

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

SILVIA HELENA TORMEN

***Enterococcus* spp. ISOLADO DE VEGETAIS: PERFIL DE
SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E FORMAÇÃO DE
BIOFILME**

DISSERTAÇÃO

MEDIANEIRA

2016

SILVIA HELENA TORMEN

***Enterococcus* spp. ISOLADO DE VEGETAIS: PERFIL DE
SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E FORMAÇÃO DE
BIOFILME**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientador: Profa. Dra. Luciana Furlaneto-Maia
Coorientador: Profa. Dra. Cátia Tavares dos Passos

MEDIANEIRA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

T684e Tormen, Silvia Helena

Enterococcus spp. Isolado de vegetais: perfil de suscetibilidade a antimicrobianos e formação de biofilme / Silvia Helena Tormen– 2016.
72 f.; 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Furlaneto-Maia

Coorientador: : Profa. Dra. Cátia Tavares dos Passos

Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Medianeira, 2016.

Inclui bibliografias.

1. Comunidades biológicas. 2. Antimicrobiano. 3. Alimentos – Dissertações. I. Furlaneto-Maia, Luciana, orient. II. Passos, Cátia Tavares do, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. IV. Título.

CDD: 664



TERMO DE APROVAÇÃO

***Enterococcus* spp. ISOLADO DE VEGETAIS: PERFIL DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E FORMAÇÃO DE BIOFILME**

Por

SILVIA HELENA TORMEN

Essa dissertação foi apresentada às nove horas do dia vinte e nove de janeiro de dois mil e dezesseis, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos, Linha de Pesquisa Ciência e Tecnologia de Produtos Alimentícios, no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos - PPGTA, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho _____.

Profa. Dra. Luciana Furlaneto Maia (Orientadora – PPGTA)

Dra. Alane Tatiana Pereira Morales (Membro Externo – UEL)

Profa. Dra. Márcia Cristina Furlaneto (Membro Externo – UEL)

* A via original com as assinaturas encontra-se na secretaria do programa.

AGRADECIMENTOS

À orientadora, Prof^a. Dr^a. Luciana Furlaneto Maia, pela orientação e confiança.

À co-orientadora, Prof^a. Dr^a. Cátia Tavares dos Passos, por aferir a execução dos experimentos e pela revisão da escrita.

Ao CNPq, Fundação Araucária e UTFPR, pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), onde trabalho, por disponibilizar o Laboratório de Microbiologia e pelo apoio financeiro.

A Prof^a. Dr^a. Márcia Cristina Furlaneto, por disponibilizar o laboratório da Universidade Estadual de Londrina (UEL) para a execução do experimento da formação de biofilme.

Aos membros das bancas examinadoras pelas sugestões.

A Vanessa Gomes da Silva da UFFS, Márcia Regina Terra da UTFPR e Danielle Karine Ohashi da UEL, pelo apoio técnico e colaboração na execução dos experimentos.

A Fernanda Arpini Souza da UFFS, que supriu as necessidades dos laboratórios enquanto eu estava ausente, pela colaboração na execução dos experimentos e análise estatística deste trabalho.

Aos alunos da UTFPR, Raísa Moreira Dardaque Mucinhato, Ayodele Ayaji, André de Oliveira Beninca e Larissa Botura da Silva pela colaboração na execução dos experimentos.

Ao Luciano Tormen, pelas sugestões.

A Andresa Freitas, pela revisão do texto.

À Cooperativa Agroindustrial 08 de Junho pela doação de amostras.

Ao meu chefe e aos professores do curso de Engenharia de Alimentos da UFFS, por estarem de acordo com a redução da jornada de trabalho para que eu me dedicasse a realização deste trabalho.

Aos meus familiares pela hospedagem e incentivo.

RESUMO

TORMEN, Silvia Helena. *Enterococcus* spp. isolado de vegetais: perfil de suscetibilidade a antimicrobianos e formação de biofilme. 2016. 72f. Dissertação. (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2016.

Os enterococos são cocos Gram-positivos que pertencem ao grupo das bactérias ácido lácticas (BAL). Podem ser isolados de plantas, solo, água, alimentos e do trato digestório de humanos e outros mamíferos. Alguns isolados são potencialmente patogênicos e resistentes a antimicrobianos, principalmente à vancomicina e demais antimicrobianos clinicamente importantes. Devido a este cenário, alimentos estão sendo sugeridos como reservatórios de enterococos resistentes a antimicrobianos. Contudo, são escassos os estudos que analisam a presença deste microrganismo em vegetais. Portanto, este trabalho teve como objetivo isolar e identificar *Enterococcus* spp. a partir de amostras de vegetais folhosos, legumes e raízes, e verificar sua suscetibilidade a antimicrobianos e formação de biofilme. Os isolados foram identificados ao nível de gênero/espécie pela reação da polimerase em cadeia (PCR), utilizando os oligonucleotídeos iniciadores das principais espécies. A sensibilidade a antimicrobianos foi determinada pelo método de disco-difusão e a presença dos genes *ermB*, *aac-(6')*, *tetL*, *tetM*, *vanA* e *vanB* pela PCR. A capacidade de formação de biofilme foi determinada, *in vitro*, por biomassa total. Foram obtidos 85 isolados de *Enterococcus* distribuídos em 62% das amostras analisadas. As espécies identificadas foram: *Enterococcus casseliflavus/flavescens*, *Enterococcus columbae*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus mundtii* e *Enterococcus avium*. Dos isolados 64% apresentaram resistência fenotípica a todos os antimicrobianos testados, principalmente à vancomicina, eritromicina, teicoplanina, ampicilina e penicilina. A maioria das espécies apresentou pelo menos um isolado resistente à vancomicina. Dos isolados resistentes 61% apresentaram multirresistência. Os genes detectados foram: *tetM* (15%), *tetL* (8%), *vanA* (5%), *vanB* (4%) e *aac-(6')* (2%). Todos os isolados foram capazes de formar biofilme, onde 27% foram classificados como produtor de biofilme fraco, 60% moderado e 13% forte. Os isolados produtores de biofilme moderado foram os que mais apresentaram resistência à vancomicina, teicoplanina, eritromicina e penicilina. De acordo com estes resultados, os vegetais podem atuar como reservatório de enterococos resistentes a diversos antimicrobianos de importância clínica, principalmente à vancomicina. Isso representa um risco para a saúde pública uma vez que a vancomicina é o último recurso terapêutico para o tratamento de infecções enterocócicas graves.

