaliação dos isolados da Região dos Sertões Cearenses e do Vale do Jaguaribe 33,3% (2/6) e 24,0% (6/25) apresentaram resultados discordantes respectivamente. Nos isolados caracterizados para a mesma espécie pelas duas técnicas utilizadas, 91,3% (21/23) pertenciam à espécie *E. faecium* e 8,7 % (2/23) a espécie *E. faecalis*.

Resultados discordantes entre o método bioquímico no sistema API 20 STREP e a técnica molecular da PCR, com amplificação de fragmentos dos genes  $ddl_{E.faecium}$  e  $ddl_{E.faecalis}$ , com *primers* estabelecidos por Dutka-Malen et al. (1995) também foram observados em outros estudos.

Gomes et al. (2007) comparam as duas técnicas na identificação de 52 isolados provenientes de diversos alimentos, encontrando discordância na identificação de 78,9 % (41/52) dos isolados. Já Velasco et al. (2004) obteve 8,9% (11/123) de discordância entre os dois métodos utilizados na identificação de isolados de origem clínica.

Winston et al. (2004) compararam o método API 20 STREP, com o método de identificação molecular de enterococos por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) para 46 isolados clínicos de enterococos resistentes a vancomicina. Entre os 46 isolados identificados molecularmente como *E. faecium*, 91,3% (42/46) foram discordantes pelo sistema API 20 STREP.

A identificação fenotípica das espécies de enterococos pelo sistema API 20 STREP baseia-se na diferenciação de 20 provas bioquímicas proporcionadas pela atividade enzimática dos *Streptococcus* spp e *Enterococcus* spp (TILLOTSON, 1981; WINSTON et al., 2004). De acordo com os estudos abordados, a identificação por este sistema não é efetiva para se diferenciar espécies de *Enterococcus* sp que não sejam *E. faecalis*, uma vez que as espécies de enterococos em geral apresentam características fenotípicas bastantes similares (GOMES et al., 2007; VELASCO et al., 2004; WINSTON et al., 2004).

Assim, os métodos de identificação fenotípica de enterococos devem ser sempre complementados por métodos genotípicos de identificação molecular como a amplificação de fragmentos específicos por PCR, seqüenciamento da região do RNAr 16s, métodos de hibridização, *fingerprint*, como o PFGE, entre outros (DOMIG, MAYER e KNEIFEL, 2003).



**Tabela 8** - Comparação da Identificação das espécies do gênero *Enterococcus* pelas análises de fermentação de carboidratos (API20) e amplificação de genes por PCR.

Região	Queijo	Número do isolado	API <sup>a</sup>	PCR
Sertões Cearences	<b>QC7</b>	<b>75<sup>b</sup></b>	<b><i>E. faecalis</i></b>	<b><i>E. faecium</i></b>
	QC7	81	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
	QC7	83	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
	QC8	87	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
Vale do Jaguaribe	<b>QC8</b>	<b>88<sup>b</sup></b>	<b><i>E. faecium</i></b>	<b><i>E. faecalis</i></b>
	QC13	137	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
	QC1	10	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
	<b>QC4</b>	<b>39<sup>b</sup></b>	<b><i>E. faecalis</i></b>	<b><i>E. faecium</i></b>
	QC6	63	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
	QC6	74	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
	QC9	92	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
	<b>QC9</b>	<b>93<sup>b</sup></b>	<b><i>E. faecalis</i></b>	<sup>c</sup>
	QC9	94	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
	<b>QC9</b>	<b>95<sup>b</sup></b>	<b><i>E. durans</i></b>	<b><i>E. faecium</i></b>
	QC9	100	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
	<b>QC9</b>	<b>102<sup>b</sup></b>	<b><i>E. faecium</i></b>	<b><i>E. faecalis</i></b>
	QC9	103	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
	QC9	104	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
	<b>QC10</b>	<b>105<sup>b</sup></b>	<b><i>E. faecalis</i></b>	<b><i>E. faecium</i></b>
	QC10	106	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
	<b>QC10</b>	<b>111<sup>b</sup></b>	<b><i>E. durans</i></b>	<b><i>E. faecium</i></b>
	QC11	116	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
	QC11	117	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
	QC11	119	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>
QC11	121	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	
QC11	123	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	
QC11	124	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	
QC12	128	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	
QC12	130	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	
QC14	143	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	
QC14	146	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	

<sup>a</sup> Isolados que foram caracterizados para espécie pelo sistema API 20 STREP por Carvalho (2007).

<sup>b</sup> Isolados com resultados diferentes para a identificação das espécies pelos métodos API e PCR.

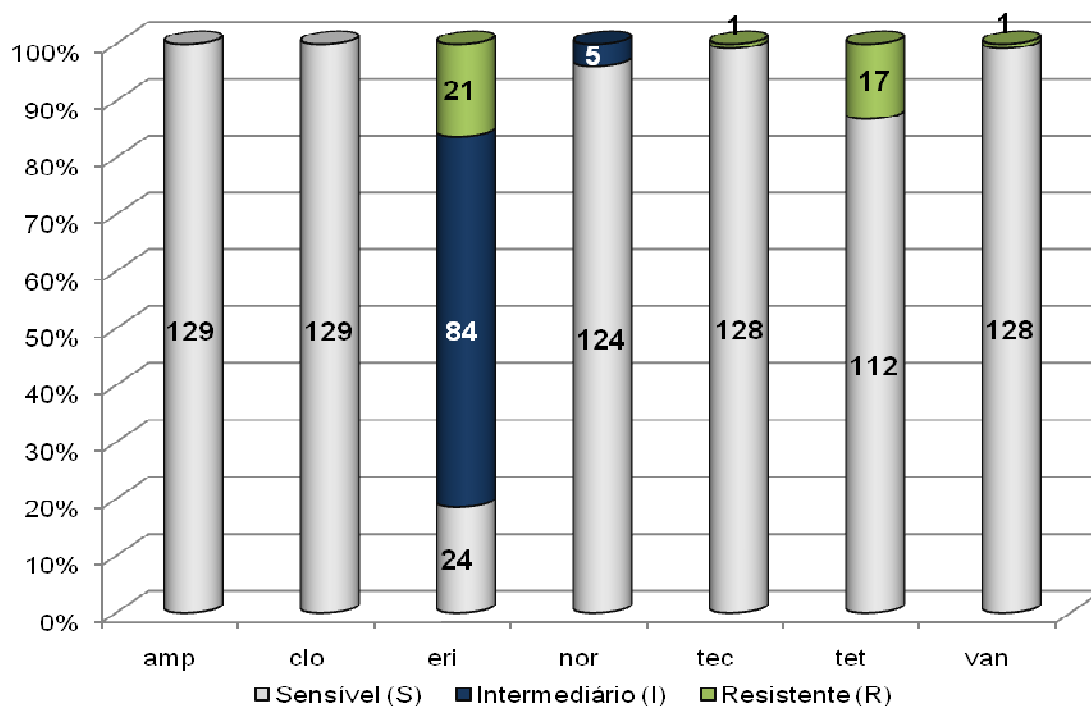
<sup>c</sup> Espécie não identificada para *primers* de *E. faecium* e *E. faecalis*.

## 5.2 Avaliação da resistência a antibióticos

Dentre os 150 isolados de enterococos avaliados neste estudo, foi possível verificar o perfil de resistência a antibióticos de 129 isolados, uma vez que não houve crescimento dos demais 21 isolados em ágar Mueller-Hinton (recomendado pelo método estabelecido pelo NCCLS, 2003). Os 129 isolados de enterococos avaliados foram previamente caracterizados por PCR como *E. faecium* (114), *E. faecalis* (4) e *Enterococcus* spp (11).

A resistência dos isolados de enterococos pelo método de disco-difusão foi observada para quatro dos sete antibióticos avaliados. De acordo com o perfil de resistência demonstrado na Figura 5, os isolados avaliados apresentaram resistência aos seguintes antibióticos: 16,3% (21/129) a eritromicina, 13,2% (17/129) a tetraciclina, 0,8% (1/129) a teicoplanina e vancomicina. Resistência intermediária foi observada para os antibióticos eritromicina e norfloxacina em 65,1% (84/129) e 3,9% (5/129) dos isolados, respectivamente.

Para os isolados de *E. faecium* 17,5% (20/114) foram resistentes a eritromicina, 10,5% (12/114) a tetraciclina e 0,9% (1/114) a teicoplanina e a vancomicina. Para os isolados de *E. faecalis*, 75 % (3/4) foram resistentes a tetraciclina. Entre os demais isolados de *Enterococcus* spp 18,2% (2/11) e 9,1% (1/11), apresentaram resistência a eritromicina e tetraciclina respectivamente.



**Figura 5** - Perfil de resistência dos 129 isolados de enterococos avaliados pelo teste de disco-difusão. Antibióticos: ampicilina (amp), cloranfenicol (clo), eritromicina (eri), norfloxacin (nor), teicoplanina (tec), tetraciclina (tet), vancomicina (van).

Em relação à região de produção dos queijos de coalho, na Tabela 9 verificou-se que todas as amostras de queijos apresentaram enterococos com perfil intermediário de resistência para o antibiótico eritromicina, porém, apenas os isolados de queijos de coalho da região do Vale do Jaguaribe foram resistentes a este antibiótico.

A resistência à tetraciclina pode ser observada em 66,7% (2/3) e 37,4% (4/11) isolados de queijos das regiões dos Sertões Cearenses e Vale do Jaguaribe respectivamente. Os únicos isolados que apresentaram resistência à vancomicina e a teicoplanina são originários da amostra QC5, proveniente da região do Vale do Jaguaribe.

**Tabela 9** - Perfil de isolados resistentes e intermediariamente resistentes nas amostras de queijos de coalho.

Queijo	Antibiótico									
	eritromicina		norfloxacina		teicoplanina		tetraciclina		vancomicina	
	I (%) <sup>a</sup>	R (%) <sup>a</sup>	I (%) <sup>a</sup>	R (%) <sup>a</sup>	I (%) <sup>a</sup>	R (%) <sup>a</sup>	I (%) <sup>a</sup>	R (%) <sup>a</sup>	I (%) <sup>a</sup>	R (%) <sup>a</sup>
<b>Vale do Jaguaribe</b>										
QC1	11 (91,7)	1 (8,3)	3 (25)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
QC2	2 (15,4)	2 (15,4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
QC3	5 (41,7)	5 (41,7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
QC4	4 (36,4)	5 (45,5)	1 (9,1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
QC5	8 (80,0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (10,0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (10,0)
QC6	9 (75,0)	2 (16,7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (41,7)	0 (0)	0 (0)
QC9	5 (55,6)	1 (11,1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (22,2)	0 (0)	0 (0)
QC10	5 (83,3)	1 (16,7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
QC11	7 (77,8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
QC12	5 (62,5)	3 (37,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (12,5)	0 (0)	0 (0)
QC14	4 (66,7)	1 (16,7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (16,7)	0 (0)	0 (0)
<b>Sertões Cearenses</b>										
QC7	11 (100)	0 (0)	1 (9,1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	7 (63,6)	0 (0)	0 (0)
QC8	5 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (20,0)	0 (0)	0 (0)
QC13	3 (60,0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

<sup>a</sup> Total de isolados com perfil de resistência intermediária (I) e resistente (R) relacionados com o percentual de isolados avaliados em cada amostra de queijo entre parênteses.

Os resultados apresentados apontam a eritromicina como o antibiótico com maior perfil de resistência entre os antibióticos testados, para o qual apenas 18,6% (24/129) dos isolados foram sensíveis a mesma.

Outros estudos realizados com enterococos de origem alimentar apontam tanto a eritromicina quanto a tetraciclina como os antibióticos menos eficazes no tratamento contra enterococos. Togay et al. (2010) observaram resistência

respectivamente de 14% e 32% para a eritromicina e tetraciclina entre 84 isolados de enterococos obtidos de queijos, embutidos e azeitonas na Turquia.

Por sua vez Nam et al. (2009) relataram a resistência tanto a eritromicina quanto a tetraciclina em mais de 50% dos isolados provenientes de leites de vacas com quadro clínico de mastite. Kasimoglu-Dogru e Ayas (2010) relataram a incidência de resistência a estes dois antibióticos em todos os 83 isolados de enterococos avaliados, provenientes de carne de frangos.

A resistência aos antibióticos eritromicina e tetraciclina pode ser justificada através da associação do uso intensivo destes na criação animal, especialmente de gado leiteiro, onde são amplamente utilizados no tratamento da mastite (ANDREOTTI; NICODEMO, 2004). O uso indiscriminado destes antibióticos acarreta na seleção de cepas que possuem genes codificadores que conferem mecanismos de resistência a diversas classes de antibióticos (FRANZ; HOLZAPFEL, 2006; GIRAFFA, 2002).

Um dos principais problemas da resistência a antibióticos adquirida por enterococos está relacionado à capacidade de transferência desta resistência a micro-organismos conhecidamente patogênicos, como *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* via feromônios mediadores, plasmídeos conjugativos ou transposons. Esta capacidade de transferência e aquisição de resistência facilita a seleção destes micro-organismos nos produtos, podendo acarretar na maior incidência de patogenias relacionadas aos mesmos (FRANZ e HOLZAPFEL, 2006; GIRAFFA, 2002).

Apesar da incidência de resistência a quatro dos sete antibióticos avaliados, observou-se múltipla resistência em apenas um *E. faecium* nos 129 enterococos avaliados, o qual apresentou resistência tanto à tetraciclina quanto à eritromicina.

Resultados similares foram obtidos por Mannu et al. (2003) que observaram susceptibilidade de enterococos isolados de produtos lácteos a praticamente todos

os antimicrobianos avaliados, com resistência múltipla observada apenas para isolados de origem clínica.

Estes resultados são controversos aos observados por Fernandes (2010), que observou resistência a múltiplos antibióticos em todos os isolados de enterococos provenientes do processamento de ricota. Nan et al (2010) também observaram na maior parte dos isolados de enterococos provenientes de leites de vacas com mastite, foram resistentes a pelo menos dois ou três antibióticos.

Os antibióticos ampicilina e cloranfenicol demonstraram-se efetivos no tratamento contra todos enterococos avaliados neste estudo. A efetividade da ampicilina no tratamento contra enterococos também foi observada por Mannu et al. (2003) e Nan et al.(2010) em isolados de origem láctea.

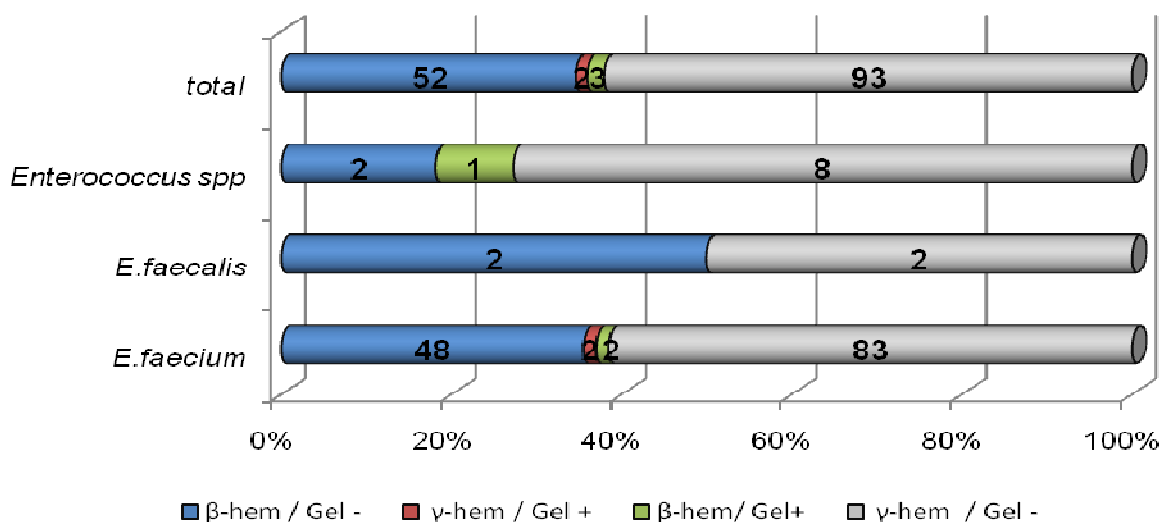
Os resultados de susceptibilidade a antimicrobianos dos isolados de enterococos provenientes de queijos de coalho indicam relativa similaridade com outros estudos realizados com isolados de origem láctea. Embora a múltipla resistência e a resistência a vancomicina tenham sido observadas para apenas um isolado de *E. faecium* cada, é importante salientar que esta resistência pode ser adquirida pelas culturas e que associadas a outros fatores de virulência podem tornar-se um fator indicativo da prevalência de culturas patogênicas de enterococos.

### 5.3 Fatores fenotípicos de virulência

O perfil de expressão fenotípica de virulência dos isolados de enterococos apresentados na Figura 6 revela que 38,0% (57/150) dos isolados apresentaram atividade  $\beta$ -hemolítica ou gelatinase positiva. A atividade  $\beta$ -hemolítica foi observada em 36,7% (55/150) dos isolados, sendo 36,3% (49/135) dos *E. faecium* e 50,0% (2/4) dos *E. faecalis*. A atividade gelatinase positiva foi observada em 3,3% (5/150) dos isolados, sendo quatro isolados caracterizados como *E. faecium* e um isolado como *Enterococcus* spp. Três isolados apresentaram simultaneamente atividade  $\beta$ -hemolítica e gelatinase sendo 1,5% (2/135) dos isolados de *E. faecium* e 9,1% (1/11) dos isolados de *Enterococcus* spp.

Ao se analisar os perfis de expressão fenotípica de virulência nas 14 amostras de queijos de coalho apresentados na Tabela 10 observaram-se a presença de isolados com atividade  $\beta$ -hemolítica ou gelatinase positiva em todas as amostras de queijo. Os resultados do teste de atividade  $\beta$ -hemolítica merecem destaque, pois se observou positividade para 92,9% (13/14) das amostras de queijo.

A distribuição das atividades fenotípicas de virulência demonstra que as três culturas que apresentaram simultaneamente as atividades gelatinase e  $\beta$ -hemólise foram isoladas das amostras de queijo QC5 e QC7, provenientes, respectivamente, das regiões do Vale do Jaguaribe e Sertões Cearenses. Nestas amostras também destaca-se a incidência de atividade  $\beta$ -hemolítica em 92,3% (12/13), 75 % (9/12) dos isolados dos queijos QC5 e QC7, respectivamente.



**Figura 6** - Perfil de expressão fenotípica das espécies de enterococos isoladas das amostras de queijos de coalho.

**Tabela 10** – Relação dos perfis de expressão fenotípica dos isolados de cada amostra de queijo de coalho provenientes das regiões do Vale do Jaguaribe e Sertões Cearenses

Queijo	Total (%) <sup>a</sup>	Atividade hemolítica	Gelatinase
<b>Vale do Jaguaribe</b>			
QC1	2 (16,7)	β	-
QC2	1 (7,7)	γ	+
QC3	1 (8,3)	β	-
QC4	5 (41,7)	β	-
QC5	10 (76,9)	β	-
	2 (15,4)	β	+
QC6	5 (41,7)	β	-
QC9	5 (38,5)	β	-
QC10	1 (10,0)	β	-
QC11	4 (36,4)	β	-
QC12	3 (27,3)	β	-
QC14	3 (33,3)	β	-
<b>Sertões Cearenses</b>			
QC7	8 (66,7)	β	-
	1 (8,3)	γ	+
	1 (8,3)	β	+
QC8	1 (20,0)	β	-
QC13	4 (80,0)	β	-

a) Total de isolados que apresentaram o perfil fenotípico positivo ou negativo de hemolisina e gelatinase e percentual (%) em relação ao total de isolados por amostra de queijo.



A gelatinase e a  $\beta$ -hemólise são determinantes fenotípicos de virulência comumente observadas em enterococos, por estarem relacionadas com o desenvolvimento de processos infecciosos em pacientes imunodeprimidos (FRANZ; HOLZAPFEL, 2006).

A gelatinase está relacionada à hidrólise de uma série de peptídeos biológicos, sendo responsável pelo aumento da patogenicidade em modelos animais. Já a atividade  $\beta$ -hemolítica está geralmente relacionada à citolisina que se trata de uma toxina capaz de aumentar a virulência através da evasão da resposta imune do hospedeiro (FRANZ; HOLZAPFEL, 2006).

A expressão fenotípica da gelatinase e  $\beta$ -hemólise são fatores de virulência mais frequentemente associados a isolados de origem clínica, porém, alguns estudos também evidenciaram estes fatores associados a isolados de origem alimentar. Eaton e Gasson (2001) observaram a presença dos genes de virulência *cyl* e *geE*, geralmente relacionados, respectivamente, a  $\beta$ -hemólise e a gelatinase para isolados de diversos tipos de alimentos, com expressão desses fatores para os isolados de *E. faecalis*.

Semedo et al. (2003a), observaram atividade  $\beta$ -hemolítica em 6% (6/96) dos isolados de origem alimentar, e a presença dos genes de *cyl* em 70% desses isolados. Já Fernandes (2010) verificou a presença de atividade  $\beta$ -hemolítica para 89,4 % (59/66) e nenhuma atividade gelatinase dos isolados de enterococos provenientes do processamento de ricota.

De acordo com Franz e Holzapfel (2006) *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* são as espécies mais frequentemente associadas, respectivamente, à bacteremia e infecções hospitalares, mas a expressão dos fatores virulência está predominantemente relacionada aos *E. faecalis*. O presente estudo confirma a predominância da atividade  $\beta$ -hemolítica para os isolados de *E. faecalis*, porém, a atividade gelatinase foi observada apenas para os *E. faecium*.

A presença dos fatores fenotípicos de virulência nos isolados de *E. faecium* avaliados pode estar relacionada à capacidade dos enterococos de transferirem e adquirirem determinantes de virulência por conjugação natural dos plasmídeos (EATON; GASSON, 2001). Este também pode ser um indicativo da maior incidência de fatores de virulência recentemente associados a isolados de origem clínica em isolados de origem alimentar, especialmente os de origem láctea.

Os resultados deste estudo tornam-se especialmente preocupantes em relação à atividade  $\beta$ -hemolítica uma vez que a maior parte da expressão deste fenótipo está relacionada a infecções parenterais que representam o principal fator de risco associado à morte por enterococos de origem clínica (FRANZ; HOLZAPFEL, 2006).

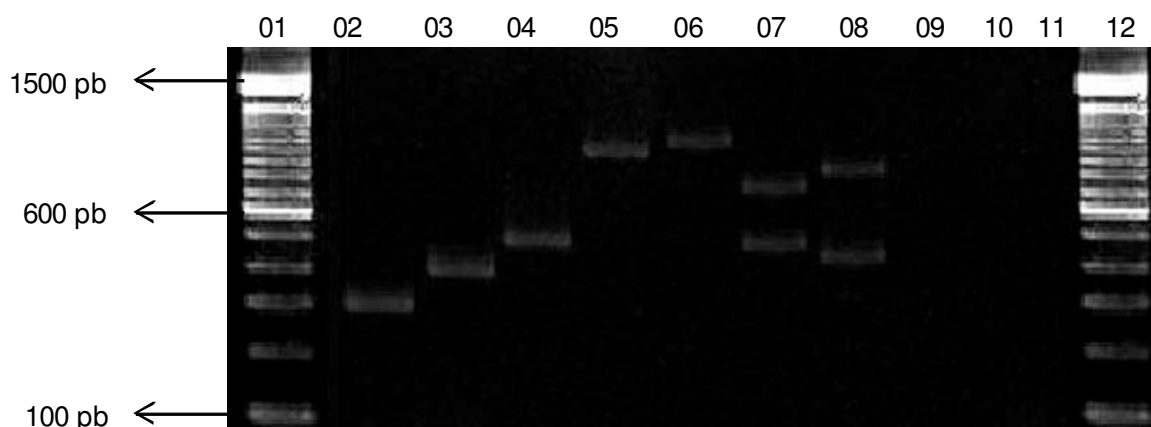
#### 5.4 Fatores genotípicos de virulência

Os fatores genotípicos de virulência: adesinas de colágeno (*ace*), substâncias de agregação (*as*), citolisinas (*cylA*, B e M), adesinas de parede celular (*efaA*), proteínas de superfície (*esp*), gelatinase (*gelE*) e resistência a vancomicina (*vanA*) foram analisados nos 150 isolados de enterococos, caracterizados como *E. faecium* (135), *E. faecalis* (4) e *Enterococcus* spp (11). O perfil da eletroforese dos fragmentos dos genes obtidos por PCR das cepas utilizadas como controle positivo é apresentado na Figura 7.

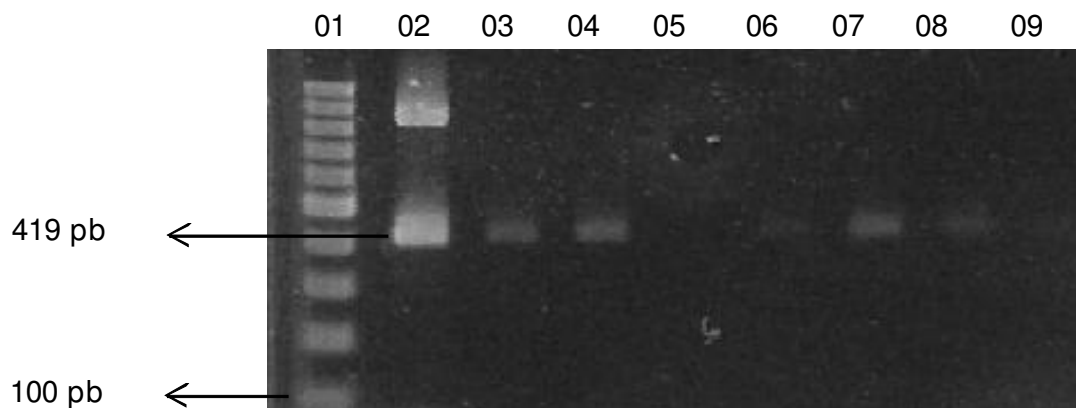
Na PCR dos genes de virulência avaliados, observou-se na eletroforese de alguns isolados, a formação de bandas de mesmo tamanho que os controles positivos com os seguintes perfis: bandas nítidas e bandas pouco nítidas, sendo consideradas, respectivamente, positivas e duvidosas para os genes avaliados.

Na Figura 8, observa-se um perfil de eletroforese com bandas consideradas nítidas, pouco nítidas e negativas para a multiplex PCR dos genes

*geE* e *cyB*. Observa-se nas canaletas 03, 04 e 07 a presença das bandas nítidas e menos espessas que o controle positivo para o gene *geE*, consideradas positivas para este gene. Nas canaletas 06 e 08, observa-se a presença de bandas de mesmo tamanho que o fragmento do gene *geE*, porém, com pouca nitidez, por tanto consideradas duvidosas. Já nas canaletas 05 e 09 não foi observada a formação de bandas para nenhum dos genes avaliados.



**Figura 7** – Foto da eletroforese do gel de agarose para a identificação dos genes de virulência por PCR. 01 e 12) marcador 100 pb; 02) *E. faecalis* 341: *ace*<sup>+</sup>; 03) *E. faecalis* 574: *as*<sup>+</sup>; 04) *E. faecalis* 341: *efaA*<sup>+</sup>; 05) *E. faecalis* 594: *esp*<sup>+</sup>; 06) *E. faecium* 329/99: *vanA*<sup>+</sup>; 07) Multiplex PCR de *E. faecalis* ATCC 29212: *cyIA*<sup>+</sup>, *cyM*<sup>+</sup>; 08) Multiplex PCR de *E. faecalis* ATCC 29212: *geE*<sup>+</sup>, *cyB*<sup>+</sup>; 09, 10 e 11) canaletas livres, sem DNA.



**Figura 8** – Foto da eletroforese do gel de agarose da multiplex PCR para a identificação dos genes *geE* e *cyB*. 01) Marcador 100 pb. 02) *E. faecalis* ATCC 29212: controle positivo para *cyB* e *geE*. 03, 04 e 07) Isolados de *E. faecium* que demonstraram perfil de bandas consideradas nítidas para o gene *geE*; 06 e 08) Isolados de *E. faecium* que demonstraram perfil de bandas pouco nítidas para o gene *geE*; 05) e 09) Isolados de *E. faecium* considerados negativos para os genes *cyB* e *geE*.

A distribuição dos genes de virulência nas espécies disposta na Tabela 11 revela que para quase todos os genes avaliados, observou-se a incidência de bandas pouco nítidas, com exceção do gene *as*, no qual todos os isolados avaliados foram considerados negativos.

Os genes, *cyIA*, *cyIM* e *geIE* foram os únicos genes que apresentaram perfil de bandas pouco nítidas superior ao perfil de bandas nítidas, sendo para o gene *geIE* observada a incidência de bandas pouco nítidas para 28% (42/150) dos isolados de enterococos avaliados.

A maior incidência de bandas pouco nítidas foi observada para os isolados de *E. faecium* e *Enterococcus* spp, nos quais 7 e 5 dos 9 genes avaliados, respectivamente, apresentaram isolados com bandas neste perfil. Para os isolados de *E. faecalis* apenas um isolado apresentou a formação de banda pouco nítida para o gene *ace*.

A formação de bandas com pouca nitidez no gel de agarose pode ser influenciada por uma série de fatores que condicionam a técnica da PCR. Estes fatores podem estar relacionados à concentração dos reagentes utilizados na PCR, concentração e pureza do DNA, temperaturas e quantidades de ciclos utilizados na reação, e pelos *primers* utilizados para se amplificar a sequência desejada (MADIGAN et al, 2008; MATIOLI; PASSOS-BUENO, 2001).

De acordo com Matioli e Passos-Bueno (2001) os principais fatores que podem influenciar na PCR são as concentrações de DNA e  $MgCl_2$ , temperatura de anelamento e sequências dos *primers* utilizados. Observa-se que as sequências dos *primers* utilizados neste estudo para se avaliar os genes de virulência foram desenhadas baseadas em sequências únicas de *E. faecalis* (EATON; GASSON, 2001; HEATON et al., 1996; MANNU et al., 2003; NALLAPAREDDY et al., 2000).

Quando os *primers* são desenhados a partir de uma única sequência, regiões do gene consideradas variáveis entre sequências de diversos organismos podem ser inseridas nas sequências destes *primers*. Assim, as regiões não variáveis podem não hibridizar ou hibridizar parcialmente no DNA de outros micro-

organismos que possam conter os genes, acarretando na amplificação de pouco ou nenhum produto do gene avaliado (MADIGAN et al, 2008; MATIOLI; PASSOS-BUENO, 2001).

Por tanto, uma hipótese para o aparecimento de bandas pouco nítidas pode estar relacionada aos *primers*, uma vez que estes foram desenhados a partir de sequências de *E. faecalis* e a maior parte dos micro-organismos que apresentaram este problema são *E. faecium* e outros *Enterococcus* spp.

Embora a hipótese relacionada aos *primers* utilizados na amplificação dos genes possa ser aceita, não se pode afirmar que os enterococos que apresentaram bandas pouco nítidas possuem os genes de virulência avaliados. Uma vez que esta amplificação possa estar relacionada a baixa especificidade destes *primers* aos reagentes da reação que geraram resultados “falso-positivos” (FANTINATTI; OLIVEIRA, 2008).

A presença de resultados falso-positivos ou geração de bandas pouco nítidas na PCR podem estar relacionadas a contaminações durante a manipulação da reação ou à geração de amplificação inespecífica (GORSKI; CSORDAS, 2010).

As contaminações do DNA e dos produtos utilizados na PCR são geradas durante a manipulação na PCR e podem ser controladas por cuidados na manipulação e confirmada pelo uso de controles negativos para cada reação, o que foi utilizado para este trabalho. A geração de bandas inespecíficas está relacionada à ligação involuntária dos *primers* entre si (formando dímeros) com outras sequências presentes na sequência, concentrações de *primers* e  $MgCl_2$  na reação. A formação de dímeros e ligação com outras partes da sequência podem ser inibidas pelo uso de *primers* mais específicos e de DNA polimerase “hotstart”. Os demais fatores estão relacionados a fatores de padronização de cada PCR, tempos muito prolongados de anelamento podem gerar bandas inespecíficas mas tempos muito curtos podem impedir que os *primers* se anelem nas sequências acarretando na geração de pouco produto.(GORSKI; CSORDAS, 2010).

Para se afirmar que os enterococos realmente possuem os genes, pode-se complementar a técnica da PCR com outras técnicas moleculares como a hidridização *southern blot* ou *dot blot*, ou com o sequenciamento da região amplificada (FARBER et al, 2001; MADIGAN et al, 2008). Por serem técnicas difíceis de padronizar ou onerosas, neste estudo optou-se por sequenciar os produtos da reação do gene *geIE* para alguns enterococos, por este ser o gene que mais frequentemente formou bandas pouco nítidas.

**Tabela 11** - Distribuição dos genes de virulência de *E.faecium*, *E.faecalis* e *Enterococcus* spp.

Espécie	Bandas <sup>b</sup>	<i>ace</i> <sup>a</sup>	<i>cyIA</i> <sup>a</sup>	<i>cyIB</i> <sup>a</sup>	<i>cyM</i> <sup>a</sup>	<i>efaA</i> <sup>a</sup>	<i>esp</i> <sup>a</sup>	<i>geIE</i> <sup>a</sup>	<i>vanA</i> <sup>a</sup>
<i>E.faecium</i>	+	13 (9,3)	1 (0,7)	4 (3,0)	1 (0,7)	22 (16,3)	22 (16,3)	19 (14,1)	4 (3,0)
	+/-	0 (0)	8 (5,9)	1 (0,7)	8 (5,9)	5 (3,7)	7 (5,2)	40 (29,6)	2 (1,5)
<b>Total</b>		<b>13 (9,3)</b>	<b>9 (6,6)</b>	<b>5 (3,7)</b>	<b>9 (6,6)</b>	<b>27 (20,0)</b>	<b>29 (21,5)</b>	<b>59 (43,7)</b>	<b>6 (4,5)</b>
<i>E.faecalis</i>	+	1 (25,0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (50,0)	4 (100)	1 (25,0)	0 (0)
	+/-	1 (25,0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Total</b>		<b>2 (50,0)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>4 (100)</b>	<b>1 (25,0)</b>	<b>0 (0)</b>
<i>Enterococcus</i> spp	+	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (9,1)	4 (36,4)	2 (18,2)	0 (0)
	+/-	1 (9,1)	1 (9,1)	0 (0)	1 (9,1)	2 (18,2)	0 (0)	2 (18,2)	0 (0)
<b>Total</b>		<b>1 (9,1)</b>	<b>1 (9,1)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>1 (9,1)</b>	<b>3 (27,3)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>4 (36,4)</b>	<b>0 (0)</b>
<b>Geral</b>	+	<b>14 (9,3)</b>	<b>1 (0,7)</b>	<b>4 (2,7)</b>	<b>1 (0,7)</b>	<b>25 (16,7)</b>	<b>30 (20,0)</b>	<b>22 (14,7)</b>	<b>4 (2,7)</b>
	+/-	<b>2 (1,3)</b>	<b>9 (6,0)</b>	<b>1 (0,7)</b>	<b>9 (6,0)</b>	<b>7 (4,7)</b>	<b>7 (4,7)</b>	<b>42 (28,0)</b>	<b>2 (1,3)</b>
<b>Total</b>		<b>16 (10,7)</b>	<b>10 (6,7)</b>	<b>5 (3,4)</b>	<b>10 (6,7)</b>	<b>32 (21,3)</b>	<b>37 (24,7)</b>	<b>64 (42,7)</b>	<b>6 (4,0)</b>

<sup>a</sup> Total de isolados que apresentaram o perfil de bandas e sua relação percentual, entre parênteses.

<sup>b</sup> Perfil de bandas com fragmento de mesmo tamanho do esperado para o gene avaliado, nítidas (+) e pouco nítidas (+/-)

Ao se analisar a distribuição apenas dos perfis de bandas nítidas disposto na Tabela 11, observa-se que para os isolados de *E. faecium* houve maior distribuição dos genes de virulência quando comparado aos isolados de *E. faecalis* ou *Enterococcus* spp. Para os três grupos das espécies de enterococos houve a incidência dos genes *efaA*, *esp* e *gelE*.

Para os isolados de *E. faecium* 16,3% (22/135) foram positivos para os genes *efaA* e *esp*, e 14,3% (19/135) para o gene *gelE*. Entre os isolados de *E. faecalis* 25%, 50% e 100% dos quatro isolados avaliados foram respectivamente positivos para os genes *gelE*, *efaA* e *esp*.

O gene *ace* foi positivo para 9,3% (14/150) dos isolados, distribuídos em 9,6% (13/135) dos *E. faecium* e 25,0% (1/4) dos *E. faecalis*. Os genes determinantes das citolisinas (*cyIA*, B e M) e da resistência a vancomicina (*vanA*), foram positivos apenas para isolados de *E. faecium*. Destes, 3,0% (4/135) apresentaram os genes *cyIB* e *vanA*, e apenas um isolado foi positivo para os genes *cyIA* e *cyIB*.

Os resultados detalhados referentes às determinantes de virulência apresentados no Apêndice A revelaram que dos 150 isolados avaliados, 54,0% (81) apresentaram resultados negativos para todas as determinantes genéticas de virulência avaliadas.

Nos 69 isolados que apresentaram determinantes genéticas de virulência com perfis de bandas nítidas ou pouco nítidas, observou-se a presença de múltiplas determinantes genéticas de virulência para 28,7% (43/150) dos isolados, conforme os perfis apresentados na Tabela 12.