Palavras chave: Comunidades biológicas. Antimicrobiano. Alimentos.

ABSTRACT

TORMEN, Silvia Helena. *Enterococcus* spp. isolated from vegetables : susceptibility profile to antimicrobials and biofilm formation. 2016. 72f. Dissertation. (Masters Food Technology) - Federal Technology University Paraná, Medianeira, 2016.

The e enterococci are Gram-positive cocci that belong to the group of lactic acid bacteria (LAB). They can be isolated from plants, soil, water, food and the digestive tract of humans and other mammals. Some strains are potentially pathogenic and resistant to antibiotics, especially vancomycin and other clinically important antibiotics. Due to this scenario, foods are being suggested as reservoirs enterococci resistant to antimicrobials. However, there are few studies that analyze the presence of this organism in food vegetable. Therefore, this study aimed to isolate and identify enterococci from samples of leafy vegetables, legumen and roots, and verify their susceptibility to antimicrobial and biofilm formation. Isolates were identified to genus / species by polymerase chain reaction (PCR) using the primers of the main species. The antimicrobial susceptibility was determined by disk diffusion method and the presence of *ermB* genes, *aac* (6'), *tetL*, *tetM*, *vanA* and *vanB* by PCR. Biofilm formation ability was determined in vitro by the total biomass. 85 were obtained *Enterococcus* distributed in 62% of samples. The species identified were: *Enterococcus casseliflavus/flavescens*, *Enterococcus columbae*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus mundtii* and *Enterococcus avium*. From the isolates showed 64% phenotypic resistance to all tested antibiotics, especially vancomycin, erythromycin, teicoplanin, ampicillin and penicillin. Most species had at least one isolate resistant to vancomycin. 61% of resistant isolates showed multidrug resistance. The genes were detected: *tet M* (15%), *tetL* (8%), *vanA* (5%), *vanB* (4%) and *aac*-(6') (2%). All isolates were able to form biofilm, where 27 % were classified as weak biofilm producer, 60 % moderate and 13 % stronger. Isolated producers of moderate biofilm were the ones who were resistant to vancomycin, teicoplanin, erythromycin and penicillin. According to these results, the vegetables can act as a reservoir of enterococci resistant to several antibiotics of clinical importance, especially vancomycin. This represents a risk to public health since vancomycin is the last therapeutic option for the treatment of severe enterococcal infections.

Keywords: Biologic communities. Antibiotic. Food.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVO GERAL	10
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
3 REFERENCIAL TEÓRICO	11
3.1 CARACTERÍSTICAS DO GÊNERO <i>Enterococcus</i> .	11
3.2 ENTEROCOCOS NOS ALIMENTOS	13
3.3 FATORES DE VIRULÊNCIA	17
3.3.1 Formação de biofilme	18
3.3.2 Resistência antimicrobiana em <i>Enterococcus</i>	21
3.3.2.1 Resistência antimicrobiana em <i>Enterococcus</i> isolados de alimentos	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 AMOSTRAGEM E PREPARO DA AMOSTRA	28
4.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA DE <i>Enterococcus</i>	28
4.3 EXTRAÇÃO DE DNA E IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA GÊNERO-ESPÉCIE .	29
4.4 TESTE DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS	31
4.5 VERIFICAÇÃO GENOTÍPICA DE GENES DE RESISTÊNCIA	32
4.6 FORMAÇÃO DE BIOFILME	33
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES DE <i>Enterococcus</i> spp. EM VEGETAIS	35
5.2 TESTE DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS	40
5.3 PRESENÇA DE GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS.....	48
5.4 FORMAÇÃO DE BIOFILME	52
6 CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Enterococcus* são capazes de sobreviver a uma série de condições hostis, que permite sua ampla distribuição na natureza, sendo comensais do trato digestório de mamíferos e aves (FISCHER; PHILLIPS, 2009; HIDANO et al., 2015). Apesar de terem aplicações úteis em alimentos, a entidade Europeia de Segurança de Alimentos, *European Food Safety Authority* (EFSA), não considera os enterococos seguros para uso como aditivo alimentar (EFSA, 2013). A insegurança é atribuída ao fato de que essas bactérias são apontadas como responsáveis por infecções graves em pacientes hospitalizados (EFSA, 2013; FOULQUIE-MORENO et al., 2006). Essa patogenicidade, ocorre porque *Enterococcus* possuem a capacidade de adquirir resistência a antimicrobianos, entre eles à vancomicina, que é a última opção terapêutica para tratar infecções enterocócicas graves resistentes a outros antimicrobianos (TALEBI et al., 2015).

A resistência dos enterococos a antimicrobianos, em parte, se deve a sua capacidade de transferir seus genes de resistência, por mecanismos eficientes. Essa transferência pode ocorrer entre espécies e para outros gêneros, fazendo com que ocorra a disseminação da resistência, bem como de fatores de virulência para outros microrganismos, em diferentes nichos ecológicos (FISCHER; PHILLIPS, 2009; HIDANO et al., 2015).

O aumento do número de isolados resistentes pode ser devido a pressão seletiva causada pelo uso indiscriminado de antimicrobianos na agricultura e na clínica humana (CHANG et al., 2014; SOUZA, 2013). O uso da avoparcina, na agricultura europeia, implicou no aparecimento de enterococos resistentes à vancomicina encontrados em isolados clínicos e de alimentos (MANNU et al., 2003; TALEBI et al., 2015). A constatação do aumento de resistência a altos níveis de aminoglicosídeos em suínos, coincidiu com o surgimento de *Enterococcus faecalis* com as mesmas características em pacientes internados em hospitais e na carne de porco (LARSEN et al., 2010).

O fato de enterococos patogênicos, resistentes a antimicrobianos, poderem ser encontrados em alimentos e a possibilidade desses colonizarem o trato digestório humano, sustentaria a hipótese de que os alimentos poderiam ser um dos veículos de contaminação (GOUSIA et al., 2011; LARSEN et al., 2010; MICALLEF,

et al., 2011). No Brasil, há poucos estudos envolvendo uma possível contribuição dos alimentos de origem vegetal como reservatórios de enterococos resistentes a antimicrobianos. Dessa forma, este trabalho se propôs a ampliar o conhecimento sobre a presença deste gênero em alimentos de origem vegetal, quanto a sua característica de sensibilidade a antimicrobianos e a formação de biofilme.

2 OBJETIVO GERAL

Isolar *Enterococcus* spp. a partir de alimentos de origem vegetal, verificar a resistência a antimicrobianos e a capacidade de formação de biofilme.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar *Enterococcus* spp. a partir de folhosos, legumes e raízes *in natura* e minimamente processados;
- identificar as espécies de *Enterococcus* spp. provenientes destes alimentos;
- determinar a sensibilidade dos isolados frente a antimicrobianos de uso clínico;
- verificar a presença de genes de resistência a antimicrobianos nos isolados;
- verificar a capacidade de formação de biofilme por isolados de *Enterococcus* spp.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 CARACTERÍSTICAS DO GÊNERO *Enterococcus*

Enterococcus são bactérias que possuem a forma de cocos Gram-positivos, dispostos aos pares, curtas cadeias ou isolados. É típico das espécies deste gênero crescer na presença de elevada concentração de cloreto de sódio (6,5%), de sais biliares (40%), a pH extremos (4,4 a 9,6) e a temperaturas de 10 a 45 °C (FRANZ et al., 2003), sendo 35 °C a temperatura ótima de crescimento. São quimiorganotróficas e anaeróbias facultativas, que fermentam uma ampla variedade de carboidratos, como a lactose, com produção de L(+) ácido láctico sem a produção de gás. Portanto, este gênero se enquadra no grupo das bactérias ácido lácticas (BAL). Não possuem a enzima citocromo, por isso são consideradas catalase negativa, embora algumas espécies produzam a pseudocatalase, apresentando fraca efervescência no teste de catalase. Em presença de sangue as culturas são, em geral, não hemolíticas, mas podem apresentar beta ou alfa hemólise dependendo da espécie (FACKLAM et al., 1999; MADIGAN et al., 2010).

Inicialmente, *Enterococcus* integrava o gênero *Streptococcus*, pertencente ao grupo D de Lancefield. Porém, algumas espécies se comportam fisiologicamente diferentes e outras não reagem ao antissoro do grupo D. Após evidências genéticas, obtidas por meio da utilização da hibridação de DNA e sequenciamento de 16S rRNA conduzidos por Scheifer e Kilpper-Balz (1984), Devriese et al. (1993) e Devriese e Pot (1995), foi demonstrado que *Enterococcus* deveriam ser enquadrados como um novo gênero por apresentarem características genotípicas distintas. Além disso, foi proposta uma nova chave bioquímica com base em 12 ensaios, que podem permitir a identificação da maioria das espécies (MANERO, BLANCH, 1999). São descritas mais de 54 espécies para este gênero (EUZÉBY, 2015).

Os enterococos são frequentemente isolados de plantas, solo, água, predominando na microflora do trato digestório de humanos, demais mamíferos, peixes, aves e microflora autóctone de diversos alimentos (GIRAFFA, 2002; HIDANO et al., 2015). Inclusive, as espécies *E. faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans* e *Enterococcus hirae* são consideradas boas indicadoras de

contaminação fecal humana (SPENSE, 2014). *E. faecalis* e *E. faecium* são as espécies mais conhecidas e desempenham importante papel em doenças em humanos (OGIER; SERROR, 2008), sendo *E. faecalis* a espécie mais frequente em isolados clínicos (ABRIOUEL et al., 2008) e no Brasil chega a 90% dos casos (ANVISA, 2007).

Dada a importância do estudo desse gênero, diversos meios são empregados para seu cultivo, isolamento e identificação. Em geral, Ágar Kanamicina Esculina Azida (KEA), Ágar *Enterococcus* Seletivo, M17 e em Ágar Dextrose Triptona (DTA) são os meios base empregados para contagem de enterococos em alimentos, água e amostras clínicas (DOMIG et al., 2003; POTES e MARINHO, 2007). Ágar Man Rogosa, Sharpe (MRS) ou Ágar Rogosa tem sido usados com frequência, porém estes são úteis se os enterococos forem os únicos microrganismos na amostra (DOMIG et al., 2003).

Devido a heterogeneidade na composição dos meios, as exigências de nutrientes dos enterococos e a diversidade da microflora na amostra, ainda não há um único meio que atenda todos os requisitos de seletividade e capacidade de recuperação. Na maioria dos casos, quando é desejada alta seletividade, a contagem do microrganismo fica inferior e quando a fidelidade da contagem é privilegiada, há diminuição na seletividade do gênero (DOMIG et al., 2003).

Contudo, não há critérios fenotípicos que possam distinguir claramente o gênero *Enterococcus* de outros, bem como, não há critérios específicos comuns a todas as espécies do gênero (FISCHER; PHILIPS, 2009). Para uma identificação confiável e rápida, especialmente em amostras com microflora diversificada, os métodos moleculares são essenciais (KLEIN, 2003). Sondas de RNA 16S e 23S apresentaram bom desempenho para identificar as diferentes espécies de enterococos por meio da PCR (OGIER; SERROR, 2008). Outros métodos, também para diferenciação intra-espécies, incluem tipagem de DNA ou impressão digital de DNA, PCR com DNA polimórfico amplificado ao acaso, eletroforese em gel de campo alternado, eletroforese de campo elétrico homogêneo e análise de restrição enzimática (COCCONCELLI et al., 1995.; DONABEDIAN et al., 1995).