Os múltiplos determinantes genotípicos de virulência foram observados em 27,4% (37/135) dos *E. faecium*, 75% (3/4) dos *E. faecalis* e 27,3% (3/11) dos *Enterococcus* spp. Destacam-se dois isolados de *E. faecium* que apresentaram simultaneamente 5 e 6 determinantes genotípicos de virulência. Para os isolados de *E. faecalis*, observou-se que todos os isolados apresentaram simultaneamente os genes *esp* e *efaA*.

**Tabela 12** – Distribuição dos perfis de múltiplos determinantes de virulência nos isolados de *E. faecium*, *E. faecalis* e *Enterococcus* spp

<b>Espécie</b>	<b>Isolados</b>	<b>Total (%)<sup>a</sup></b>	<b>Determinantes genotípicos de virulência</b>
<i>E. faecium</i>	01	1 (0,7)	<i>ace</i> <sup>+</sup> , <i>efaA</i> <sup>+</sup> , <i>esp</i> <sup>+</sup> , <i>gelE</i> <sup>+</sup> ,
	49	1 (0,7)	<i>ace</i> <sup>+</sup> , <i>cylA</i> <sup>+</sup> , <i>B</i> <sup>+/-</sup> , <i>M</i> <sup>+</sup> , <i>efaA</i> <sup>+</sup> , <i>gelE</i> <sup>+</sup>
	65, 130, 134	3 (2,2)	<i>ace</i> <sup>+</sup> , <i>efaA</i> <sup>+</sup> , <i>esp</i> <sup>+</sup> , <i>gelE</i> <sup>+</sup>
	75, 76, 77, 78	4 (3,0)	<i>ace</i> <sup>+</sup> , <i>efaA</i> <sup>+</sup> , <i>esp</i> <sup>+</sup> , <i>gelE</i> <sup>+/-</sup>
	67,	1 (0,7)	<i>ace</i> <sup>+</sup> , <i>efaA</i> <sup>+</sup> , <i>gelE</i> <sup>+</sup>
	79, 103	2 (1,5)	<i>ace</i> <sup>+</sup> , <i>efaA</i> <sup>+</sup> , <i>esp</i> <sup>+</sup>
	141	1 (0,7)	<i>efaA</i> <sup>+</sup> , <i>esp</i> <sup>+</sup> , <i>gelE</i> <sup>+</sup>
	116	1 (0,7)	<i>cyB</i> <sup>+</sup> , <i>esp</i> <sup>+</sup> , <i>gelE</i> <sup>+</sup>
	39, 41	2 (1,5)	<i>efaA</i> <sup>+</sup> , <i>esp</i> <sup>+</sup> , <i>gelE</i> <sup>+</sup>
	104	1 (0,7)	<i>ace</i> <sup>+</sup> , <i>efaA</i> <sup>+/-</sup> , <i>gelE</i> <sup>+</sup>
	08, 17, 35, 46, 47, 80	6 (4,4)	<i>cylA</i> <sup>+/-</sup> , <i>M</i> <sup>+/-</sup> , <i>gelE</i> <sup>+/-</sup>
	66,	1 (0,7)	<i>efaA</i> <sup>+</sup> , <i>gelE</i> <sup>+</sup>
	125	1 (0,7)	<i>esp</i> <sup>+</sup> , <i>gelE</i> <sup>+</sup>
	06, 56	2 (1,5)	<i>cylA</i> <sup>+/-</sup> , <i>M</i> <sup>+/-</sup>
	117, 118	2 (1,5)	<i>cyB</i> <sup>+</sup> , <i>gelE</i> <sup>+</sup>
	72	1 (0,7)	<i>gelE</i> <sup>+/-</sup> , <i>vanA</i> <sup>+</sup>
	69	1 (0,7)	<i>esp</i> <sup>+/-</sup> , <i>gelE</i> <sup>+/-</sup>
	146	1 (0,7)	<i>esp</i> <sup>+</sup> , <i>gelE</i> <sup>+/-</sup>
	107	1 (0,7)	<i>efaA</i> <sup>+</sup> , <i>esp</i> <sup>+</sup>
	95	1 (0,7)	<i>efaA</i> <sup>+</sup> , <i>esp</i> <sup>+/-</sup>
131	1 (0,7)	<i>efaA</i> <sup>+/-</sup> , <i>esp</i> <sup>+</sup>	
143	1 (0,7)	<i>efaA</i> <sup>+/-</sup> , <i>gelE</i> <sup>+</sup>	
96	1 (0,7)	<i>efaA</i> <sup>+/-</sup> , <i>esp</i> <sup>+/-</sup>	
<b>Total (%)<sup>a</sup></b>		<b>37 (27,4)</b>	
<i>E. faecalis</i>	128	1 (25)	<i>ace</i> <sup>+</sup> , <i>efaA</i> <sup>+</sup> , <i>esp</i> <sup>+</sup> , <i>gelE</i> <sup>+</sup>
	87	1 (25,0)	<i>ace</i> <sup>+/-</sup> , <i>efaA</i> <sup>+</sup> , <i>esp</i> <sup>+</sup>
	102	1 (25,0)	<i>efaA</i> <sup>+</sup> , <i>esp</i> <sup>+</sup>
<b>Total (%)<sup>a</sup></b>		<b>3 (75,0)</b>	
<i>Enterococcus</i> spp	93	1 (9,1)	<i>ace</i> <sup>+/-</sup> , <i>efaA</i> <sup>+</sup> , <i>esp</i> <sup>+</sup>
	45	1 (9,1)	<i>ace</i> <sup>+/-</sup> , <i>efaA</i> <sup>+</sup> , <i>esp</i> <sup>+</sup>
	119	1 (9,1)	<i>esp</i> <sup>+</sup> , <i>gelE</i> <sup>+</sup>
<b>Total (%)<sup>a</sup></b>		<b>3 (27,3)</b>	
<b>Total geral (%)</b>		<b>43 (28,7)</b>	

Isolados com múltiplas determinantes genéticas de virulência, considerando-se o perfil de bandas com fragmento de mesmo tamanho do esperado para o gene avaliado, nítidas (+) e pouco nítidas (+/-).

<sup>a</sup> Relação do total de isolados de cada espécie com múltiplas determinantes de virulência e sua relação percentual entre parênteses.



O perfil detalhado de distribuição dos genes de virulência disposto no Apêndice A indica que o queijo QC7 proveniente da região dos Sertões Cearenses apresentou determinantes genotípicos de virulência para 72,7% (8/11) dos isolados, sendo esta a maior incidência de genes de virulência entre os queijos avaliados.

As duas culturas de *E. faecium* que apresentaram maior número de determinantes de virulência simultaneamente foram isoladas de queijos provenientes da Região do Vale do Jaguaribe. Nesta mesma região observou-se para o queijo QC10 a menor incidência de determinantes genotípicos de virulência, onde 80% (8/10) dos isolados apresentaram resultados negativos para todos os genes avaliados.

A distribuição das determinantes genotípicos de virulência deste estudo revela que todos os isolados de *E. faecalis* apresentaram resultado positivo para pelo menos um gene de virulência avaliado, com múltiplos determinantes genotípicos de virulência observadas em 75% desses isolados.

Ao se comparar os isolados de *E. faecalis* e *E. faecium* observou-se que um maior percentual de *E. faecalis* está relacionado a determinantes genotípicos de virulência que os isolados de *E. faecium*. Porém, observa-se que os isolados de *E. faecium* apresentaram a maior quantidade de múltiplos determinantes genotípicos de virulência.

No estudo realizado por Eaton e Gasson (2001) a presença de múltiplos determinantes genotípicos de virulência foi observada para *E. faecium* de origem clínica, porém, nenhum *E. faecium* de origem alimentar apresentou esta característica. Os múltiplos determinantes genotípicos de virulência tanto para isolados de origem alimentar quanto os de origem clínica foram observadas apenas para a espécie *E. faecalis*.

Eaton e Gasson (2001) não encontraram resultado positivo na PCR para os genes *geE*, *cyIA*, *cyIB* e *cyIM*, em nenhum isolado de *E. faecium*, e apenas culturas desta espécie de origem clínica apresentaram a determinante *esp*<sup>+</sup>. Para estes cinco genes, os *primers* utilizados na PCR no presente estudo, foram obtidos a partir do estudo de Eaton e Gasson (2001), o que pode reforçar a justificativa de que variações nas sequências de *E. faecium* podem contribuir a presença de bandas com pouca nitidez na maior parte das determinantes *geE*, *cyIA*, B e M.

A predominância dos genes *esp* e *efaA* entre os genes de virulência avaliados para os isolados de *E. faecium* e *E. faecalis* demonstra semelhança com isolados de enterococos de origem clínica. Eaton e Gasson (2001) e Mannu et al (2003) encontraram a predominância do gene *esp* para *E. faecium* de origem clínica, e de *efaA* tanto para os isolados de origem alimentar e clínica.

A relação com os determinantes genotípicos geralmente relacionados a isolados de origem clínica pode indicar o aumento da patogenia de *E. faecium* de origem alimentar, pois os genes *esp* e *efaA* são genes relacionados a codificação de adesinas em *E. faecium* e *E. faecalis* que contribuem para a colonização e persistência dos mesmos (FRANZ; HOLZAPFEL, 2006; SEMEDO et al, (2003 b).

No caso dos isolados *esp*<sup>+</sup>, a aderência e colonização dos enterococos por sua vez, contribuem com a sua capacidade de adesão e formação de biofilmes em superfície abiótica, fator que dificulta a inibição e eliminação de cepas de enterococos potencialmente virulentas (EATON; GASSON, 2001; FRANZ; HOLZAPFEL, 2006).

O gene *ace* codifica as adesinas de colágeno e está relacionado aos *E. faecalis*, mas foi encontrado em 9,3% (13/135) dos *E. faecium*. Gomes et al. (2008) encontraram a presença do gene *ace* em 3 de 139 isolados de *E. faecium* e todos os isolados de *E. faecalis* isolados de diversos tipos de alimentos.

A presença de múltiplos determinantes genotípicos de virulência em isolados de queijos de coalho, e sua comparação com determinantes de virulência comumente provenientes de isolados de origem clínica pode ser um indicativo do potencial de virulência de enterococos de origem alimentar, e a possível transferência de genes de virulência de isolados de origem clínica para isolados de origem alimentar.

### 5.5 Relação entre determinantes genotípicos e fenotípicos de virulência

A expressão dos determinantes fenotípicos de virulência gelatinase e hemolisina, assim como a resistência a vancomicina são geralmente relacionadas, respectivamente, aos seguintes genes de virulência: *gelE*, *cyIA,B,M* e *vanA*. A relação entre estes determinantes fenotípicos e genotípicos de virulência apresentam-se detalhadas no Apêndice A.

Para os genes presentes no *operon* da citolisina *cyIA*, *cyIB* e *cyIM* observou-se que apenas um isolado apresentou simultaneamente atividade  $\beta$ -hemolítica e os genes do *operon cyIA,B,M*. A presença de outros determinantes genotípicos de virulência foi observada para 12 isolados de *E. faecium* e 2 *E. faecalis* que apresentaram atividade  $\beta$ -hemolítica positiva mas não formaram bandas para fragmentos dos genes *cyIA,B,M*, conforme demonstrado na Tabela 13. Entre os isolados de *E. faecium*, observou-se a presença de fragmentos para os genes *efaA* ou *gelE*. Os dois isolados de *E. faecalis*, provenientes de diferentes amostras de queijos, apresentaram o mesmo perfil fenotípico de virulência e resultados positivos para os fragmentos dos genes *efaA* e *esp*.

Entre os cinco isolados que apresentaram atividade gelatinase positiva, foi possível verificar a formação de bandas pouco nítidas para o gene *gelE* para os quatro isolados de *E. faecium* e de resultado negativo para o isolado de *Enterococcus* spp. Um entre os quatro isolados de *E. faecium* que expressaram

atividade gelatinase e formaram bandas para o gene *gelE*, apresentou simultaneamente múltiplas determinantes fenotípicos e genotípicos de virulência, conforme a Tabela 13. Observou-se a presença de bandas com fragmento para o gene *gelE*, sem a expressão da atividade gelatinase para 40,7% (55/135) dos *E.faecium*, 25% (1/4) dos *E.faecalis* e 36,4% (4/11) dos *Enterococcus* spp. Destes isolados, 21 *E.faecium* e 1 *E.faecalis*, apresentaram múltiplas determinantes de virulência.

Ao se avaliar a resistência à vancomicina, observou-se que o único isolado de *E. faecium* que apresentou o fenótipo de resistência a vancomicina teve resultado negativo para o gene *vanA*, mas formou banda pouco nítida para o gene *gelE*. Para os seis isolados que formaram bandas com fragmentos do tamanho esperado para o gene *vanA*, observou-se o fenótipo de resistência ou resistência intermediária para o antibiótico eritromicina.

O perfil de virulência dos isolados das amostras de queijos de coalho indica que 63,6% (7/11) dos isolados da amostra QC7, proveniente da Região dos Sertões Cearenses apresentaram múltiplos determinantes de virulência genotípicos e fenotípicos de virulência. Entre os resultados de múltipla resistência apresentados na Tabela 13, observou-se que a 71,4% (5/7) dos isolados apresentaram resistência a tetraciclina e nenhum destes foi sensível a eritromicina.

**Tabela 13** - Relação dos determinantes fenotípicos e genotípicos de enterococos

<b>Espécie</b>	<b>Queijo</b>	<b>Isolado</b>	<b>Genes de virulência</b>	<b>Expressão fenotípica<sup>a</sup></b>
<i>E. faecium</i>	QC1	01	<i>ace</i> <sup>+</sup> , <i>efaA</i> <sup>+</sup> , <i>esp</i> <sup>+</sup> , <i>gelE</i> <sup>+</sup>	eri <sup>I</sup> , GEL <sup>-</sup> , γ-hem
	QC3	30	<i>esp</i> <sup>+</sup>	eri <sup>R</sup> , GEL <sup>-</sup> , γ-hem
		31	<i>esp</i> <sup>+/-</sup> , <i>vanA</i> <sup>+</sup>	eri <sup>I</sup> , GEL <sup>-</sup> , γ-hem
	QC4	37	<i>gelE</i> <sup>+</sup>	eri <sup>R</sup> , GEL <sup>-</sup> , β-hem
		39	<i>efaA</i> <sup>+</sup> , <i>esp</i> <sup>+</sup> , <i>gelE</i> <sup>+</sup>	eri <sup>I</sup> , GEL <sup>-</sup> , γ-hem
		41	<i>efaA</i> <sup>+</sup> , <i>esp</i> <sup>+</sup> , <i>gelE</i> <sup>+</sup>	eri <sup>I</sup> , GEL <sup>-</sup> , γ-hem
		49	<i>ace</i> <sup>+</sup> , <i>cylA</i> <sup>+</sup> , B <sup>+/-</sup> , M <sup>+</sup> ; <i>efaA</i> <sup>+</sup> , <i>gelE</i> <sup>+</sup>	GEL <sup>-</sup> , β-hem
	QC6	65	<i>ace</i> <sup>+</sup> ; <i>efaA</i> <sup>+</sup> , <i>esp</i> <sup>+</sup> , <i>gelE</i> <sup>+</sup>	eri <sup>I</sup> , tet <sup>R</sup> , GEL <sup>-</sup> , β-hem
		66	<i>gelE</i> <sup>+</sup>	eri <sup>I</sup> , GEL <sup>-</sup> , γ-hem
		67	<i>ace</i> <sup>+</sup> ; <i>efaA</i> <sup>+</sup> , <i>gelE</i> <sup>+</sup>	eri <sup>I</sup> , tet <sup>R</sup> , GEL <sup>-</sup> , β-hem
		68	<i>efaA</i> <sup>+</sup>	eri <sup>I</sup> , GEL <sup>-</sup> , γ-hem
	QC7	72	<i>vanA</i> <sup>+</sup> , <i>gelE</i> <sup>+/-</sup>	eri <sup>I</sup> , GEL <sup>-</sup> , γ-hem
		75	<i>efaA</i> <sup>+</sup> , <i>esp</i> <sup>+</sup> , <i>gelE</i> <sup>+/-</sup>	eri <sup>I</sup> , GEL <sup>-</sup> , β-hem
		76	<i>efaA</i> <sup>+</sup> , <i>esp</i> <sup>+</sup> , <i>gelE</i> <sup>+/-</sup>	eri <sup>I</sup> , tet <sup>H</sup> , GEL <sup>-</sup> , γ-hem
		77	<i>efaA</i> <sup>+</sup> , <i>esp</i> <sup>+</sup> , <i>gelE</i> <sup>+/-</sup>	eri <sup>I</sup> , tet <sup>H</sup> , GEL <sup>+</sup> , γ-hem
		78	<i>efaA</i> <sup>+</sup> , <i>esp</i> <sup>+</sup> , <i>gelE</i> <sup>+/-</sup>	eri <sup>I</sup> , tet <sup>R</sup> , GEL <sup>-</sup> , β-hem
		79	<i>efaA</i> <sup>+</sup> , <i>esp</i> <sup>+</sup>	eri <sup>I</sup> , tet <sup>R</sup> , GEL <sup>-</sup> , β-hem
		81	<i>esp</i> <sup>+</sup> , <i>gelE</i> <sup>+/-</sup>	eri <sup>I</sup> , GEL <sup>-</sup> , γ-hem
	QC9	86	<i>efaA</i> <sup>+</sup> , <i>esp</i> <sup>+</sup>	eri <sup>I</sup> , tet <sup>R</sup> , GEL <sup>-</sup> , β-hem
		92	<i>esp</i> <sup>+</sup>	eri <sup>I</sup> , GEL <sup>-</sup> , γ-hem
		95	<i>esp</i> <sup>+</sup> , <i>efaA</i> <sup>+</sup>	eri <sup>I</sup> , GEL <sup>-</sup> , γ-hem
		103	<i>ace</i> <sup>+</sup> , <i>efaA</i> <sup>+</sup> , <i>esp</i> <sup>+</sup>	GEL <sup>-</sup> , β-hem
		104	<i>ace</i> <sup>+</sup> , <i>efaA</i> <sup>+/-</sup> , <i>gelE</i> <sup>+</sup>	eri <sup>R</sup> , GEL <sup>-</sup> , β-hem
	QC10	105	<i>vanA</i> <sup>+</sup>	eri <sup>H</sup> , GEL <sup>-</sup> , γ-hem
		107	<i>efaA</i> <sup>+</sup>	GEL <sup>-</sup> , γ-hem
	QC11	116	<i>cylB</i> <sup>+</sup> , <i>esp</i> <sup>+</sup> , <i>gelE</i> <sup>+</sup>	GEL <sup>-</sup> , γ-hem
		117	<i>cylB</i> <sup>+</sup> , <i>gelE</i> <sup>+</sup>	GEL <sup>-</sup> , γ-hem
		118	<i>cylB</i> <sup>+</sup> , <i>gelE</i> <sup>+</sup>	GEL <sup>-</sup> , γ-hem
		124	<i>gelE</i> <sup>+</sup>	eri <sup>I</sup> , GEL <sup>-</sup> , γ-hem
		125	<i>gelE</i> <sup>+</sup>	GEL <sup>-</sup> , β-hem
QC12	126	<i>esp</i> <sup>+</sup>	eri <sup>R</sup> , GEL <sup>-</sup> , γ-hem	
	130	<i>ace</i> <sup>+</sup> , <i>efaA</i> <sup>+</sup> , <i>esp</i> <sup>+</sup> , <i>gelE</i> <sup>+</sup>	eri <sup>I</sup> , tet <sup>H</sup> , GEL <sup>-</sup> , γ-hem	
	134	<i>ace</i> <sup>+</sup> , <i>efaA</i> <sup>+</sup> , <i>esp</i> <sup>+</sup> , <i>gelE</i> <sup>+</sup>	eri <sup>I</sup> , GEL <sup>-</sup> , β-hem	
	135	<i>gelE</i> <sup>+</sup>	GEL <sup>-</sup> , β-hem	
	136	<i>vanA</i> <sup>+</sup>	eri <sup>I</sup> , GEL <sup>-</sup> , γ-hem	
	141	<i>efaA</i> <sup>+</sup> , <i>esp</i> <sup>+</sup> , <i>gelE</i> <sup>+</sup>	eri <sup>I</sup> , GEL <sup>-</sup> , γ-hem	
QC14	143	<i>efaA</i> <sup>+/-</sup> , <i>gelE</i> <sup>+</sup>	eri <sup>I</sup> , GEL <sup>-</sup> , β-hem	
	146	<i>esp</i> <sup>+</sup> , <i>gelE</i> <sup>+/-</sup>	GEL <sup>-</sup> , γ-hem	
	147	<i>efaA</i> <sup>+</sup>	eri <sup>H</sup> , tet <sup>H</sup> , GEL <sup>-</sup> , γ-hem	
<i>E. faecalis</i>	QC6	64	<i>esp</i> <sup>+</sup>	eri <sup>I</sup> , tet <sup>R</sup> , GEL <sup>-</sup> , γ-hem
	QC8	87	<i>ace</i> <sup>+/-</sup> , <i>efaA</i> <sup>+</sup> , <i>esp</i> <sup>+</sup>	eri <sup>I</sup> , tet <sup>R</sup> , GEL <sup>-</sup> , β-hem
	QC9	102	<i>efaA</i> <sup>+</sup> , <i>esp</i> <sup>+</sup>	eri <sup>I</sup> , tet <sup>H</sup> , GEL <sup>-</sup> , β-hem
	QC12	128	<i>ace</i> <sup>+</sup> , <i>efaA</i> <sup>+</sup> , <i>esp</i> <sup>+</sup> , <i>gelE</i> <sup>+</sup>	eri <sup>I</sup> , GEL <sup>-</sup> , γ-hem
<i>Enterococcus</i> spp	QC8	88	<i>esp</i> <sup>+</sup>	eri <sup>I</sup> , GEL <sup>-</sup> , γ-hem
	QC8	89	<i>esp</i> <sup>+</sup>	eri <sup>I</sup> , GEL <sup>-</sup> , γ-hem
	QC9	93	<i>ace</i> <sup>+/-</sup> , <i>efaA</i> <sup>+</sup> , <i>esp</i> <sup>+</sup>	eri <sup>I</sup> , tet <sup>R</sup> , GEL <sup>-</sup> , γ-hem
	QC11	119	<i>gelE</i> <sup>+</sup>	eri <sup>I</sup> , GEL <sup>-</sup> , γ-hem
	QC14	142	<i>gelE</i> <sup>+</sup>	GEL <sup>-</sup> , γ-hem