3.2 ENTEROCOCOS NOS ALIMENTOS

A distribuição dos enterococos em diversos nichos indica seu potencial adaptativo e de crescimento em diversas condições ambientais, inclusive em alimentos. Estes podem contribuir para o desenvolvimento de aroma e sabor em produtos lácteos, cárneos e vegetais fermentados e também são usados como produtores de bacteriocinas (EFSA, 2013; FOULQUIÉ-MORENO et al., 2006; SETTANI; CORSETTI, 2008).

Por outro lado, este gênero pode revelar condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, quando presente em alimentos, por indicar contaminação fecal, sendo empregado como indicador de qualidade microbiológica de alimentos (MICALLEF et al., 2013; RIBOLDI et al., 2009). A contaminação fecal pode ocorrer pelo contato direto de alimentos com as fezes de animais ou humanos, ou indireto por meio da água ou equipamentos contaminados (CAMPOS, J. et al., 2013), ocorrendo durante a obtenção da matéria-prima, industrialização ou distribuição dos alimentos (SULTANA et al., 2014).

Em consequência da elevada resistência e capacidade de multiplicação dos enterococos nos alimentos, eles estão presentes em carnes e produtos cárneos, leite e derivados, vegetais e derivados (CAMARGO et al., 2014; KOLUMAN; AKAN; ÇAKIROGLU, 2009; PESAVENTO et al., 2014). A frequência de isolamento varia dependendo do tipo de alimento, das condições de processamento e da sazonalidade (CAMARGO et al., 2014). Estudos mostram que os alimentos de origem animal (até 98,3%) são mais contaminados por enterococos que alimentos de origem vegetal (até 73,3%) (CAMARGO et al., 2014; MCGOWAN et al., 2006). A água de irrigação de vegetais também apresenta frequência maior de enterococos (63%, 41,2%) que os próprios vegetais (42%, 34,3%) (ABRIOUEL et al., 2008; MICALLEF et al., 2013).

Em produtos cárneos processados, estes microrganismos podem atuar como deteriorante (FRANZ et al., 2003), principalmente em carnes embaladas à vácuo. O sinal de contaminação se caracteriza pelo estufamento da embalagem ou esverdeamento do produto. Em carnes cozidas e não curadas, os sinais são viscosidade superficial e acidificação (ALCANTARA et al., 2012). A capacidade de produção de aminas biogênicas em produtos cárneos e lácteos também é atribuída

a este gênero (OGIER;SERROR, 2008). Enterococos foram detectados em cortes de carne de ovelha, cabra, porco, bovinos e frango; em produtos processados tais como filé de peru, presunto, salame, hambúrguer, *nugget* e rosbife obtidos por processos industriais e artesanais, sendo *E. faecalis* a espécie predominante, seguida de *E. faecium* (BARBOSA; FERREIRA; TEIXEIRA, 2009; DELPECH et al., 2012; GOUSIA et al., 2011; KOLUMAN; AKAN; ÇAKIROGLU, 2009; PESAVENTO et al., 2014; RIBOLDI et al., 2009). Por outro lado, *E. faecium* é detectado como a espécie prevalente em amostras de carne de frango, porco, bovino e peixe defumado coletadas no Brasil (CAMARGO et al., 2014; GOMES et al., 2008). As espécies *E. casseliflavus/flavenses* (BARBOSA; FERREIRA; TEIXEIRA, 2009), *E. durans* (GOUSIA et al., 2011; PESAVENTO et al., 2014), *Enterococcus haemoperoxidus*, *Enterococcus sanguinicola* (CAMARGO et al., 2014), *E. avium* (CAMARGO et al., 2014; PESAVENTO et al., 2014) e *E. gallinarum* são relatadas com menor frequência (PESAVENTO et al., 2014).

A presença de enterococos em leite e derivados é atribuída à contaminação pelas fezes dos animais, por meio dos equipamentos e mãos de manipuladores, ou são adicionados para promover a maturação. Adicionalmente, a pasteurização do leite e o tratamento térmico aplicado a alguns queijos não são suficientes para eliminar esse microrganismo (FURLANETO-MAIA et al., 2014; JAMET et al., 2012).

E. faecium foi a espécie predominante na maioria dos estudos envolvendo leite e derivados (CAMARGO et al., 2014; DELPECH et al., 2012; FURLANETO-MAIA et al., 2014; GOMES, et al., 2008; PESAVENTO et al., 2014). Alguns estudos porém, relataram a prevalência de *E. faecalis* em amostras de queijos frescos, semi-duros, duros e coloniais (JAMET et al., 2012; RIBOLDI et al., 2009). Em menor frequência, foram detectados *E. durans* (HUYS et al., 2004; JAMET et al., 2012; PESAVENTO et al., 2014), *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* (FURLANETO-MAIA et al., 2014; HUYS et al., 2004), *E. avium* (PESAVENTO et al., 2014), *E. haemoperoxidus* e *E. sanguinicola* (CAMARGO et al., 2014).

Frutas e vegetais são alimentos essenciais em uma dieta alimentar saudável. Por essa razão há um estímulo para o consumo e uma maior procura por esses produtos (CAMPOS, J. et al., 2013). Porém eles são consumidos crus, submetidos a tratamentos térmicos brandos ou somente sanitizados tornando-os potenciais veiculadores de microrganismos patogênicos (CAMPOS, J. et al., 2013; SCHWAIGER et al., 2011). As autoridades ligadas à segurança alimentar se

empenham para identificar a presença de bactérias patogênicas nesses alimentos tais como: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Enterococcus* para avaliarem os riscos de provocarem doenças (CAMPOS, J. et al., 2013; CARDAMONE et al., 2015; SCHWAIGER et al., 2011).

Estudos detalhados sobre enterococos em alimentos de origem vegetal não são abundantes no mundo. Gomes et al. (2008) encontraram *E. casseliflavus* como espécie predominante em vegetais prontos para consumo, legumes, vegetais amiláceos, legumes minimamente processados, cogumelos, azeitonas e ervas frescas. Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores como Campos, J. et al. (2013) que detectaram a espécie em saladas prontas para consumo: vegetais folhosos, cenoura, mistura de folhosos e cenoura e na mistura de folhosos, cenoura e milho coletados em Portugal; e por McGowan et al. (2006) e Micallef et al. (2013) que encontraram a mesma espécie em tomates e rabanetes, nos Estados Unidos da América (EUA).