<sup>a</sup> Expressão fenotípica para isolados que apresentaram pelo menos um gene com perfil de bandas nítidas. eri<sup>I</sup>, eri<sup>R</sup> e tet<sup>R</sup> (isolados com perfil de resistência: I- intermediária a eritromicina ou tetraciclina); GEL (fenótipo gelatinase + ou -); hem (fenótipo β-hemólise ou γ-hemólise).

A presença de atividade  $\beta$ -hemolítica em hemácias humanas e de cavalo estão geralmente relacionadas à presença dos genes do *operon* da citolisina, *cyIA*, *B* e *M*, porém neste estudo observou-se que a maior parte dos enterococos que expressaram esta atividade não apresentaram nenhum gene *cyI*<sup>+</sup> (MUNDY, 2000).

De Vuyst et al. (2003) também observaram em seu estudo que nenhum isolado de *E. faecium* que apresentaram atividade  $\beta$ -hemolítica possuíam os genes *cyI*. De acordo com os autores, a atividade  $\beta$ -hemolítica é dominante aos *E. faecalis*, que sempre carregam pelo menos os genes estruturais da citolisina, mas não é uma atividade restrita a esta espécie. Uma probabilidade para a incidência da atividade  $\beta$ -hemolítica nesses enterococos seria a presença de outros componentes citotóxicos responsáveis por esta atividade.

A ausência da atividade  $\beta$ -hemolítica com presença dos genes *cyI* também foi observada em outros estudos. Eaton e Gasson (2001) não observaram atividade  $\beta$ -hemolítica em isolados de *E. faecalis* de origem clínica que possuíam os genes *cyIA*, *B* ou *M*. Já Semedo et al. (2003 a) verificaram que mais isolados de enterococos possuíam os genes *cyIA*, *B* ou *M* do que expressavam a atividade  $\beta$ -hemolítica.

Com relação aos isolados que não apresentaram atividade  $\beta$ -hemolítica, mas possuíam o gene *cyIB*, a ausência da expressão fenotípica pode ser justificada pela ausência do gene *cyIA*, responsável pela regulação da atividade hemolítica. Já para os isolados que possuíam o gene *cyIA*, a ausência da atividade fenotípica pode ser justificada pelos baixos níveis de regulação da expressão gênica ou pela inativação da produção do gene de expressão (EATON; GASSON, 2001).

A presença dos genes de virulência e ausência de atividade fenotípica também foi observada para os genes *vanA* e *geIE*, estes tipos de genes chamados por Eaton e Gasson (2001) de “genes silenciosos”. Em resumo, a expressão

fenotípica dos genes é regulada pela atividade enzimática, que por sua vez, tem a sua síntese controlada por mecanismos distintos, que em sua maioria são controlados por fatores ambientais. Quando estes fatores ambientais não são favoráveis, como por exemplo, pela presença ou ausência de moléculas específicas, ocorre inibição da produção enzimática, e conseqüentemente não há a atividade metabólica ou expressão do gene (EATON; GASSON, 2001; MADIGAN et al, 2008). Porém quando os fatores ambientais são favoráveis, como as condições do trato gastrointestinal, o balanço de microrganismos da flora intestinal e seus efeitos de sinergismo, assim como a presença e persistência dos enterococos, poderá ocorrer a ativação desses “genes silenciosos” e sua conseqüente expressão.

A expressão do gene *gelE*, está relacionada não apenas a presença deste gene, mas também à presença dos genes do operon *fsr* que regulam a sua atividade metabólica, assim como a densidade de enterococos na amostra e sua espécie (EATON; GASSON, 2001; LOPES et al, 2006; QIN et al, 2001).

Lopes et al. (2006) verificaram expressão da atividade gelatinase apenas para *E. faecalis* que possuíam tanto o gene *gelE* quanto os genes do operon *fsr*, porém para os *E. faecium* essa atividade não foi confirmada *in vitro* mesmo com a presença desses genes.

A resistência a vancomicina está relacionada a sete fenótipos de resistência (VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanF, VanG e VanH), todos relacionados à operons localizados nos plasmídeos ou nos cromossomos. O gene *vanA* avaliado neste estudo está relacionado à resistência dos enterococos a altas concentrações de teicoplanina ou vancomicina (64-100 mg/L), porém, nenhum dos dois tipos de resistência foi observado neste estudo (COURVALIN, 2006; ZIRAKZADEH; PATEL, 2005).

O gene *vanC*, que não foi avaliado neste estudo está relacionado a baixas concentrações de vancomicina (5-32 mg/L), e à sensibilidade à teicoplanina,

conforme o perfil do único isolado que apresentou resistência a vancomicina neste estudo (COURVALIN, 2006; ZIRAKZADEH; PATEL, 2005).

### 5.6 Confirmação do gene *ge/E* por sequenciamento

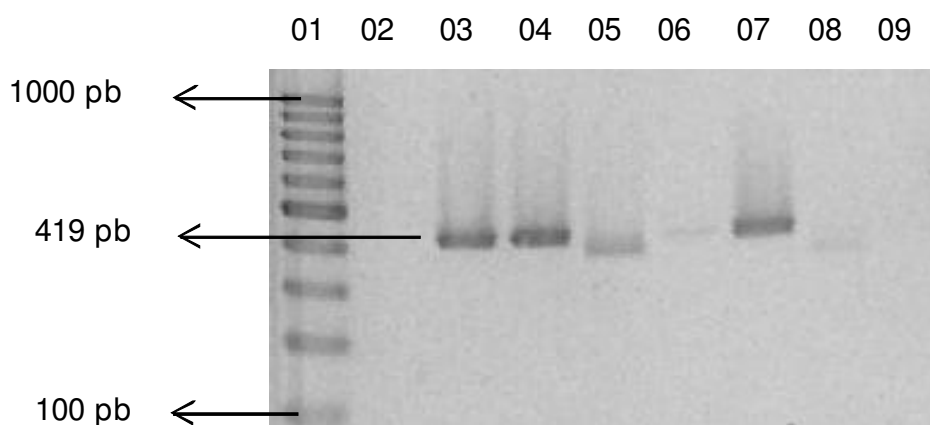
Os 150 isolados de enterococos foram avaliados utilizando-se a técnica da multiplex PCR para os genes *ge/E* e *cy/B*, porém, para o gene *ge/E* observou-se em 64 isolados, perfis de bandas nítidas e pouco nítidas, e, para um isolado de *Enterococcus* spp que apresentou atividade gelatinase positiva não foi verificada a formação de banda para o gene *ge/E*.

Para verificar se o perfil apresentado estava relacionado à multiplex PCR, foi realizada a PCR somente do gene *ge/E* nestes 64 isolados, confirmando o perfil anteriormente obtido, conforme observado na Figura 9. O perfil de bandas pouco nítidas também foi observado para outros genes, porém, foi verificado com maior frequência no gene *ge/E*.

A confirmação da presença do gene *ge/E* foi realizada por sequenciamento dos produtos da PCR deste gene de 50 isolados, com a análise dessas sequências comparadas às depositadas no *Genbank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Entre as 50 culturas selecionadas estavam: 44 *E. faecium* (com 4 isolados que expressaram a atividade gelatinase, 22 com perfil de bandas pouco nítidas, 17 com perfil de bandas nítidas, 1 isolado que não formou banda); 2 *E. faecalis* (um com perfil de banda nítida e o controle positivo da reação ATCC 29212); 4 *Enterococcus* spp (1 que não formou banda mas expressou atividade gelatinase positiva, 2 com perfil de banda pouco nítida e 1 com perfil de banda nítida).





**Figura 9** – Foto da eletroforese do gel de agarose para identificação do gene *gelE* por PCR. 01) Marcador 100 bp; 02) Controle negativo: sem DNA; 03) Controle positivo: *E. faecalis* ATCC 29212; 04) Isolado *E. faecium* 01; 05) Isolado *E. faecium* 08; 06) Isolado *E. faecium* 19; 07) Isolado *E. faecium* 49 08) Isolado *E. faecium* 45 09) Isolado *Enterococcus* spp 84.

A análise dos cromatogramas de sequenciamento demonstrou que para 17 *E. faecium* e 1 *Enterococcus* spp não foi possível se obter sequência, por apresentarem menos de 290 pares de bases sequenciados e muitas bases nitrogenadas indefinidas ao longo das sequências. O resumo geral da qualidade do sequenciamento (obtida pelos cromatogramas) comparado com o perfil dos isolados para o gene e expressão da gelatinase são demonstrados no Apêndice B.

Entre os isolados que não possuíam o gene *gelE* estavam: 2 *E. faecium* que expressaram atividade gelatinase positiva, 7 *E. faecium* que possuíam perfil de banda nítida para o gene *gelE*, 7 *E. faecium* e 1 *Enterococcus* spp que possuíam perfil de banda pouco nítida para o gene *gelE*; e um *E. faecium* que não formou bandas e foi utilizado como controle negativo da reação.

As sequências obtidas para os demais 32 isolados foram analisadas no programa BLAST do *Genbank* para se verificar se estas correspondiam às sequências do gene *gelE* já depositadas no banco de dados, e , para se comparar todas as sequências alinhou-se estas no programa Clustal W.

A análise das sequências utilizando-se o *Genbank* demonstrou que todas as 32 sequências avaliadas possuíam alinhamento com maior similaridade

para o gene *gelE*. Dentre os enterococos que possuíam sequências publicadas e similaridade com todos os 32 isolados estavam: 3 *E. faecalis*, provenientes de amostra clínica, (SU et al., 1991), inseto (PARK et al., 2007) e esterco suíno (MACOVEI et al., 2009); e 1 *E. faecium* proveniente de amostra de queijo (GASPAR et al., 2009), os números de acesso de cada isolado no *Genbank* são respectivamente, M37185.1, EF105504.1, EU862241.3 e FJ858146.1.

Na Tabela 14 é apresentada a relação de similaridade das 32 sequências avaliadas com as sequências depositadas no *Genbank*. Observou-se que as 32 sequências possuem relação variável entre 95 e 99 %, e, com exceção da cultura *E. faecium* 10, todas as demais sequências apresentaram maior similaridade com a sequência de *E. faecalis* OG1-10, com identidade variável de 97 e 99 %, seguida da sequência *E. faecalis* (EF105504.1), com variação de 96 a 99 %.

Para o isolado *E. faecium* 10, observou-se maior similaridade com a sequência *E. faecalis* (EU862241.3). A cultura *E. faecium* QS32, correspondente a única sequência do gene *gelE*, proveniente de queijo, apresentou menor similaridade com as sequências dos 32 fragmentos avaliados, quando comparada às outras três sequências de *E. faecalis*.

A variação de identidades das sequências e suas probabilidades de erro (muito próximas de 0) demonstraram que não há relação entre a variação das sequências e os perfis de bandas apresentados. Para os 2 isolados de *E. faecium* e 1 isolado de *Enterococcus* spp que expressaram atividade gelatinase positiva, observou-se identidade com a cultura *E. faecalis* OG1-10 de 99 % para *E. faecium* 77 e *Enterococcus* spp 84; e de 98 % para *E. faecium* 19.

O alinhamento da região conservada das sequências pelo programa Clustal w está disposto detalhadamente no Apêndice C. Na Tabela 15 estão dispostas as regiões onde houve mutações nos genes em relação às demais sequências. Observou-se que a sequência *E. faecium* 10, apresentou todas as mutações alinhadas com a cultura *E. faecalis* H81, justificando a maior identidade

da cultura *E. faecium* 10 com esta cultura. Observou-se que a cultura *E. faecium* QS32, apresentou 3 mutações alinhadas com as culturas *E. faecalis* H81 e *E. faecium* 10; e as culturas *E. faecalis* OG1-10, *E. faecalis* ([EF105504.1](#)) e *E. faecium* 138, apresentaram mutações sem alinhamento com outras sequências.

**Tabela 14** – Relação entre as sequências dos fragmentos dos isolados de enterococos e as culturas depositadas no *Genbank*.

Cultura <sup>a</sup>	Tamanho (pb) <sup>b</sup>	<i>E. faecalis</i> OG1-10 (M37185.1) <sup>c</sup>		<i>E. faecalis</i> (EF105504.1) <sup>c</sup>		<i>E. faecalis</i> H81 (EU862241.3) <sup>c</sup>		<i>E. faecium</i> QS32 (FJ858146.1) <sup>c</sup>	
		Id <sup>d</sup>	e-valor <sup>e</sup>	Id <sup>d</sup>	e-valor <sup>e</sup>	Id <sup>d</sup>	e-valor <sup>e</sup>	Id <sup>d</sup>	e-valor <sup>e</sup>
<b><i>geI</i><sup>+</sup>, <i>Gel</i><sup>+</sup></b>									
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212									
	386	99	0,0	98	0,0	98	0,0	97	1.10 <sup>-179</sup>
<b><i>geI</i><sup>+/−</sup>, <i>Gel</i><sup>+</sup></b>									
<i>E. faecium</i> 19									
	399	98	0,0	97	0,0	97	0,0	96	2.10 <sup>-176</sup>
<i>E. faecium</i> 77									
	395	99	0,0	99	0,0	98	0,0	98	0,0
<b><i>geI</i><sup>−</sup>, <i>Gel</i><sup>+</sup></b>									
<i>Enterococcus</i> spp 84									
	394	99	0,0	98	0,0	98	3.10 <sup>-180</sup>	97	1.10 <sup>-173</sup>
<b><i>geI</i><sup>+</sup>, <i>Gel</i><sup>−</sup></b>									
<i>E. faecium</i> 01									
	400	98	0,0	98	0,0	97	0,0	97	0,0
<i>E. faecium</i> 39									
	400	98	0,0	98	0,0	97	0,0	96	7.10 <sup>-177</sup>
<i>E. faecium</i> 49									
	398	97	0,0	97	0,0	96	0,0	96	4.10 <sup>-179</sup>
<i>E. faecium</i> 65									
	395	98	0,0	98	0,0	97	1.10 <sup>-178</sup>	97	7.10 <sup>-177</sup>
<i>E. faecium</i> 66									
	399	98	0,0	97	0,0	97	1.10 <sup>-178</sup>	95	7.10 <sup>-172</sup>
<i>E. faecalis</i> 128									
	400	98	0,0	98	0,0	97	0,0	97	0,0
<i>E. faecium</i> 130									
	400	98	0,0	98	0,0	97	0,0	97	0,0
<i>E. faecium</i> 134									
	350	98	7.10 <sup>-177</sup>	98	3.10 <sup>-175</sup>	97	3.10 <sup>-170</sup>	97	1.10 <sup>-168</sup>
<i>E. faecium</i> 135									
	385	99	0,0	99	0,0	98	0,0	97	7.10 <sup>-177</sup>
<i>E. faecium</i> 141									
	350	98	1.10 <sup>-178</sup>	98	7.10 <sup>-177</sup>	97	7.10 <sup>-172</sup>	97	3.10 <sup>-170</sup>
<i>Enterococcus</i> spp 142									
	349	99	9.10 <sup>-161</sup>	99	4.10 <sup>-159</sup>	98	4.10 <sup>-154</sup>	98	2.10 <sup>-152</sup>
<i>E. faecium</i> 143									
	398	98	9.10 <sup>-176</sup>	97	4.10 <sup>-174</sup>	96	4.10 <sup>-169</sup>	95	2.10 <sup>-162</sup>
<b><i>geI</i><sup>+/−</sup>, <i>Gel</i><sup>−</sup></b>									
<i>E. faecium</i> 10									
	400	96	1.10 <sup>-174</sup>	96	5.10 <sup>-173</sup>	98	0,0	96	5.10 <sup>-173</sup>
<i>E. faecium</i> 12									
	394	97	0,0	97	0,0	96	1.10 <sup>-174</sup>	96	7.10 <sup>-177</sup>
<i>E. faecium</i> 17									
	380	98	0,0	97	0,0	97	0,0	97	7.10 <sup>-177</sup>
<i>E. faecium</i> 35									
	394	98	0,0	98	0,0	97	0,0	97	2.10 <sup>-176</sup>
<i>Enterococcus</i> spp 45									
	400	98	0,0	97	0,0	97	0,0	96	1.10 <sup>-179</sup>
<i>E. faecium</i> 47									
	398	98	0,0	98	0,0	97	1.10 <sup>-178</sup>	97	1.10 <sup>-173</sup>
<i>E. faecium</i> 69									
	393	99	3.10 <sup>-180</sup>	98	1.10 <sup>-178</sup>	98	1.10 <sup>-173</sup>	96	7.10 <sup>-167</sup>
<i>E. faecium</i> 70									
	384	98	0,0	98	0,0	97	0,0	97	9.10 <sup>-176</sup>
<i>E. faecium</i> 71									
	396	97	0,0	97	0,0	96	2.10 <sup>-176</sup>	96	1.10 <sup>-174</sup>
<i>E. faecium</i> 74									
	401	98	0,0	97	0,0	97	0,0	96	1.10 <sup>-176</sup>
<i>E. faecium</i> 76									
	395	97	0,0	97	0,0	96	0,0	96	0,0
<i>E. faecium</i> 78									
	395	99	0,0	98	0,0	98	0,0	97	0,0
<i>E. faecium</i> 80									
	396	98	0,0	98	0,0	97	4.10 <sup>-179</sup>	97	2.10 <sup>-177</sup>
<i>E. faecium</i> 138									
	399	97	0,0	97	0,0	96	5.10 <sup>-178</sup>	95	2.10 <sup>-171</sup>
<i>E. faecium</i> 145									
	400	97	4.10 <sup>-169</sup>	96	2.10 <sup>-167</sup>	96	2.10 <sup>-162</sup>	96	2.10 <sup>-157</sup>
<i>E. faecium</i> 146									
	350	99	9.10 <sup>-161</sup>	99	4.10 <sup>-159</sup>	98	4.10 <sup>-154</sup>	98	2.10 <sup>-152</sup>

<sup>a</sup> Controle positivo *E. faecalis* ATCC 29212 e isolados de enterococos de queijos de coalho com seus números de identificação. <sup>b</sup> Tamanho do fragmento seqüenciado <sup>c</sup> Culturas de *E. faecium* e *E. faecalis* seqüenciadas para o gene *geI* e seus números de acesso no *genbank*. <sup>d</sup> Percentual de máxima identidade obtido entre cada cultura de enterococos com as sequencias depositadas. <sup>e</sup> Valor associado a propabilidade de erro no anelamento das sequências, quanto mais próximo de “1”, maior a probabilidade de erro, quanto mais próximo de “0”, maior a similaridade das sequências.

**Tabela 15** – Mutações nas regiões conservadas das sequências de enterococos.

Mutação <sup>a</sup>	Posição geral <sup>b</sup>	Posição sequência <sup>c</sup>
<b><i>E. faecium</i> 10</b>		
C (T)	845	90
G (A)	876	121
A (G)	993	237
A (G)	1004	249
G (A)	1005	250
<b><i>E. faecalis</i> H81</b>		
C (T)	845	800
G (A)	876	858
A (G)	993	947
A (G)	1004	959
G (A)	1005	960
<b><i>E. faecium</i> QS32</b>		
A (G)	993	729
C (T)	1003	740
A (G)	1004	741
G (A)	1005	742
T (C)	1028	765
<b><i>E. faecalis</i> OG1-X</b>		
A (G)	1023	1022
<b><i>E. faecalis</i> (EF105504.1)</b>		
T (C)	1028	1028
C (G)	1037	1037
<b><i>E. faecium</i> 138</b>		
C (T)	1049	292

<sup>a</sup> Relação de bases nitrogenadas que sofreram mutação: base nitrogenada na sequência, e, entre parênteses, base nitrogenada da sequência. <sup>b</sup> Posição da base no alinhamento. <sup>c</sup> Posição da base na sequência.

Os resultados apresentados no sequenciamento revelaram que os perfis de bandas observados na PCR foram independentes da confirmação do gene *gelE*. O resultado falso-positivo para o perfil de bandas nítidas foi observado em 36,8% (7/19) dos enterococos com este perfil; enquanto o resultado falso-negativo foi observado para um isolado de *Enterococcus* spp que expressou atividade gelatinase positiva. Observou-se que 50% (2/4) dos *E. faecium* que apresentaram atividade gelatinase positiva, também não foram confirmados para o gene *gelE*.

Resultados falso-positivos (como discutido no item 4.4) podem estar relacionados à baixa especificidade dos *primers*, cujas sequências não estão presentes no isolado avaliado (GORSKI; CSORDAS, 2010). Ao se analisar os *primers* utilizados no programa *primer blast* (conforme Apêndice D), foi observado

que estes se anelavam a três sequências de *E. faecalis*, com produtos de 419 pb para o gene *gelE*, mas não se anelavam com a sequência *E. faecium* QS32. Este fator pode justificar a não confirmação do gene *gelE* para dois *E. faecium* que expressaram a atividade gelatinase, pois as sequências destes isolados podem estar mais relacionadas à do *E. faecium* QS32 ou à outros genes que expressam atividade gelatinase positiva.

As culturas *E. faecalis* OG1-10 e *E. faecalis* ([EF105504.1](#)) que apresentaram maior identidade com as sequências de 31 enterococos avaliados são culturas relacionadas com a expressão da atividade gelatinase. A cultura *E. faecalis* OG1-10 foi o primeiro isolado clínico, com expressão de gelatinase a ser sequenciado, de acordo com Su et al. (1991) a expressão da sua atividade está relacionada a presença do aminoácido N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, sendo a mutação neste resíduo possivelmente relacionada a expressão da gelatinase, uma vez que a mutação resultou na deficiência da expressão da atividade da gelatinase.

Estudos posteriores demonstraram também que a expressão da atividade gelatinase está relacionada ao operon *fsr* que atua na expressão do gene *gelE* (QIN et al., 2001). A cultura *E. faecalis* ([EF105504.1](#)) foi sequenciada por sua atividade gelatinase estar envolvida com a inibição do sistema imune *in vivo* permitindo o desenvolvimento de infecções microbianas (PARK et al., 2007).

As mutações observadas podem estar relacionadas a fatores regionais de modificações das sequências, assim como com a sua expressão de virulência (EATON e GASSON, et al, 2001). A principal mutação foi observada para a cultura *E. faecium* 10, relacionada com a cultura *E. faecalis* H81, envolvida com o processo de formação de biofilmes (MACOVEI et al., 2009). No entanto, não se pode afirmar que as mutações da cultura *E. faecium* 10 estejam relacionadas com a formação de biofilmes observada para a cultura *E. faecalis* H81. Para se estudar ao certo a relação dessas mutações na expressão do gene *gelE*, deve-se estudar os fatores relacionados a expressão e o sequenciamento completo deste gene, que não foi o objetivo deste trabalho.

Os resultados observados no sequenciamento indicam a necessidade de estudos complementares a PCR para a identificação dos genes de virulência avaliados ou o desenho de *primers* baseados em regiões conservadas resultante do alinhamento das quatro sequências depositadas no banco de dados que tiveram similaridade com as sequências encontradas. Em relação à maior identidade das culturas com sequências conhecidamente patogênicas, observa-se a possível transferência do gene *gelE* de isolados clínicos para isolados de origem alimentar, o que se torna um fato preocupante no consumo de queijos de coalho de origem artesanal.

### 5.7 Propriedades tecnológicas

As propriedades tecnológicas foram avaliadas para 45 isolados de enterococos com o seguinte perfil: 27 *E. faecium* que não apresentaram nenhum perfil de virulência; 10 *E. faecium* e 2 *E. faecalis* que apresentaram três ou mais fatores genotípicos e fenotípicos de virulência; e 5 *E. faecium* e 1 *E. faecalis* que apresentaram três ou mais fatores genotípicos de virulência mas não expressaram os mesmos.

Para os 45 isolados foram avaliados os seguintes perfis de inerentes às culturas iniciadoras inoculadas em queijos em geral: produção de diacetil, atividade proteolítica, atividade lipolítica e perfil em leite tornassolado.

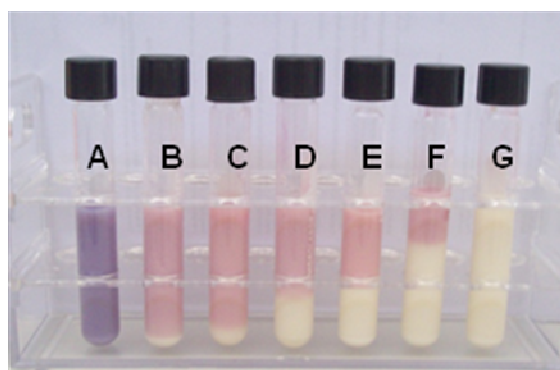
A reação em leite tornassolado ilustrada na Figura 10 revelou que todas as 45 (100%) culturas de enterococos avaliadas foram capazes de produzirem ácido láctico, proporcionando a redução da coloração do meio. A coagulação do meio por redução do pH não foi observada em apenas 2 isolados de *E. faecium*, sendo um pertencente ao grupo dos isolados não patogênicos e o outro aos patogênicos sem expressão de virulência. A atividade proteolítica não foi

observada em nenhum isolado tanto pelo perfil em leite tornassolado quanto em àgar leite desnatado.

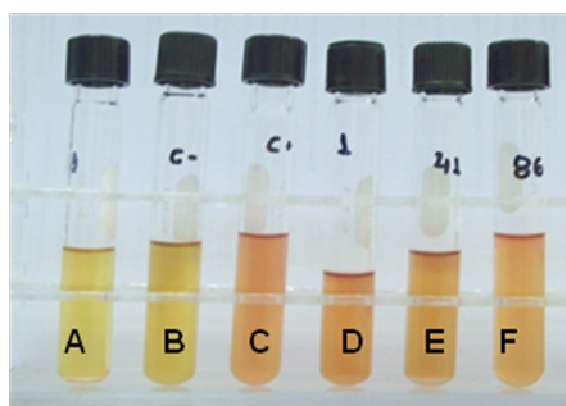
A produção de diacetil foi avaliada pelo desenvolvimento da coloração vermelha no meio conforme demonstrado na Figura 11. Esta reação foi observada em 13,3% (6/45) dos isolados, todos caracterizados como *E. faecium*. Destes, 3 pertenciam ao grupo dos isolados não patogênicos, 2 ao grupo dos patogênicos sem expressão de virulência e 1 ao grupo dos patogênicos com expressão de virulência.

A atividade lipolítica foi observada para 33,3% (15/45) dos isolados sendo todos caracterizados como *E. faecium*, com 11 isolados pertencentes ao grupo dos não patogênicos e, 4 pertencentes ao grupo dos patogênicos com expressão de virulência.





**Figura 10** – Perfil em leite tornassolado das culturas de *E. faecium* e *E. faecalis* após 14 dias de incubação a 35 °C. Tubo A (coloração roxa): controle negativo, sem inoculação; tubo B: isolado que produziu ácido, mas não coagulou o meio; tubos C – G : isolados que produziram ácido e coagularam o meio.



**Figura 11** - Produção de diacetil pelos isolados de *E. faecium* e *E. faecalis*. Tubo A: branco da reação (reagentes sem microrganismos); Tubo B: controle negativo, cultura comercial mista de *L. lactis* e *L. cremoris* (CHR Hansen®) não produtoras de diacetil; Tubo C: controle positivo, cultura comercial de *L. helveticus* (Ezal®) produtora de diacetil. Tubos D - F: *E. faecium* considerados positivos para a produção de diacetil.

A Tabela 16 representa o perfil geral das características tecnológicas dos *E. faecium* que produziram diacetil ou atividade lipolítica relacionados com o perfil em leite tornassolado. Observa-se que apenas um isolado não patogênico, foi capaz de produzir diacetil, ácido e atividade lipolítica simultaneamente. Para os demais *E. faecium* produtores de diacetil, observou-se que no perfil em leite tornassolado, não foi observada coagulação do leite apenas para o isolado patogênico sem expressão de virulência. Todos os isolados que apresentaram

atividade lipolítica produziram ácido e coagularam o leite, com exceção da cultura produtora de diacetil.

**Tabela 16** – Perfil de propriedades tecnológicas dos isolados de *E. faecium* que produziram diacetil e /ou apresentaram atividade lipolítica.

Isolado	Produção de diacetil	Atividade lipolítica	Perfil em leite tornassolado	
			Coagulação do leite	Produção de ácido
<b>Não Patogênicos</b>				
<i>E. faecium</i> 02	+	-	+	+
<i>E. faecium</i> 04	+	+	-	+
<i>E. faecium</i> 22	-	+	+	+
<i>E. faecium</i> 23	-	+	+	+
<i>E. faecium</i> 24	-	+	+	+
<i>E. faecium</i> 34	+	-	+	+
<i>E. faecium</i> 90	-	+	+	+
<i>E. faecium</i> 91	-	+	+	+
<i>E. faecium</i> 108	-	+	+	+
<i>E. faecium</i> 109	-	+	+	+
<i>E. faecium</i> 110	-	+	+	+
<i>E. faecium</i> 112	-	+	+	+
<i>E. faecium</i> 115	-	+	+	+
<b>Patogênicos com expressão de virulência</b>				
<i>E. faecium</i> 76	-	+	+	+
<i>E. faecium</i> 86	+	-	+	+
<i>E. faecium</i> 103	-	+	+	+
<i>E. faecium</i> 130	-	+	+	+
<i>E. faecium</i> 134	-	+	+	+
<b>Patogênicos sem expressão de virulência</b>				
<i>E. faecium</i> 01	+	-	-	+
<i>E. faecium</i> 41	+	-	+	+

Ao se analisar as 45 culturas de *E. faecium* e *E. faecalis*, observou-se que a 86,7% (39/45) possuíam metabolismo homofermentativo, pois foram capazes de produzir ácido suficiente para promover coagulação ácida do leite e não foram produtoras de diacetil. Observou-se também que o metabolismo heterofermentativo foi observado apenas para isolados de *E. faecium*,

Outros estudos que observaram a predominância de culturas heterofermentativas em enterococos isolados de queijos. Sarantinopoulos et al (2001) estudaram as propriedades tecnológicas de diversas culturas de *E. faecium*, *E. faecalis* e *E. durans*, observando a produção de ácido para menos de 5% dos *E. faecium* e *E. faecalis* avaliados, porém, verificaram que a maior parte

das culturas produziam compostos de metabolismo secundário, sendo portanto consideradas heterofermentativas. Perri (2010), também observou em culturas de *Enterococcus* isoladas de queijo de coalho, baixa capacidade acidificante e maior quantidade de isolados produtores de diacetil.

A predominância de culturas homofermentativas no presente estudo demonstra que estas atuam como fermento primário na produção dos queijos de coalho avaliados. Nas etapas iniciais de processamento dos queijos estas auxiliariam na redução do pH do leite, o que é fundamental para auxiliar na coagulação e seleção das culturas ácido-tolerantes (SARANTINOPOULOS et al, 2001; WALSTRA et al., 2006).

A atividade lipolítica proporcionada pelas culturas lácticas está relacionada a quebra de ácidos graxos em cadeias menores, proporcionando a maciez do produto e a formação de compostos aromáticos, pela liberação de ácidos graxos de cadeia curta (FOULQUIÉ-MORENO et al., 2006, WALSTRA et al., 2006). Esta atividade também foi observada por Centeno et al. (1999), em duas variedades de *E. faecalis* aplicadas em queijo cebreiro.

Embora não se tenha observado a presença de atividade proteolítica em nenhum *E. faecium* ou *E. faecalis* avaliado, de acordo com Mamede (2008) esta não é uma atividade desejável ao queijo de coalho, pois atua na fragilização da rede protéica do queijo, contribuindo para o aumento da capacidade de derretimento do mesmo, o que é uma característica indesejável a este tipo de queijo.

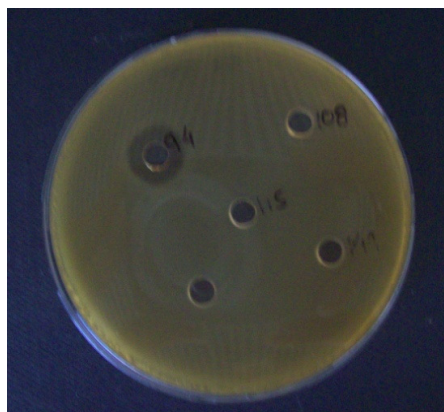
O perfil das propriedades tecnológicas das culturas de *E. faecium* e *E. faecalis* avaliadas revelou que tanto as culturas sem potencial de patogenicidade quanto as patogênicas contribuem para o desenvolvimento das características sensoriais do queijo de coalho de produção artesanal. Este dado torna preocupante o uso de culturas não selecionadas no processamento artesanal de queijo, ou a seleção de culturas iniciadoras de enterococos levando-se em consideração apenas o perfil fenotípico de virulência, uma vez que genes

de virulência “silenciosos” podem ser ativados sob condições ideais de expressão. Embora as culturas de *E. faecium* sem potencial de patogenicidade possuam propriedades tecnológicas interessantes ao processamento de queijos de coalho, estudos mais aprofundados sobre o potencial de aquisição de genes de virulência devem ser realizados com estas culturas, dada as características de transferência de genes inerentes aos enterococos.

## 5.8 Avaliação do espectro de atividade antimicrobiana de isolados não patogênicos

O espectro de atividade antimicrobiana foi avaliado para 9 isolados de *E. faecium* que não demonstraram perfil de virulência, nem resistência a antibióticos. Os ensaios foram realizados em triplicata contra culturas conhecidamente patogênicas: *Bacillus cereus* R1-132, *Bacillus cereus* E1-048, *Listeria monocytogenes* E1-007, *Listeria monocytogenes* C1-030, *Staphylococcus aureus* E1-090, todas isoladas de produtos lácteos e uma cepa de *S.aureus* ATCC 6539. A atividade antimicrobiana dos *E. faecium* foi determinada pela medição do diâmetro do halo de inibição de cada patógeno avaliado, conforme ilustrado na Figura 12.

De acordo com a Tabela 17, a única cultura que apresentou espectro de atividade antimicrobiana foi o *E. faecium* 94. Esta inibiu o crescimento apenas das culturas *L. monocytogenes* C1-030 e E1-007. Observou-se no primeiro ensaio, diâmetros de inibição de 6 e 8 mm, para as culturas C1-030 e E1-007, respectivamente. Nos outros dois ensaios, não foi verificada a formação de halo de inibição para a cultura C1-030, e, para a cultura E1-007 o halo de inibição foi de 6 mm em ambos ensaios.