Em estudo realizado no Japão, *E. casseliflavus* foi a única espécie detectada em amostras de cenoura, espinafre e pepino (IZUMI, et al., 2004). Essa espécie também foi encontrada, mas não predominantemente, em outras amostras vegetais como cereja, pimentão verde, azeitona preta (ABRIOUEL et al., 2008), em alimentos orgânicos como guacamole e farinha integral de trigo vermelho (FERNANDEZ-FUENTES et al., 2012) ambos na Espanha, e em vegetais diversos coletados na Tunísia, onde não foram citadas as amostras utilizadas (SAID et al, 2015).

E. faecium foi predominante em vegetais diversos coletados na Europa (HUYS et al., 2004) e na Tunísia (SAID et al., 2015); em beterraba, batata e salsa coletados no Brasil (RIBOLDI et al., 2009); em azeitonas fermentadas verdes e pretas, beterraba, alcachofra, broto de alfafa, brócolis, endívias, salada Primavera, salada Mediterrânea embalada, morango, alface, cereja, batata, produtos a base de soja e tomate na Espanha (ABRIOUEL, et al., 2008) e em saladas prontas para consumo na Itália (PESAVENTO et al., 2014). Sua detecção também foi relatada por Campos, J. et al. (2013) e Fernandez-Fuentes et al. (2012), no entanto, não foi predominante.

Em igual proporção, *E. faecium* e *E. faecalis* foram relatados em vegetais diversos coletados no Brasil (CAMARGO et al., 2014). *E. Faecalis* foi a única espécie detectada em saladas, cereais, legumes, raízes, vegetais bulbosos, e frutas

(tomate, pimenta, abobrinha e pepino) coletados na Alemanha (SCHWAIGER et al., 2011). A espécie foi relatada como a segunda mais frequente em saladas prontas para consumo (CAMPOS, J. et al., 2013; PESAVENTO et al., 2014), em vegetais diversos (HUYS et al., 2004; RIBOLDI et al., 2009) e em tomate (MICALLEF et al., 2013). A espécie também foi encontrada em tremoço (OMAR, et al., 2004), azeitona (FOULQUIÉ-MORENO, 2006), guacamole, tomate e beringela orgânicos (FERNANDEZ-FUENTES et al., 2012), batata inglesa e espinafre (KAUR; RAI, 2015).

Outras espécies relatadas em vegetais, com menor frequência, foram: *E. durans* em tomate orgânico, coletado na Espanha e saladas prontas para consumo coletadas na Itália (FERNANDEZ-FUENTES et al., 2012; PESAVENTO et al., 2014); *E. gallinarum* em saladas prontas para consumo coletadas em Portugal e Itália (CAMPOS, J. et al., 2013; PESAVENTO et al., 2014) e em tomates (MICALLEF et al., 2013); *E. hirae* em saladas prontas para consumo coletadas em Portugal (CAMPOS, J. et al., 2013) e em vegetais diversos coletados na Tunísia (SAID et al., 2015); *E. haemoperoxidus* em alface e *E. columbae/raffinosis* em amostras de vegetais diversos coletados no Brasil (CAMARGO et al., 2014); *E. mundtii* em cereja coletada na Espanha (ABRIOUEL et al., 2008); e *E. avium* em tomates nos EUA (MICALLEF et al., 2013).

Diferente de diversas BAL, o gênero *Enterococcus* não é reconhecido como seguro, *Generally Recognized as Safe* (GRAS), e em 2004, o Canadá proibiu seu emprego como probiótico (OGIER; SERROR, 2008). A EFSA continua mantendo *E. faecium* fora da lista de presunção qualificada de segurança (EFSA, 2013). A insegurança é atribuída a isolados patogênicos que ocasionam infecções em humanos, especialmente no ambiente hospitalar (FISHER; PHILLIPS, 2009; OGIER; SERROR, 2008); *E. faecium* e *E. faecalis* resistentes a antimicrobianos tem sido a principal causa de endocardite e infecções urinárias em pacientes imunocomprometidos, idosos ou com comorbidades internados em hospitais (MALANY et al., 2002; MURRAY, 2000). Como consequência da resistência desse microrganismo a antimicrobianos ocorre o aumento do tempo de internação, que tem um grande impacto negativo sobre os custos hospitalares, além de exigir esquemas terapêuticos adicionais (CABALERRO-GRANADO et al., 2001; WENZEL; EDMOND, 2001).

Outro fator limitante para o não recebimento do atributo GRAS, pela EFSA, pode estar relacionado com a possível capacidade desse microrganismo de

transferir fatores de virulência e resistência a antimicrobianos entre os isolados dos diferentes nichos ecológicos: ambiente hospitalar, comensais, alimentos e animais (EFSA, 2013; OGIER; SERROR; 2008), por meio da conjugação (MONTALBAN-LOPEZ et al., 2011). A conjugação é um mecanismo de transferência direta e horizontal de genes, envolvendo contato entre células, pela troca de plasmídeos e transposons, que são frações de DNA extracromossômico onde estão localizados diversos genes de resistência a antimicrobianos e de fatores de virulência (OGIER; SERROR, 2008).

3.3 FATORES DE VIRULÊNCIA

Diversos fatores de virulência foram descritos em enterococos, tais como: substância de agregação (codificada pelo gene *agg*), gelatinase (*gelE*), citolisina (*cylA*, *cylB*, *cylM*), fator de aderência (*ace*), proteínas de superfície (*esp*), hialuronidase e fatores de colonização acessórias (pili) (FISCHER; PHILLIPS, 2009, SANTOS et al., 2015). Esses fatores são responsáveis pela colonização e fixação do microrganismo ao hospedeiro, pela invasão de tecidos e pela resistência aos mecanismos de defesa, levando a uma sequência de eventos até a patogênese (FOULQUIE-MORENO et al., 2006). Esse papel de adesão e fixação ocorre também em superfícies no meio ambiente (MEDEIROS et al., 2014). Alguns desses fatores de virulência são codificados por plasmídeos conjugativos e dessa forma podem ser transmissíveis pela conjugação (OGIER; SERROR, 2008).