**Figura 12** – Avaliação da inibição do crescimento da cultura *L. monocytogenes* E1-007 pelo sobrenadante de *E. faecium* 94, através da formação de halos de inibição.

**Tabela 17** – Distribuição da inibição do crescimento das culturas *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *B. cereus* pelos isolados de *E. faecium*.

Cultura <sup>a</sup>	Diâmetros dos Halos de inibição (mm)					
	<i>L. monocytogenes</i>		<i>S. aureus</i>		<i>B. cereus</i>	
	C1-030	E1-007	E1-090	ATCC 6539	E1-048	R1-132
02	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0
33	0	0	0	0	0	0
90	0	0	0	0	0	0
94	6/0/0 <sup>b</sup>	8/6/6 <sup>b</sup>	0	0	0	0
108	0	0	0	0	0	0
115	0	0	0	0	0	0
127	0	0	0	0	0	0
149	0	0	0	0	0	0

<sup>a</sup> Identificação dos nove isolados de *E. faecium* avaliados para o espectro de atividade antimicrobiana.

<sup>b</sup> Diâmetros dos halos de inibição em cada um dos três ensaios.

A atividade inibidora ao gênero *Listeria* também foi observada em outros estudos realizados com culturas de *Enterococcus* spp. Sarantinopoulos et al. (2002) observaram a inibição de *L. innocua* pela cultura *E. faecium* FAIR-E 198, no processamento de queijo feta na Grécia. Nascimento et al. (2010) também verificaram que a mesma cultura de *E. faecium* produziu bacteriocinas ativas contra dez culturas de *L. monocytogenes*, com halo de inibição variável entre 5 e 13 mm de diâmetro. No mesmo estudo, esta cultura não produziu atividade antimicrobiana contra 5 culturas de *S. aureus* e 25 de *B. cereus*.

Outros estudos verificaram a inibição da atividade de outras bactérias gram-positivas por *Enterococcus* spp. Mirhosseini et al., (2008) observaram que 10 culturas de *Enterococcus* spp, entre 105 bactérias ácido-lácteas isoladas de alimentos, foram capazes de inibir o crescimento de *L. monocytogenes* e *Lactococcus lactis*, e apenas uma cultura foi capaz de inibir o crescimento de *B. cereus*. Gonzáles et al. (2007) verificaram a inibição de *Clostridium tyobutyricum* e *L. monocytogenes* por culturas de *E. faecalis* isolados no processamento de queijo gentsco na Espanha.

A presença de atividade antimicrobiana proporcionada por enterococos está geralmente relacionada à produção de enterocinas, que possuem atividade bactericida ou bacteriostática contra bactérias Gram-positivas (NAIDU et al., 2006; O'SULLIVAN, 2007).

A inibição prioritária de culturas do gênero *Listeria* pode estar relacionada à síntese de enterocinas pertencentes a classe IIa, entre elas as pediocinas. Acredita-se que a ação específica contra *L. monocytogenes* esteja relacionada à interação entre estas enterocinas e a manose transferase do sistema fosfotransferase  $EII_t^{Man}$  da *L. monocytogenes*, porém seu mecanismo ainda não é bem estabelecido (COTTER; HILL; ROSS; 2005).

O decréscimo do espectro da atividade antimicrobiana observado para a cultura *E. faecium* 094 em relação duas culturas de *L. monocytogenes* avaliadas pode estar relacionado a tanto com a inibição da produção das enterocinas quanto com o desenvolvimento de mecanismos de resistência pelas culturas de *L. monocytogenes* (COTTER; HILL; ROSS; 2005).

O desenvolvimento de mecanismos de resistência a bacteriocinas tem sido observado em culturas de *L. monocytogenes*. De acordo com Cotter et al. (2005) esses mecanismos de resistência podem estar relacionados a inibição da expressão do sistema manose transferase do sistema fosfotransferase, que permite a ação das pediocinas, ou pela inibição natural à nisina.

A produção de enterocinas e sua eficiência estão relacionadas a fatores genéticos das culturas bacteriocigênicas, condições químicas e físicas do meio que afetam a atividade enzimática e conseqüente eficiência das enterocinas. Sarantinopoulos et al (2002), verificaram que em meio MRS a produção de enterocinas pela cultura *E. faecium* foi melhor do que em leite desnatado, onde essa produção foi baixa.

Fouliquié-Moreno et al. (2002) avaliaram a influência de fatores ambientais na produção de enterocinas por duas culturas bacteriocigênicas de

*E. faecium*, durante o processamento de queijo cheddar. Ao se avaliar as culturas de *E. faecium* separadamente, foi observado que as condições de fermentação estão estreitamente relacionadas à produção das enterocinas. Para uma das culturas de *E. faecium*, observou-se que a maior produção de enterocinas ocorreu em caldo MRS na fase de crescimento logarítmico da cultura, em pH 5,5 e na presença de lactose ao invés de glicose, como fonte de carboidrato. A menor ou decréscimo na produção de enterocinas foi observada durante a fase estacionária de crescimento das culturas bacteriocigênicas, em elevadas concentrações de lactose e na substituição do meio MRS por leite desnatado. No processamento do queijo cheddar em escala piloto, foi observada estabilidade na síntese de enterocinas durante o processo de maturação.

Os resultados dos estudos apresentados indicam que talvez a redução da atividade antimicrobiana da cultura *E. faecium* 94 possa estar relacionada a fase de crescimento da mesma. Nas três repetições dos ensaios de atividade antimicrobiana foram utilizados os mesmos meios de cultura e as mesmas condições de crescimento. Porém a alteração na velocidade de crescimento da cultura *E. faecium* 94 possa ter influenciado na mudança da atividade antimicrobiana da cultura, mas, não se descarta a possibilidade de desenvolvimento de mecanismos de resistência para a cultura *L. monocytogenes* C1-030, uma vez que houve inibição total da atividade antimicrobiana proporcionada pela *E. faecium* 94.

Embora se observe a atividade antimicrobiana relacionada à produção de enterocinas por enterococos não se pode afirmar que a atividade observada para a cultura *E. faecium* 94 esteja relacionada exclusivamente com este fator. associação de bacteriófagos com enterococos também pode acarretar na incidência de atividade antimicrobiana (COTTER; HILL; ROSS; 2005; DAW; FALKINER, 1996).



## 6 CONCLUSÕES

O perfil de virulência das 150 culturas de enterococos revelou que apenas 18 % dos enterococos não estão envolvidos com nenhum determinante de virulência e/ ou de resistência a antibióticos, sendo todos caracterizados como *E. faecium*.

A espécie *E. faecium* apresentou maior incidência nos isolados de enterococos. Para esta espécie observou-se maior distribuição de expressão e incidência do gene *geE*, e a presença de múltiplos determinantes genotípicos de virulência. Todos os isolados de *E. faecalis* estavam relacionados com pelo menos um determinante de virulência avaliado.

A confirmação do gene *geE* por sequenciamento, demonstrou a necessidade de se complementar a identificação genotípica pela PCR com outros métodos moleculares, uma vez que o perfil da PCR não foi conclusivo para a presença deste gene.

A avaliação das propriedades tecnológicas demonstrou que os enterococos podem estar envolvidos com as características sensoriais dos queijos de coalho. Porém, tanto isolados de *E. faecium* que não apresentaram perfil de patogenicidade quanto os isolados com múltiplos determinantes de virulência foram capazes de produzir diacetil, ácido láctico e atividade lipolítica.

Os dados apresentados demonstraram os riscos inerentes à seleção de culturas de enterococos para serem utilizadas como fermentos lácteos, uma vez que geralmente a seleção destas segue apenas a relação com a expressão de fatores fenotípicos de virulência.

Apenas um isolado de *E. faecium* sem potencial de patogenicidade demonstrou atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes*, mas não foi capaz de inibir o crescimento das culturas de *S. aureus* e *B. cereus*

O uso das culturas de enterococos sem potencial de patogenicidade e com potencial tecnológico deve ser cuidadosamente estudado em virtude das características de aquisição e doação de genes de virulência destes e do pouco conhecimento sobre a relação de desenvolvimento de infecções causadas pela ingestão de enterococos em alimentos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, C.R. **Diagnóstico da qualidade microbiológica de queijo serra da canastra e caracterização de bactérias do gênero *Enterococcus***. 2009. 112 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009

ANDREOTTI, R.; NICODEMO, M. L. F. **Uso de Antimicrobianos na Produção de Bovinos e Desenvolvimento de Resistência**. Campo Grande: Embrapa, 2004, 50 p.

BORGES, M. F. et al. Microrganismos patogênicos e indicadores em queijo de coalho produzido no estado do Ceará, Brasil. **Boletim CEPPA**, v. 21, n. 1, p. 31-40, 2003.

BRADLEY; FRAISE. Heat and chemical resistance of enterococci. **Journal of hospital infection**, v. 34, p. 191 – 196, 1996.

BRASIL. Instrução Normativa nº 30 de 26 de junho de 2001. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de manteiga de terra, queijo de coalho e queijo de manteiga. **Diário Oficial da União**, Brasília, 16 jul. 2001

BROLAZO, E. M. **Seleção e utilização de bactérias lácticas produtoras de diacetil em leite e derivados**. 2003. 98 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

CAMARGO. **Estudo dos fatores de virulência em *Enterococcus* sp. isolados no Brasil**. 2005. 153 p. Tese (Doutorado em Biociências Aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Riberão Preto, 2005.

CARLOS, A. R. et al. Enterococci from artisanal dairy products show high levels of adaptability. **International Journal of Food Microbiology**, v.129, p. 194–199, 2009.

CARVALHO, J. D. G. **Caracterização da Microbiota láctica isolada de queijo de Coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas**. 2007. 154p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

CENTENO, J. A. et al., Effects of the addition of *Enterococcus faecalis* in Cebreiro cheese manufacture. **International Journal of Food Microbiology**, v. 48 , p. 97–111, 1999.

CHAVERS, L. S. et al. Vancomycin-resistant enterococci: 15 years and counting. **Journal of Hospital Infection**, v. 53, p. 159 – 171, 2003.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS , R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature reviews: microbiology**, v.3, p. 777 – 788, 2005

COURVALIN, P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, p S25–S34., 2006.

DAW, M. A.; FALKINER, F. R. Bacteriocins: Nature, Function and Structure. **Micron**, v. 27, n. 6, p. 467 479, 1996

DE VUYST, L.; FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; REVETS, H. Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 84 , p. 299 - 318, 2003.

DURLU-OZKAYA, F. et al.; Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes' milk. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 5, p. 861-870, 2001

DUTKA-MALEN, S; EVERS, S; COURVALIN, P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 24-27, 1995.

EATON, T. J.; GASSON, M. J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potencial genetic exchange between food and medical isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 1228-1235, 2001.

ELSNER, V. Virulence factors of *E. faecalis* and *E. faecium* blood culture isolates. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 19, p.39-42, 2000.

FANTINATTI, F.; OLIVEIRA, V. M. **Técnicas moleculares e índices estatísticos**. Campinas: CBAB, 2008, p. 1 – 11.

FARBER, J. M. et al. Molecular Typing and Differentiation. In: In: DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 ed. Washington, D.C.: American Public Health Association, 2001. 676 p.

FEITOSA, T et al. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico – sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 23 (Supl): 162-165, 2003.

FERNANDES, M. S. **Avaliação de riscos e de pontos críticos de contaminação por *Enterococcus* spp. e *Bacillus cereus* no processamento de ricota**. 2010. 152 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

FERREIRA, A. E. **Estudo de bacteriocinas produzidas por espécies de *Enterococcus***. 2005. 126 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2005.

FOULQUIÉ-MORENO, M.R. et al. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, p.1 – 24, 2006.

FRANZ, C. M. A. P.; HOLZAPFEL, W.H. Enterococci. In: MOTARJEMI, Y.; ADAMS, M. **Emerging foodborne pathogens**. New York: CRC Press. 2006. p. 557 – 613.

FRANZ, C. M. A. P.; HOLZAPFEL, W.H., The Genus *Enterococcus*: Biotechnological and Safety Issues. In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. **Lactic acid bacteria and functional aspects**, 3 ed. New York: Marcel Dekker, p. 199 – 231, 2004

FRANZ, C. M. A. P. et al. Enterococci in foods: a conundrum for food safety. Review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, n. 2/3, p. 105-122, 2003.

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

FURRER, B. et al. Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and in milk by in vitro amplification of haemolysin gene fragments. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 70, n°5, p. 372-379, 1991.

GARCIA, M. C. et al. Study of enterococci and micrococci isolated throughout manufacture and ripening of San Simón cheese. **Food Microbiology**, v. 19, p. 23 – 33, 2002

GARCÍA, M. T. et al. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin EJ97 produced by *Enterococcus faecalis* EJ97. **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, p.161– 170, 2004.

GASPAR, F. et al. Virulence of *Enterococcus faecalis* dairy strains in an insect model: the role of *fsrB* and *geIE*. **Microbiology**, v.155, p. 3564 – 3571, 2009.

GIRAFFA, G. *Enterococcus* from foods. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 163 -171, 2002.

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

GOMES, B. et al. Correlation between *api 20* strep and multiplex pcr for identification of *Enterococcus* spp. Isolated from Brazilian foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 617-619, 2007.

GOMES, B. et al. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. **Food Microbiology**, v. 25 , p. 668–675, 2008

GONZÁLEZ, L. et al. Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. **Food Control**, p. 18, p. 716–722, 2007

GORSKI, I.; CSORDAS, A. **Molecular Detection:Principles and Methods**. Taylor and Francis Group, LLC, 2010, p. 1-21.

HARRIGAN, W. F. **Laboratory Methods in Food Microbiology**. 3<sup>rd</sup> ed. SanDiego: Academic Press, 1998, 532 p.

HARTMAN, P.A.; DEIBEL, R.H.; SIEVERDING, L. Enterococci. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4 ed.** Washington, D.C.: American Public Health Association, 2001. 676 p.

HEATON, M. P. et al. Mobilization of vancomycin resistance by transposon-mediated fusion of a VanA plasmid with an *Enterococcus faecium* sex pheromone-response plasmid. **Gene**, v. 171, p. 9 – 17, 1996.

HOOVER, D. G; CHEN, H. Bacteriocins with Potential for Use in Foods. In: \_\_\_\_\_. **Antimicrobials in Food**. 1 ed. Taylor & Francis Group, 2005. p. 390 – 395.

HOSSEINI et al., S. V. Molecular and probiotic characterization of bacteriocinproducing *Enterococcus faecium* strains isolated from nonfermented animal foods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 1392–1403, 2009

HUGAS, M.; GARRIGA, M.; AYMERICH, M.T. Functionalty of enterococci in meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 223– 23, 2003.

JARVIS, W. R; MARTONE, W, J. **Journal of Antimicrobial Chemother**, v. 29, p. 19-24, 1992.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed. Curitiba: Artmed, 2005. 711 p.

KHAN, S. A. et al. Molecular characterization of multidrug-resistant *Enterococcus* spp . from poultry and dairy farms : detection of virulence and vancomycin resistance gene markers by PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v. 19, p. 27– 34, 2005.

KLARE, Ingo et al. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 269 - 290, 2003.

LOPES, M. F. et al. Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci. **International Journal of Food Microbiology**, v. 112, p. 208– 214, 2006

MACOVEI , L. et al. *Enterococcus faecalis* with the gelatinase phenotype regulated by the *fsr* operon and with biofilm-forming capacity are common in the agricultural environment. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 6, p.1540–1547 2009

MADIGAN, M. T.; Martinko, J. M.; Parker, J. **Microbiologia de Brock**. 10 ed. São Paulo : Prentice-Hall, 2008, 608 p.

MAMEDE, P. L. **Efeito da temperatura de cozimento sobre as propriedades tecnológicas do queijo coalho**. 2008. 97 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008

MANNU, L. et al. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 291– 304, 2003.

MARQUES; E. B.; SUZART, S. Occurrence of virulence-associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina, Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v.53, p. 1069–1073, 2004

MATTIOLI, S. R.; PASSOS-BUENO, M. R. S. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismo de ácidos nucléicos. In: Matioli, S.R. **Biologia Molecular e Evolucao**, Ribeirao Preto: Holos Editora.2001, p. 153 – 161.

MIRHOSSEINI , M. et al. Incidence and antibiotic susceptibility of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from dairy products. **International Journal of Dairy Technology**, v. 61, n.4, p. 391 – 396, 2008

MUNDY, L. M.; SAHM, D. F. AND GILMORE, M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 13, n. 4, p. 513-522, 2000

NAIDU, A.S.; RAGIP, U.; TULPINSKI, J. Bacteriocins: Antimicrobial Activity and Applications. In: SHETTY, KALIDAS et al. **Food Biotechnology**. 2 ed. New York: Taylor Francis Group, 2006.

NALLAPAREDDY , S. R. et al. Diversity of *ace*, a Gene Encoding a Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules, from Different Strains of *Enterococcus faecalis* and Evidence for Production of Ace during Human Infections. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 9, p. 5210–5217, 2000.

NAN, H. M. et al. Antimicrobial Resistance of Enterococci Isolated from Mastitic Bovine Milk Samples in Korea. **Zoonoses Public Health**, v. 57, p. 59 – 64, 2010.

NASCIMENTO, M. S.; MORENO, I.; KUAYE, A. Y. Antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* fair-e 198 against gram-positive pathogens. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 74-81, 2010.

NCCLS. Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard – Eighth edition, NCCLS document M2-A\* (ISBN 1-56238- 485-6). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania.19087-1898 USA, 2003.

OGGIER, J.C.; SERROR, P. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. **International Journal of Food Microbiology**. v. 126, p. 291 – 301, 2008.

O'SULLIVAN, L. et al. **Bacteriocins: changes in cheese flora and flavour**. Ireland: Woodhead Publishing Limited, 2007, p. 327 – 348.

PARK , S. Y. et al. Extracellular Gelatinase of *Enterococcus faecalis* Destroys a Defense System in Insect Hemolymph and Human Serum. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 4, p. 1861–1869, 2007



PERRI, J. M. **Bactérias do gênero *Enterococcus* em queijo de coalho influência do processamento na seleção microbiana, perfil tecnológico e implicações em segurança de alimentos.** 2010. 93 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010

POZNANSKI, E. et al. Indigenous raw milk microbiota influences the bacterial development in traditional cheese from an alpine natural park. **International Journal of Food Microbiology**, v. 92, p. 141– 151, 2004.

QIN, X. et al. Characterization of *fsr*, a Regulator Controlling Expression of Gelatinase and Serine Protease in *Enterococcus faecalis* OG1RF. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 3372 – 3382, 2001.

RICE, L. B. et al. A Potential Virulence Gene, *hyl*<sub>Efm</sub>, Predominates in *Enterococcus faecium* of Clinical Origin. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 187, p. 508 – 512, 2003.

RICHARDS, M.J. et al. Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. **Infection Control Hospital Epidemiology**, v. 21, p. 510–515, 2000.