A presença dos fatores de virulência em enterococos e sua expressão, é mais acentuada em isolados clínicos, seguida de alimentos e por fim de culturas iniciadoras (ABRIOUEL et al., 2008; FISCHER; PHILLIPS, 2009; MEDEIROS et al., 2014). *E. faecalis* apresentam um número maior de fatores de virulência que isolados de *E. faecium*, ambos obtidos a partir de alimentos (ABRIOUEL et al., 2008; FRANZ et al., 2003; GOMES et al., 2008). Isso provavelmente ocorre porque em *E. faecalis*, há mais plasmídeos responsivos a feromônios que são capazes de transferir genes, que codificam fatores de virulência como *agg* e *cylA*, com alta frequência, se comparado ao *E. faecium* (FISCHER; PHILLIPS, 2009; FRANZ et al., 2003). A atividade hemolítica, bem como genes que codificam para *cyl*, foram

detectados em isolados de *E. faecalis*, *E. faecium* (GOMES et al., 2008; MEDEIROS et al., 2014), *E. casseliflavus* e *E. mundtii* (ABRIOUEL et al., 2008).

Isolados de enterococos, principalmente *E. faecalis* e *E. faecium*, obtidos de alimentos, apresentam os fatores de virulência *agg* (ABRIOUEL et al., 2008; CHOI; WOO, 2015; GOMES et al., 2008; MEDEIROS et al., 2014); *esp* (ABRIOUEL et al., 2008; GOMES et al., 2008; KLIBI et al., 2013) e *ace* (GOMES et al., 2008; MEDEIROS et al., 2014). O fator de virulência *gelE* foi relatado em isolados *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus* e *E. gallinarum* obtidos de alimentos (ABRIOUEL et al., 2008; GOMES et al., 2008; KLIBI et al., 2013; MEDEIROS et al., 2014), no entanto, a degradação da gelatina não ocorreu na maioria dos isolados em que o gene foi detectado (GOMES et al., 2008; MEDEIROS et al., 2014).

3.3.1 Formação de biofilmes

Biofilme é uma comunidade de microrganismos aderidos a superfícies inertes ou a tecidos vivos, envolvidos por polímeros extracelulares (DONLAN, 2002; GOMEZ et al., 2013; MARINHO et al., 2013; RAMIREZ et al., 2015). A formação do biofilme é um processo complexo, que envolve mecanismos genéticos e outros fatores, tais como as propriedades da superfície de contato e sua interação com a célula bacteriana (SHI; ZHU, 2009). Este processo é regulado por mecanismos de *quorum-sensing* que são formas de comunicação intra e interespecies (FONSECA, 2010; MOHAMED, HUANG, 2007).

A formação de biofilme compreende várias etapas:

- colonização e imobilização de células de vida livre a uma superfície;
- crescimento, multiplicação e interação célula - célula;
- formação de colônias e secreção de exopolissacarídeos;
- maturação das colônias, adesão de colonizadores secundários, formação de agregados e maturação do biofilme;
- ruptura do biofilme e dispersão de células para outras superfícies (DONLAN, 2002).

Alguns fatores de virulência podem facilitar a aderência celular seguida de colonização, favorecendo a formação de biofilmes (FRANZ et al., 2003; MEDEIROS

et al., 2014). Estudos detectaram correlação entre a presença de genes que codificam o fator de virulência *esp* e a formação de biofilme em isolados clínicos de *E. faecalis* e *E. faecium* (FISHER; PHILLIPS, 2009; HEIKENS et al., 2007; TENDOLKAR et al., 2004; TOP et al., 2013). Tendolkar et al. (2004) observaram que quando o gene *esp* foi suprimido dos isolados formadores de biofilme forte, sua formação continuou a ocorrer, mesmo que em menor intensidade, sugerindo que deve existir outros determinantes que também contribuem para a formação do biofilme. De fato, há um regulador do gene que codifica a *esp* denominado regulador de biofilme enterocócico (*ebr-B*), que influencia na expressão de *esp* (TOP et al., 2013).

A literatura também traz que os fatores de virulência *agg* e *gelE* atuam na formação de biofilme, pois a maioria dos isolados produtores de biofilme forte obtidos de enterococos de infecções urinárias transportavam estes dois genes (TIWARI et al., 2014). Medeiros et al. (2014) também detectou a correlação entre a presença de genes *gelE* e *ace*, e sua expressão, com a capacidade de formação de biofilme forte nos isolados clínicos de enterococos. Contudo, neste mesmo estudo, foi detectada a presença de *gelE* e *ace* em isolados de alimentos, no entanto, não verificaram associação entre esses fatores de virulência e a formação de biofilme. A expressão da *gelE* é regulada positivamente pelo gene regulador de *Streptococcus faecalis* (*fsr*) que faz parte do sistema de *quorum sensing* o que pode explicar em parte, a diferenças no desempenho da gelatinase na formação de biofilme (MOHAMED; HUANG, 2007).

A formação de pili, uma estrutura responsável por fazer a ligação física entre duas bactérias, é necessária para o desenvolvimento de biofilme em enterococos (FISHER; PHILLIPS, 2009). O pili promove o contato célula-célula para que ocorra a transferência horizontal de plasmídeos pela conjugação. Assim, o estímulo da formação do biofilme ocorre porque o pili pode atuar, também, como fator de adesão (VAN HOUDT; MICHIELS, 2010).

Fatores ambientais como temperatura, pH, presença de nutrientes, osmolaridade, presença de outras bactérias e tipo de superfície também interferem na formação de biofilme (MOHAMED; HUANG, 2007; VAN HOUDT; MICHIELS, 2010). Foram realizados estudos *in vitro*, com isolados de *E. faecalis* e *E. faecium* provenientes de alimentos tratados com Caldo Triptona de Soja (TSB) enriquecido com 0,75% de glicose (MARINHO et al., 2013), com isolados de *E. faecalis* de

amostras clínicas incubadas com TSB enriquecido com 1% de glicose (PILLAI et al., 2004) e com isolados de *E. faecalis* de amostras clínicas submetidas a caldo BHI com 0,75% de glicose (CASSENEGO, 2014), demonstrando influência positiva do carboidrato na capacidade de formação de biofilme. Em enterococos, há genes que controlam a expressão do biofilme mediados pelo tipo do carboidrato e sua concentração. Entre esses genes foram relatados o *fsr* (PILLAI et al., 2004), *erb-B* (TOP et al., 2013), que também controlam a expressão da *gelE* e *esp*, respectivamente, e o gene regulador transcricional de ligação de açúcares (*bopABCD*) (CRETI et al; 2006).

Para Fonseca (2010) que estudou o desenvolvimento do biofilme de enterococos de origem clínica e de alimentos submetidos a diferentes regimes de temperatura e nutrientes, a formação de biofilme e a adesão dependem principalmente das condições do meio. A temperatura de 10 °C inibiu fortemente o desenvolvimento de biofilme, *in vitro*, e a 37 °C ocorreu o melhor desempenho de formação de biofilme nos isolados de *E. faecium* provenientes de alimentos (MARINHO et al., 2013). O mesmo foi reportado por Cassenego (2014) com *E. faecalis* obtidos de alimentos submetidos a incubação a 36 °C e por Fernandes; Kabuki e Kuaye (2015) quando *E. faecalis* e *E. faecium* isolados de soro de leite em uma planta de processamento de ricota, tiveram melhor formação de biofilme a 25 °C e 39 °C, enquanto que a 7 °C não houve formação de biofilme durante 8 dias de incubação. Esses estudos demonstram a influência positiva da temperatura quando esta se aproxima de 35 °C, a temperatura ótima de crescimento de enterococos, na formação de biofilme.

Teoricamente qualquer superfície que combine certas condições nutricionais e de umidade é suscetível à formação de biofilme (FONSECA, 2010). Biofilmes de enterococos foram encontrados em diversos tipos de dispositivos médicos tais como próteses artificiais de quadril, dispositivos intra-uterinos, próteses valvares cardíacas, cateteres venosos e cateteres urinários, todos associados com infecções em humanos (COSTERTON, 1999; DONLAN, 2002).

Biofilmes de microrganismos patogênicos foram detectados em alimentos e em superfícies de processamento de alimentos, comprometendo a higiene dos mesmos bem como podendo atuar como reservatório de patógenos e microrganismos deteriorantes. Em última instância biofilmes microbianos produzidos em superfícies de alimentos representam um risco para a saúde pública (FONSECA

2010; SHI; SHU, 2009; VAN HOUDT; MICHIELS, 2010).

A fixação de microrganismos na superfície de alimentos pode ser considerada como um primeiro passo para a deterioração desses produtos, e sua permanência e crescimento dependem de sua capacidade de se manter aderido. Assim, o conhecimento sobre as características de formação de biofilmes em alimentos frescos é útil para estabelecer diretrizes sobre o armazenamento seguro destes alimentos (BAE et al., 2014).

As bactérias quando organizadas em biofilme, conseguem suportar melhor condições adversas, maiores concentrações de antimicrobianos, são mais resistentes aos fagócitos, estão mais receptivas a trocas de material genético e apresentam alteração nas taxas metabólicas (DONLAN, 2002; FONSECA, 2010). A formação de biofilme por bactérias em alimentos vegetais é uma estratégia vantajosa para superar as condições adversas. O biofilme pode ser formado nas folhas, raízes e inclusive nos espaços intercelulares das células vegetais. Como resultado o biofilme as protege da dessecação, da radiação UV e de outros estressores ambientais, bem como de antimicrobianos produzidos pela planta, por outras bactérias e de produtos químicos usados no plantio, inclusive aqueles utilizados no processamento dos vegetais (YARON; ROMLING, 2014).

3.3.2 Resistência antimicrobiana em *Enterococcus*

O aumento da detecção de enterococos resistentes a antimicrobianos pode ser resultado do uso massivo dessas substâncias como promotores de crescimento ou na terapêutica de animais de corte, bem como, na clínica humana (SOUZA, 2013; TALEBI et al, 2015). A grande exposição aos agentes antimicrobianos faz com que os microrganismos desenvolvam mecanismos para superar seus efeitos e sobreviver. Os mecanismos genéticos de resistência denominados intrínsecos e os adquiridos são os mais importantes. Mecanismos intrínsecos se manifestam em geral por mudanças no estado fisiológico da bactéria, mediadas por genes localizados no cromossomo, com baixa capacidade de transferência horizontal, não representando risco potencial de patogenicidade. Essa é uma característica de muitos isolados do gênero *Enterococcus* (SHARMA et al., 2014).

Já a resistência adquirida ocorre por transferência horizontal de genes localizados em plasmídeos e transposons (GIRAFFA, 2002; MURRAY, 1990). Isolados resistentes a antimicrobianos tornam-se um potencial risco à saúde, devido a possibilidade dessa resistência poder ser transferida para outras bactérias, de diferentes nichos ecológicos e até, para outros gêneros (FISCHER; PHILLIPS, 2009; SHARMA et al., 2014).

A determinação da resistência a antimicrobianos pode ser realizada tanto fenotipicamente como genotipicamente. A verificação fenotípica, em geral, utiliza testes de sensibilidade a antimicrobianos como o antibiograma pelo método de disco-difusão, onde os isolados são testados contra diferentes tipos de antimicrobianos, sendo classificados como sensível ou resistente conforme o tamanho do halo de lise bacteriana (CLSI, 2011). No entanto, um isolado sensível pode transportar genes silenciosos de resistência, logo a utilização de ferramentas moleculares, como a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), para detectar a presença destes genes, é importante (SHARMA et al., 2014).