RINCE, A.; Flahaut, S.; Auffray, Y. Identification of general stress genes in *Enterococcus faecalis*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 55, p. 87 - 91 2000.

SARANTINOPOULOS, P. et al. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 621–647, 2002

SARANTINOPOULOS, P. et al. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 621–647, 2001

SEMEDO, T. et al. 2003 Comparative Study Using Type Strains and Clinical and Food Isolates To Examine Hemolytic Activity and Occurrence of the *cyl* Operon in Enterococci. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, v. 41, n. 6, p. 2569– 2576, 2003 a

SEMEDO, T. et al., Virulence Factors in Food, Clinical and Reference Enterococci: A Common Trait in the Genus? **Systematic. Applied. Microbiology**, v. 26, p. 13– 22, 2003 b

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

SHERPARD, B.D; GILMORE, M. S. Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 215–224, 2002.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos**. 3 ed. São Paulo: Varela, 2007. 552 p.

SU, Y. A. et al. Nucleotide Sequence of the Gelatinase Genes (*gelE*) from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 1, p. 415-420, 1991.

TILLOTSON, G. An evaluation of the API-20 STREP system. **Technical methods**, 1981

TOGAY, S. O. et al. Virulence genes, antibiotic resistance and plasmid profiles of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from naturally fermented Turkish foods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p. 1084–1092, 2010

VALENZUELA, Antonio Sánchez et al. Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in enterococci from artisan foods of animal origin. **Food Control**, v. 20, p. 381–385, 2009.

VANKERCKHOVEN, V. et al. Development of a Multiplex PCR for the Detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* Genes in Enterococci and Survey for Virulence Determinants among European Hospital Isolates of *Enterococcus faecium*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4473–4479, 2004

VELASCO, D. et al. Lack of correlation between phenotypic techniques and PCR-based genotypic methods for identification of *Enterococcus* spp. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.49, p.151–156, 2004.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J.T.M.; GEURTS, T.J. **Dairy Science and Technology**. Ed. 2. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York, 2006, 744p.

WINSTON, L. G. et al. API 20 Strep identification system may incorrectly speciate enterococci with low level resistance to vancomycin. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 48, p. 287–288, 2004

ZIRAKZADEH, A.; PATEL, R. Epidemiology and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. **Current Opinion in Infectious Diseases**,v. 18, p.:507–512, 2005.

**APÊNDICE A** – Relação dos determinantes fenotípicos e genotípicos de virulência de cada isolado de queijo de coalho.

Queijo	Isolado	Espécie (PCR)	Fenótipo de virulência		Resistência a antibióticos	Genótipo de virulência								
			Hemólise	Gelatinase		ace	as	cy/A	cy/B	cy/M	efaA	esp	ge/E	vanA
QC1	1	<i>E. faecium</i>	-	-	---	+	-	-	-	-	+	+	+	+/-
QC1	2	<i>E. faecium</i>	-	-	---	-	-	-	-	-	-	-	-	-
QC1	3	<i>E. faecium</i>	-	-	---	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-
QC1	4	<i>E. faecium</i>	-	-	---	-	-	-	-	-	-	-	-	-
QC1	5	<i>E. faecium</i>	-	-	---	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-
QC1	6	<i>E. faecium</i>	-	-	---	-	-	+/-	-	+/-	-	-	-	-
QC1	7	<i>E. faecium</i>	-	-	---	-	-	-	-	-	-	-	-	-
QC1	8	<i>E. faecium</i>	-	-	---	-	-	+/-	-	+/-	-	-	+/-	-
QC1	9	<i>E. faecium</i>	-	-	---	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-
QC1	10	<i>E. faecium</i>	-	-	eri	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-
QC1	11	<i>E. faecium</i>	-	-	---	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-
QC1	12	<i>E. faecium</i>	-	-	---	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-
QC2	13	<i>E. faecium</i>	-	-	---	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-
QC2	14	<i>E. faecium</i>	-	-	---	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-
QC2	15	<i>E. faecium</i>	-	-	---	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-
QC2	16	<i>E. faecium</i>	-	-	---	-	-	-	-	-	-	-	-	-
QC2	17	<i>E. faecium</i>	-	-	eri	-	-	+/-	-	+/-	-	-	+/-	-
QC2	18	<i>E. faecium</i>	-	-	eri	-	-	-	-	-	-	-	-	-
QC2	19	<i>E. faecium</i>	-	+	---	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-
QC2	20	<i>E. faecium</i>	-	-	---	-	-	-	-	-	-	-	-	-
QC2	21	<i>E. faecium</i>	-	-	---	-	-	-	-	-	-	-	-	-
QC2	22	<i>E. faecium</i>	-	-	---	-	-	-	-	-	-	-	-	-
QC2	23	<i>E. faecium</i>	-	-	---	-	-	-	-	-	-	-	-	-
QC2	24	<i>E. faecium</i>	-	-	---	-	-	-	-	-	-	-	-	-
QC2	25	<i>E. faecium</i>	-	-	---	-	-	-	-	-	-	-	-	-
QC3	26	<i>E. faecium</i>	-	-	---	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-
QC3	27	<i>E. faecium</i>	-	-	eri	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-
QC3	28	<i>E. faecium</i>	-	-	---	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-
QC3	29	<i>E. faecium</i>	-	-	eri	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-
QC3	30	<i>E. faecium</i>	-	-	---	-	-	-	-	-	-	+	-	-







Queijo	Isolado	Espécie (PCR)	Fenótipo de virulência		Resistência a antibióticos	Genótipo de virulência								
			Hemólise	Gelatinase		ace	as	cyIA	cyIB	cyIM	efaA	esp	geE	vanA
QC11	124	<i>E. faecium</i>	-	-	---	-	-	-	-	-	-	-	+	-
QC11	125	<i>E. faecium</i>	+	-	---	-	-	-	+	-	-	-	+	-
QC12	126	<i>E. faecium</i>	-	-	eri	-	-	-	-	-	-	+	-	-
QC12	127	<i>E. faecium</i>	-	-	C.R	-	-	-	-	-	-	-	-	-
QC12	128	<i>E. faecalis</i>	-	-	---	+	-	-	-	-	+	+	+	-
QC12	129	<i>E. faecium</i>	-	-	eri	-	-	-	-	-	-	-	-	-
QC12	130	<i>E. faecium</i>	-	-	tet	+	-	-	-	-	+	+	+	-
QC12	131	<i>E. faecium</i>	-	-	eri	-	-	-	-	-	+/-	+/-	-	-
QC12	132	<i>E. faecium</i>	-	-	C.R	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-
QC12	133	<i>E. faecium</i>	+	-	---	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-
QC12	134	<i>E. faecium</i>	+	-	---	+	-	-	-	-	+	+	+	-
QC12	135	<i>E. faecium</i>	+	-	C.R	-	-	-	-	-	-	-	+	-
QC12	136	<i>E. faecium</i>	-	-	---	-	-	-	-	-	-	-	-	+
QC13	137	<i>E. faecium</i>	+	-	---	-	-	-	-	-	-	-	-	-
QC13	138	<i>E. faecium</i>	+	-	---	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-
QC13	139	<i>E. faecium</i>	+	-	---	-	-	-	-	-	-	-	-	-
QC13	140	<i>E. faecium</i>	+	-	---	-	-	-	-	-	-	-	-	-
QC13	141	<i>E. faecium</i>	-	-	---	-	-	-	-	-	+	+	+	-
QC14	142	<i>Enterococcus</i> spp	-	-	C.R	-	-	-	-	-	-	-	+	-
QC14	143	<i>E. faecium</i>	+	-	---	-	-	-	-	-	+/-	-	+	-
QC14	144	<i>Enterococcus</i> spp	-	-	---	-	-	-	-	-	-	-	-	-
QC14	145	<i>E. faecium</i>	-	-	---	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-
QC14	146	<i>E. faecium</i>	-	-	C.R	-	-	-	-	-	-	+	+/-	-
QC14	147	<i>E. faecium</i>	-	-	eri, tet	-	-	-	-	-	+	-	-	-
QC14	148	<i>E. faecium</i>	+	-	C.R	-	-	-	-	-	-	-	-	-
QC14	149	<i>E. faecium</i>	-	-	---	-	-	-	-	-	-	-	-	-
QC14	150	<i>E. faecium</i>	+	-	---	-	-	-	-	-	-	-	-	-

C.R. : isolados foram recuperados em caldo BHI, mas não cresceram em ágar Mueller- Hinton na duplicata do teste. eri: eritromicina, tet: tetraciclina, van: vancomicina.

(+):Fator de expressão fenotípica de virulência positivo ou isolados com perfil de bandas nítidas do tamanho esperado para o fragmento do gene de virulência avaliado. (-): Ausência de fator de expressão fenotípica de virulência, ou isolados que não apresentaram fragmento do gene de virulência avaliado. , (+/-):Fator de expressão fenotípica de virulência negativo ou isolados com perfil de bandas pouco nítidas do tamanho esperado para o fragmento do gene de virulência avaliado.



**Apêndice B** – Relação entre o perfil *ge/E* e a qualidade das bases seqüenciadas.

Isolado	Espécie	Perfil de banda <i>ge/E</i>	Gel <sup>b</sup>	Primer	Bases seqüenciadas com qualidade >20 <sup>a</sup> (pb)
ATCC 29212	<i>E.faecalis</i>	+	N.D	TE09	352
				TE10	373
01	<i>E.faecium</i>	+	-	TE09	373
				TE10	360
08	<i>E.faecium</i>	+/-	-	TE09	32
				TE10	58
10	<i>E.faecium</i>	+/-	-	TE09	328
				TE10	336
12	<i>E.faecium</i>	+/-	-	TE09	336
				TE10	315
13	<i>E.faecium</i>	+/-	-	TE09	26
				TE10	68
17	<i>E.faecium</i>	+/-	-	TE09	336
				TE10	351
19	<i>E.faecium</i>	+/-	+	TE09	347
				TE10	351
35	<i>E.faecium</i>	+/-	-	TE09	365
				TE10	353
36	<i>Enterococcus</i> spp	+/-	-	TE09	23
				TE10	90
37	<i>E.faecium</i>	+	-	TE09	58
				TE10	21
39	<i>E.faecium</i>	+	-	TE09	334
				TE10	347
40	<i>E.faecium</i>	+/-	-	TE09	86
				TE10	116
41	<i>E.faecium</i>	+	-	TE09	202
				TE10	291
45	<i>Enterococcus</i> spp	+/-	-	TE09	364
				TE10	331
47	<i>E.faecium</i>	+/-	-	TE09	328
				TE10	350
49	<i>E.faecium</i>	+	-	TE09	341
				TE10	344
51	<i>E.faecium</i>	+/-	+	TE09	41
				TE10	10
61	<i>E.faecium</i>	+/-	-	TE09	21
				TE10	24
62	<i>E.faecium</i>	+/-	+	TE09	13
				TE10	35
65	<i>E.faecium</i>	+	-	TE09	350
				TE10	340
66	<i>E.faecium</i>	+	-	TE09	331
				TE10	341

Isolado	Espécie	Perfil de banda ge/E	Gel <sup>b</sup>	Primer	Bases seqüenciadas com qualidade >20 <sup>a</sup> (pb)
69	<i>E.faecium</i>	+/-	-	TE09	330
				TE10	339
70	<i>E.faecium</i>	+/-	-	TE09	334
				TE10	341
71	<i>E.faecium</i>	+/-	-	TE09	334
				TE10	330
74	<i>E.faecium</i>	+/-	-	TE09	363
76	<i>E.faecium</i>	+/-	-	TE09	345
				TE10	341
77	<i>E.faecium</i>	+/-	+	TE09	358
				TE10	341
78	<i>E.faecium</i>	+/-	-	TE09	348
				TE10	324
79*	<i>E.faecium</i>	-	-	TE09	154
				TE10	255
80	<i>E.faecium</i>	+/-	-	TE09	332
				TE10	256
81	<i>E.faecium</i>	+/-	-	TE09	20
				TE10	20
84	<i>E.faecium</i>	-	+	TE09	328
				TE10	318
104	<i>E.faecium</i>	+	-	TE09	64
				TE10	110
116	<i>E.faecium</i>	+	-	TE09	68
				TE10	83
117	<i>E.faecium</i>	+	-	TE09	90
				TE10	89
118	<i>E.faecium</i>	+	-	TE09	82
				TE10	89
121	<i>E.faecium</i>	+/-	-	TE09	50
				TE10	65
124	<i>E.faecium</i>	+	-	TE09	290
				TE10	18
128	<i>E. faecalis</i>	+	-	TE09	347
				TE10	341
130	<i>E.faecium</i>	+	-	TE09	356
				TE10	355
133	<i>E.faecium</i>	+/-	-	TE09	237
				TE10	282
134	<i>E.faecium</i>	+	-	TE09	368
				TE10	364
135	<i>E.faecium</i>	+	-	TE09	338
				TE10	346
138	<i>E.faecium</i>	+/-	-	TE09	323
				TE10	334

Isolado	Espécie	Perfil de banda <i>ge/E</i>	Gel <sup>b</sup>	Primer	Bases seqüenciadas com qualidade >20 <sup>a</sup> (pb)
141	<i>E.faecium</i>	+	-	TE09	374
				TE10	367
142	<i>Enterococcus</i> spp	+	-	TE09	330
				TE10	335
143	<i>E.faecium</i>	+	-	TE09	305
				TE10	325
145	<i>E.faecium</i>	+/-	-	TE09	305
				TE10	304
146	<i>E.faecium</i>	+/-	-	TE09	319
				TE10	327

<sup>a</sup> Relação de qualidade aceitável, com probabilidade de erro de 1 base incorreta em 100. Valor inferior a 290 pb considerado como seqüenciamento com qualidade ruim, por apresentarem bases não seqüenciadas ao longo da seqüência.

<sup>b</sup> Atividade fenotípica da gelatinase.

(+): Fator de expressão fenotípica de virulência positivo ou isolados com perfil de bandas nítidas do tamanho esperado para o fragmento do gene de virulência avaliado. (-): Ausência de fator de expressão fenotípica de virulência, ou isolados que não apresentaram fragmento do gene de virulência avaliado. , (+/-): Fator de expressão fenotípica de virulência negativo ou isolados com perfil de bandas pouco nítidas do tamanho esperado para o fragmento do gene de virulência avaliado.

## Apêndice C – Alinhamento das sequências pelo clustal W.

```
E.faecalisATCC29212      GTAGTGAAGTAACGTTAAAAAACTCTTTTCAAGTAACGTTTAAATGTACCAGTTGAAAAAA 136
E.faecium39             GTAGTGAAGTAACGTTAAAAAACTCTTTTCAAGTAACGTTTAAATGTACCAGTTGAAAAAA 145
E.faecalis_EF105504_    GTAGTGAAGTAACGTTAAAAAACTCTTTTCAAGTAACGTTTAAATGTACCAGTTGAAAAAA 900
E.faecium_FJ858146_    GTAGTGAAGTAACGTTAAAAAACTCTTTTCAAGTAACGTTTAAATGTACCAGTTGAAAAAA 637
E.faecalis_EU862241_    GTAGCGAAGTAACGTTAAAAAACTCTTTTCAAGTACCGTTTAAATGTACCAGTTGAAAAAA 855
E.faecalis_M37185_     GTAGTGAAGTAACGTTAAAAAACTCTTTTCAAGTAACGTTTAAATGTACCAGTTGAAAAAA 899
E.faecium71TE09        GTAGTGAAGTAACGTTAAAAAACTCTTTTCAAGTAACGTTTAAATGTACCAGTTGAAAAAA 110
E.faecium80            GTAGTGAAGTAACGTTAAAAAACTCTTTTCAAGTAACGTTTAAATGTACCAGTTGAAAAAA 111
E.faecium12            GTAGTGAAGTAACGTTAAAAAACTCTTTTCAAGTAACGTTTAAATGTACCAGTTGAAAAAA 109
Enterococcuspp45       GTAGTGAAGTAACGTTAAAAAACTCTTTTCAAGTAACGTTTAAATGTACCAGTTGAAAAAA 111
Enterococcuspp84      GTAGTGAAGTAACGTTAAAAAACTCTTTTCAAGTAACGTTTAAATGTACCAGTTGAAAAAA 110
E.faecium78            GTAGTGAAGTAACGTTAAAAAACTCTTTTCAAGTAACGTTTAAATGTACCAGTTGAAAAAA 111
E.faecium65            GTAGTGAAGTAACGTTAAAAAACTCTTTTCAAGTAACGTTTAAATGTACCAGTTGAAAAAA 110
E.faecium74            GTAGTGAAGTAACGTTAAAAAACTCTTTTCAAGTAACGTTTAAATGTACCAGTTGAAAAAA 111
E.faecium76            GTAGTGAAGTAACGTTAAAAAACTCTTTTCAAGTAACGTTTAAATGTACCAGTTGAAAAAA 110
E.faecium77            GTAGTGAAGTAACGTTAAAAAACTCTTTTCAAGTAACGTTTAAATGTACCAGTTGAAAAAA 111
E.faecium130           GTAGTGAAGTAACGTTAAAAAACTCTTTTCAAGTAACGTTTAAATGTACCAGTTGAAAAAA 112
E.faecium49            GTAGTGAAGTAACGTTAAAAAACTCTTTTCAAGTAACGTTTAAATGTACCAGTTGAAAAAA 110
E.faecium141           GTAGTGAAGTAACGTTAAAAAACTCTTTTCAAGTAACGTTTAAATGTACCAGTTGAAAAAA 106
E.faecalis128          GTAGTGAAGTAACGTTAAAAAACTCTTTTCAAGTAACGTTTAAATGTACCAGTTGAAAAAA 110
E.faecium01            GTAGTGAAGTAACGTTAAAAAACTCTTTTCAAGTAACGTTTAAATGTACCAGTTGAAAAAA 109
E.faecium134           GTAGTGAAGTAACGTTAAAAAACTCTTTTCAAGTAACGTTTAAATGTACCAGTTGAAAAAA 110
Enterococcuspp142     GTAGTGAAGTAACGTTAAAAAACTCTTTTCAAGTAACGTTTAAATGTACCAGTTGAAAAAA 95
E.faecium146           GTAGTGAAGTAACGTTAAAAAACTCTTTTCAAGTAACGTTTAAATGTACCAGTTGAAAAAA 95
E.faecium10            GTAGCGAAGTAACGTTAAAAAACTCTTTTCAAGTACCGTTTAAATGTACCAGTTGAAAAAA 145
E.faecium70            GTAGTGAAGTAACGTTAAAAAACTCTTTTCAAGTAACGTTTAAATGTACCAGTTGAAAAAA 142
E.faecium69            GTAGTGAAGTAACGTTAAAAAACTCTTTTCAAGTAACGTTTAAATGTACCAGTTGAAAAAA 142
E.faecium143           GTAGTGAAGTAACGTTAAAAAACTCTTTTCAAGTAACGTTTAAATGTACCAGTTGAAAAAA 143
E.faecium145           GTAGTGAAGTAACGTTAAAAAACTCTTTTCAAGTAACGTTTAAATGTACCAGTTGAAAAAA 143
E.faecium138           GTAGTGAAGTAACGTTAAAAAACTCTTTTCAAGTAACGTTTAAATGTACCAGTTGAAAAAA 143
E.faecium47            GTAGTGAAGTAACGTTAAAAAACTCTTTTCAAGTAACGTTTAAATGTACCAGTTGAAAAAA 143
E.faecium17            GTAGTGAAGTAACGTTAAAAAACTCTTTTCAAGTAACGTTTAAATGTACCAGTTGAAAAAA 138
E.faecium35            GTAGTGAAGTAACGTTAAAAAACTCTTTTCAAGTAACGTTTAAATGTACCAGTTGAAAAAA 139
E.faecium66            GTAGTGAAGTAACGTTAAAAAACTCTTTTCAAGTAACGTTTAAATGTACCAGTTGAAAAAA 143
E.faecium19            GTAGTGAAGTAACGTTAAAAAACTCTTTTCAAGTAACGTTTAAATGTACCAGTTGAAAAAA 144
E.faecium135           GTAGTGAAGTAACGTTAAAAAACTCTTTTCAAGTAACGTTTAAATGTACCAGTTGAAAAAA 130
**** *
*****
*****
*****
```

E. faecalisATCC29212	GCAATACGGGAATTGCTTTACACGGAACGGATAAACACAGGGGTTTACCATGCAGTAGTTG	196
E. faecium39	GCAATACGGGAATTGCTTTACACGGAACGGATAAACACAGGGGTTTACCATGCAGTAGTTG	205
E. faecalis_EF105504_	GCAATACGGGAATTGCTTTACACGGAACGGATAAACACAGGGGTTTACCATGCAGTAGTTG	960
E. faecium_FJ858146_	GCAATACGGGAATTGCTTTACACGGAACGGATAAACACAGGGGTTTACCATGCAGTAGTTG	697
E. faecalis_EU862241_	GCAATACGGGAATTGCTTTACACGGAACGGATAAACACAGGGGTTTACCATGCAGTAGTTG	915
E. faecalis_M37185_	GCAATACGGGAATTGCTTTACACGGAACGGATAAACACAGGGGTTTACCATGCAGTAGTTG	959
E. faecium71TE09	GCAATACGGGAATTGCTTTACACGGAACGGATAAACACAGGGGTTTACCATGCAGTAGTTG	170
E. faecium80	GCAATACGGGAATTGCTTTACACGGAACGGATAAACACAGGGGTTTACCATGCAGTAGTTG	171
E. faecium12	GCAATACGGGAATTGCTTTACACGGAACGGATAAACACAGGGGTTTACCATGCAGTAGTTG	169
Enterococcuspp45	GCAATACGGGAATTGCTTTACACGGAACGGATAAACACAGGGGTTTACCATGCAGTAGTTG	171
Enterococcuspp84	GCAATACGGGAATTGCTTTACACGGAACGGATAAACACAGGGGTTTACCATGCAGTAGTTG	170
E. faecium78	GCAATACGGGAATTGCTTTACACGGAACGGATAAACACAGGGGTTTACCATGCAGTAGTTG	171
E. faecium65	GCAATACGGGAATTGCTTTACACGGAACGGATAAACACAGGGGTTTACCATGCAGTAGTTG	170
E. faecium74	GCAATACGGGAATTGCTTTACACGGAACGGATAAACACAGGGGTTTACCATGCAGTAGTTG	171
E. faecium76	GCAATACGGGAATTGCTTTACACGGAACGGATAAACACAGGGGTTTACCATGCAGTAGTTG	170
E. faecium77	GCAATACGGGAATTGCTTTACACGGAACGGATAAACACAGGGGTTTACCATGCAGTAGTTG	171
E. faecium130	GCAATACGGGAATTGCTTTACACGGAACGGATAAACACAGGGGTTTACCATGCAGTAGTTG	172
E. faecium49	GCAATACGGGAATTGCTTTACACGGAACGGATAAACACAGGGGTTTACCATGCAGTAGTTG	170
E. faecium141	GCAATACGGGAATTGCTTTACACGGAACGGATAAACACAGGGGTTTACCATGCAGTAGTTG	166
E. faecalis128	GCAATACGGGAATTGCTTTACACGGAACGGATAAACACAGGGGTTTACCATGCAGTAGTTG	170
E. faecium01	GCAATACGGGAATTGCTTTACACGGAACGGATAAACACAGGGGTTTACCATGCAGTAGTTG	169
E. faecium134	GCAATACGGGAATTGCTTTACACGGAACGGATAAACACAGGGGTTTACCATGCAGTAGTTG	170
Enterococcuspp142	GCAATACGGGAATTGCTTTACACGGAACGGATAAACACAGGGGTTTACCATGCAGTAGTTG	155
E. faecium146	GCAATACGGGAATTGCTTTACACGGAACGGATAAACACAGGGGTTTACCATGCAGTAGTTG	155
E. faecium10	GCAATACGGGAATTGCTTTACACGGAACGGATAAACACAGGGGTTTACCATGCAGTAGTTG	205
E. faecium70	GCAATACGGGAATTGCTTTACACGGAACGGATAAACACAGGGGTTTACCATGCAGTAGTTG	202
E. faecium69	GCAATACGGGAATTGCTTTACACGGAACGGATAAACACAGGGGTTTACCATGCAGTAGTTG	202
E. faecium143	GCAATACGGGAATTGCTTTACACGGAACGGATAAACACAGGGGTTTACCATGCAGTAGTTG	203
E. faecium145	GCAATACGGGAATTGCTTTACACGGAACGGATAAACACAGGGGTTTACCATGCAGTAGTTG	203
E. faecium138	GCAATACGGGAATTGCTTTACACGGAACGGATAAACACAGGGGTTTACCATGCAGTAGTTG	203
E. faecium47	GCAATACGGGAATTGCTTTACACGGAACGGATAAACACAGGGGTTTACCATGCAGTAGTTG	203
E. faecium17	GCAATACGGGAATTGCTTTACACGGAACGGATAAACACAGGGGTTTACCATGCAGTAGTTG	198
E. faecium35	GCAATACGGGAATTGCTTTACACGGAACGGATAAACACAGGGGTTTACCATGCAGTAGTTG	199
E. faecium66	GCAATACGGGAATTGCTTTACACGGAACGGATAAACACAGGGGTTTACCATGCAGTAGTTG	203
E. faecium19	GCAATACGGGAATTGCTTTACACGGAACGGATAAACACAGGGGTTTACCATGCAGTAGTTG	204
E. faecium135	GCAATACGGGAATTGCTTTACACGGAACGGATAAACACAGGGGTTTACCATGCAGTAGTTG	190

\*\*\*\*\*

E. faecalisATCC29212	ATGGCAAAAATAATTATTCTATTATTCAAGCGCCATCACTAGCGACATTAATCAGAATG	256
E. faecium39	ATGGCAAAAATAATTATTCTATTATTCAAGCGCCATCACTAGCGACATTAATCAGAATG	265
E. faecalis_EF105504_	ATGGCAAAAATAATTATTCTATTATTCAAGCGCCATCACTAGCGACATTAATCAGAATG	1020
E. faecium_FJ858146_	ATGGCAAAAATAATTATTCTATTATTCAAGCACCATCACTAGTAGCATTAAATCAGAATG	757
E. faecalis_EU862241_	ATGGCAAAAATAATTATTCTATTATTCAAGCACCATCACTAGCAGCATTAAATCAGAATG	975
E. faecalis_M37185_	ATGGCAAAAATAATTATTCTATTATTCAAGCGCCATCACTAGCGACATTAATCAGAATG	1019
E. faecium71TE09	ATGGCAAAAATAATTATTCTATTATTCAAGCGCCATCACTAGCGACATTAATCAGAATG	230
E. faecium80	ATGGCAAAAATAATTATTCTATTATTCAAGCGCCATCACTAGCGACATTAATCAGAATG	231
E. faecium12	ATGGCAAAAATAATTATTCTATTATTCAAGCGCCATCACTAGCGACATTAATCAGAATG	229
Enterococcuspp45	ATGGCAAAAATAATTATTCTATTATTCAAGCGCCATCACTAGCGACATTAATCAGAATG	231
Enterococcuspp84	ATGGCAAAAATAATTATTCTATTATTCAAGCGCCATCACTAGCGACATTAATCAGAATG	230
E. faecium78	ATGGCAAAAATAATTATTCTATTATTCAAGCGCCATCACTAGCGACATTAATCAGAATG	231
E. faecium65	ATGGCAAAAATAATTATTCTATTATTCAAGCGCCATCACTAGCGACATTAATCAGAATG	230
E. faecium74	ATGGCAAAAATAATTATTCTATTATTCAAGCGCCATCACTAGCGACATTAATCAGAATG	231
E. faecium76	ATGGCAAAAATAATTATTCTATTATTCAAGCGCCATCACTAGCGACATTAATCAGAATG	230
E. faecium77	ATGGCAAAAATAATTATTCTATTATTCAAGCGCCATCACTAGCGACATTAATCAGAATG	231
E. faecium130	ATGGCAAAAATAATTATTCTATTATTCAAGCGCCATCACTAGCGACATTAATCAGAATG	232
E. faecium49	ATGGCAAAAATAATTATTCTATTATTCAAGCGCCATCACTAGCGACATTAATCAGAATG	230
E. faecium141	ATGGCAAAAATAATTATTCTATTATTCAAGCGCCATCACTAGCGACATTAATCAGAATG	226
E. faecalis128	ATGGCAAAAATAATTATTCTATTATTCAAGCGCCATCACTAGCGACATTAATCAGAATG	230
E. faecium01	ATGGCAAAAATAATTATTCTATTATTCAAGCGCCATCACTAGCGACATTAATCAGAATG	229
E. faecium134	ATGGCAAAAATAATTATTCTATTATTCAAGCGCCATCACTAGCGACATTAATCAGAATG	230
Enterococcuspp142	ATGGCAAAAATAATTATTCTATTATTCAAGCGCCATCACTAGCGACATTAATCAGAATG	215
E. faecium146	ATGGCAAAAATAATTATTCTATTATTCAAGCGCCATCACTAGCGACATTAATCAGAATG	215
E. faecium10	ATGGCAAAAATAATTATTCTATTATTCAAGCACCATCACTAGCAGCATTAAATCAGAATG	265
E. faecium70	ATGGCAAAAATAATTATTCTATTATTCAAGCGCCATCACTAGCGACATTAATCAGAATG	262
E. faecium69	ATGGCAAAAATAATTATTCTATTATTCAAGCGCCATCACTAGCGACATTAATCAGAATG	262
E. faecium143	ATGGCAAAAATAATTATTCTATTATTCAAGCGCCATCACTAGCGACATTAATCAGAATG	263
E. faecium145	ATGGCAAAAATAATTATTCTATTATTCAAGCGCCATCACTAGCGACATTAATCAGAATG	263
E. faecium138	ATGGCAAAAATAATTATTCTATTATTCAAGCGCCATCACTAGCGACATTAATCAGAATG	263
E. faecium47	ATGGCAAAAATAATTATTCTATTATTCAAGCGCCATCACTAGCGACATTAATCAGAATG	263
E. faecium17	ATGGCAAAAATAATTATTCTATTATTCAAGCGCCATCACTAGCGACATTAATCAGAATG	258
E. faecium35	ATGGCAAAAATAATTATTCTATTATTCAAGCGCCATCACTAGCGACATTAATCAGAATG	259
E. faecium66	ATGGCAAAAATAATTATTCTATTATTCAAGCGCCATCACTAGCGACATTAATCAGAATG	263
E. faecium19	ATGGCAAAAATAATTATTCTATTATTCAAGCGCCATCACTAGCGACATTAATCAGAATG	264
E. faecium135	ATGGCAAAAATAATTATTCTATTATTCAAGCGCCATCACTAGCGACATTAATCAGAATG	250

\*\*\*\*\*

E. faecalisATCC29212	CTGTTGACGCCTATACGCATGGAAAATTTGTGAAAACATATTATGAAGATCATTCCAAC	316
E. faecium39	CTGTTGACGCCTATACGCATGGAAAATTTGTGAAAACATATTATGAAGATCATTCCAAC	325
E. faecalis_EF105504_	CTGTTGATGCCTATACCCATGGAAAATTTGTGAAAACATATTATGAAGATCATTCCAAC	1080
E. faecium_FJ858146_	CTGTTGATGCCTATACGCATGGAAAATTTGTGAAAACATATTATGAAGATCATTCCAAC	817
E. faecalis_EU862241_	CTGTTGACGCCTATACGCATGGAAAATTTGTGAAAACATATTATGAAGATCATTCCAAC	1035
E. faecalis_M37185_	CTATTGACGCCTATACGCATGGAAAATTTGTGAAAACATATTATGAAGATCATTCCAAC	1079
E. faecium71TE09	CTGTTGACGCCTATACGCATGGAAAATTTGTGAAAACATATTATGAAGATCATTCCAAC	290
E. faecium80	CTGTTGACGCCTATACGCATGGAAAATTTGTGAAAACATATTATGAAGATCATTCCAAC	291
E. faecium12	CTGTTGACGCCTATACGCATGGAAAATTTGTGAAAACATATTATGAAGATCATTCCAAC	289
Enterococcuspp45	CTGTTGACGCCTATACGCATGGAAAATTTGTGAAAACATATTATGAAGATCATTCCAAC	291
Enterococcuspp84	CTGTTGACGCCTATACGCATGGAAAATTTGTGAAAACATATTATGAAGATCATTCCAAC	290
E. faecium78	CTGTTGACGCCTATACGCATGGAAAATTTGTGAAAACATATTATGAAGATCATTCCAAC	291
E. faecium65	CTGTTGACGCCTATACGCATGGAAAATTTGTGAAAACATATTATGAAGATCATTCCAAC	290
E. faecium74	CTGTTGACGCCTATACGCATGGAAAATTTGTGAAAACATATTATGAAGATCATTCCAAC	291
E. faecium76	CTGTTGACGCCTATACGCATGGAAAATTTGTGAAAACATATTATGAAGATCATTCCAAC	290
E. faecium77	CTGTTGACGCCTATACGCATGGAAAATTTGTGAAAACATATTATGAAGATCATTCCAAC	291
E. faecium130	CTGTTGACGCCTATACGCATGGAAAATTTGTGAAAACATATTATGAAGATCATTCCAAC	292
E. faecium49	CTGTTGACGCCTATACGCATGGAAAATTTGTGAAAACATATTATGAAGATCATTCCAAC	290
E. faecium141	CTGTTGACGCCTATACGCATGGAAAATTTGTGAAAACATATTATGAAGATCATTCCAAC	286
E. faecalis128	CTGTTGACGCCTATACGCATGGAAAATTTGTGAAAACATATTATGAAGATCATTCCAAC	290
E. faecium01	CTGTTGACGCCTATACGCATGGAAAATTTGTGAAAACATATTATGAAGATCATTCCAAC	289
E. faecium134	CTGTTGACGCCTATACGCATGGAAAATTTGTGAAAACATATTATGAAGATCATTCCAAC	290
Enterococcuspp142	CTGTTGACGCCTATACGCATGGAAAATTTGTGAAAACATATTATGAAGATCATTCCAAC	275
E. faecium146	CTGTTGACGCCTATACGCATGGAAAATTTGTGAAAACATATTATGAAGATCATTCCAAC	275
E. faecium10	CTGTTGACGCCTATACGCATGGAAAATTTGTGAAAACATATTATGAAGATCATTCCAAC	325
E. faecium70	CTGTTGACGCCTATACGCATGGAAAATTTGTGAAAACATATTATGAAGATCATTCCAAC	322
E. faecium69	CTGTTGACGCCTATACGCATGGAAAATTTGTGAAAACATATTATGAAGATCATTCCAAC	322
E. faecium143	CTGTTGACGCCTATACGCATGGAAAATTTGTGAAAACATATTATGAAGATCATTCCAAC	323
E. faecium145	CTGTTGACGCCTATACGCATGGAAAATTTGTGAAAACATATTATGAAGATCATTCCAAC	323
E. faecium138	CTGTTGACGCCTATACGCATGGAAAATTCGTGAAAACATATTATGAAGATCATTCCAAC	323
E. faecium47	CTGTTGACGCCTATACGCATGGAAAATTTGTGAAAACATATTATGAAGATCATTCCAAC	323
E. faecium17	CTGTTGACGCCTATACGCATGGAAAATTTGTGAAAACATATTATGAAGATCATTCCAAC	318
E. faecium35	CTGTTGACGCCTATACGCATGGAAAATTTGTGAAAACATATTATGAAGATCATTCCAAC	319
E. faecium66	CTGTTGACGCCTATACGCATGGAAAATTTGTGAAAACATATTATGAAGATCATTCCAAC	323
E. faecium19	CTGTTGACGCCTATACGCATGGAAAATTTGTGAAAACATATTATGAAGATCATTCCAAC	324
E. faecium135	CTGTTGACGCCTATACGCATGGAAAATTTGTGAAAACATATTATGAAGATCATTCCAAC	310

\*\* \*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

**APÊNDICE D** – Análise dos primers utilizados para amplificar os fragmentos do gene *gelE* pelo *primer-blast*.

>[EU862241.3](#) *Enterococcus faecalis* strain H81 gelatinase (*gelE*) gene, partial cds

product length = 419

```
Forward primer  1      ACCCCGTATCATTGGTTT  18
Template        718      .....  735

Reverse primer  1      ACGCATTGCTTTTCCATC  18
Template        1136     .....  1119

Forward primer  1      ACCCCGTATCATTGGTTT  18
Template        718      .....  735

Reverse primer  1      ACGCATTGCTTTTCCATC  18
Template        781      .AATC...T.....A  764
```

>[EF105504.1](#) *Enterococcus faecalis* GM gelatinase (*gelE*) gene, complete cds

product length = 419

```
Forward primer  1      ACCCCGTATCATTGGTTT  18
Template        763      .....  780

Reverse primer  1      ACGCATTGCTTTTCCATC  18
Template        1181     .....  1164
```

product length = 64

```
Forward primer  1      ACCCCGTATCATTGGTTT  18
Template        763      .....  780

Reverse primer  1      ACGCATTGCTTTTCCATC  18
Template        826      .AATC...T.....A  809
```



>[AE016830.1](#) *Enterococcus faecalis* V583, complete genome

product length = 419

Features associated with this product:

[coccolysin](#)

Forward primer	1	ACCCCGTATCATTGGTTT	18
Template	1763991	.....	1763974
Reverse primer	1	ACGCATTGCTTTTCCATC	18
Template	1763573	.....	1763590

product length = 64

Features associated with this product:

[coccolysin](#)

Forward primer	1	ACCCCGTATCATTGGTTT	18
Template	1763991	.....	1763974
Reverse primer	1	ACGCATTGCTTTTCCATC	18
Template	1763928	.AATC...T.....A	1763945