Os enterococos apresentam resistência a uma grande variedade de antimicrobianos (GIRAFFA, 2002; MURRAY, 1990). Além disso, a patogenicidade hospitalar e o aumento da resistência aos glicopeptídeos, em especial à vancomicina (CETINKAYA et al., 2000; CHRISTENSEN; JOHO; MATHEWS, 2008; GOUSIA et al., 2011; MURRAY, 2000), representa um grande problema no tratamento de infecções hospitalares (CETINKAYA et al., 2000), visto que esse fármaco é utilizado na clínica humana como último recurso para o tratamento de infecções enterocócicas resistentes a outros fármacos (HUYCKE et al., 1998). Enterococos resistente à vancomicina chegou a atingir 28,3% das infecções nas unidades de terapia intensiva dos EUA (SOUZA, 2013). Admite-se que a alta taxa de resistência encontrada em casos humanos nesse país, se deve ao uso indiscriminado do antimicrobiano no ambiente hospitalar (MENICHETTI, 2005; SOUZA, 2013).

Seis grupos de genes que codificam resistência à classe dos glicopeptídeos foram detectados em enterococos. Os fenótipos *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE* e *vanG* são do tipo adquirida. O fenótipo mais frequente é *VanA*, associado ao elevado nível de resistência e a resistência cruzada com outro antimicrobiano da classe, a teicoplanina. Esse gene é transferido por meio do transposon Tn1546 (GILMORE, 2002). Em segundo lugar aparece *vanB* que apresenta níveis variáveis de

resistência induzida somente à vancomicina (CETINKAYA et al., 2000). A transferência de *vanB* ocorre mediante a troca do transposon Tn1547 e / ou Tn5382. Ambos os grupos de genes *vanA* e *vanB*, têm sua resistência transferida por transposons, que estão presentes nos cromossomos, mas também, podem ocorrer em plasmídeos (FISCHER; PHILLIPS, 2009).

A resistência à vancomicina intrínseca é identificada pelo fenótipo *vanC*, localizado no cromossomo, portanto não transferível (GILMORE, 2002). Devido a isso, os enterococos que transportam os genes *vanC* apresentam baixos níveis de resistência (CETINKAYA et al., 2000). Genes *vanC* são característicos dos enterococos móveis: *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* e *E. flavescens* (GILMORE, 2002; NAVARRO; COURVALIN, 1994).

A resistência as cefalosporinas, sulfonamidas, lincosamidas, maioria dos beta-lactâmicos e aminoglicosídeos em baixa concentração, é reconhecida como intrínseca (MOELLERING, 1992; MURRAY, 1990). Já em elevadas concentrações de aminoglicosídeos a resistência é do tipo adquirida (OGIER; SERROR, 2008) e foi constatado aumento desse tipo de resistência em enterococos (SOUZA, 2013). Como a gentamicina da classe dos aminoglicosídeos, é utilizada em associação com penicilina, ampicilina ou vancomicina no tratamento de infecções enterocócicas graves, o alto nível de resistência a este antimicrobiano ocasiona aumento na probabilidade de falha clínica e até mesmo morte (LARSEN et al., 2010).

Os enterococos apresentam resistência do tipo adquirida à tetraciclina, pois a pressão seletiva causada pelo uso excessivo do antimicrobiano no passado elevou o número de genes adquiridos por transferência horizontal (CHOI; WOO, 2015). A maioria dos genes, (*tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetG*, *tetH*, *tetL*, *tetI*, *tetJ*, *tetK*, *tetV*, *tetY* e *tetZ*), que codificam resistência à tetraciclina são para o mecanismo bioquímico de bomba de efluxo e outros, (*tetM*, *tetO*, *tetQ*, *tetS*, *tetT* e *tetW*), para o mecanismo de proteção ribossomal (CHOPRA; ROBERTS, 2001). Os genes *tetM*, *tetL* e *tetS* são os mesmos em isolados de enterococos presentes em animais, humanos e em alimentos. O gene de resistência à tetraciclina (*tet*) exhibe coexistência eritromicina/cloranfenicol, sugerindo que a seleção do genótipo *tet* pode estar associado com transposons que podem proporcionar uma base molecular para resistência a múltiplos antimicrobianos (HUYS et al., 2004; PETERS et al., 2003). Essa característica dos genes *tet* é uma das razões pela qual os enterococos tem sido apontados como potencialmente perigosos quando usados como probióticos,

uma vez que esses genes são encontrados nesse tipo de produto (SHARMA et al., 2014).

3.3.2.1 Resistência antimicrobiana em *Enterococcus* isolados de alimentos

A resistência enterocócica aos antimicrobianos não é exclusiva da área clínica, mas também é frequente na área de alimentos. Alguns estudos estão centrados no possível papel dos enterococos em alimentos como reservatórios ou veículos de resistência a antimicrobianos e fatores de virulência, até uma possível interação entre ambos (CHRISTENSEN; JOHO; MATTHEWS, 2008; KLEIN, 2003; MARTINEZ; BAQUERO, 2002). Outros tentam comparar a resistência de isolados provenientes de alimentos, humanos e de animais, sendo constatado até o momento que a incidência é menor em alimentos, quando comparada com isolados clínicos, do solo e da água (ABRIOUEL et al., 2008; MICALLEF et al., 2014).

A carne é considerada uma das principais fontes alimentares de patógenos e bactérias resistentes a antimicrobianos (GOUSIA et al., 2011). Na Europa dados sobre resistência de *E. faecium* e *E. faecalis* à tetraciclina, isolados de carnes de aves, suínos e bovinos, apontam para taxas que variam de 31 a 85% (EFSA, 2010). A resistência à tetraciclina é uma das formas mais frequentes, encontrada em enterococos isolados de alimentos (PETERS et al., 2003). Sua persistência pode ser explicada porque alguns países ainda mantêm seu uso como promotor de crescimento em animais de corte, mesmo que vários outros já a baniram da medicina veterinária (CHOPRA; ROBERTS, 2001, CHOI; WOO, 2015). Na clínica humana, a tetraciclina é pouco usada em detrimento de outros novos medicamentos desta classe (CHOPRA; ROBERTS, 2001).

Uma pesquisa realizada na Grécia com produtos cárneos revelou resistência à vancomicina em 21,1% dos isolados (GOUSIA et al., 2011). Alimentos obtidos no comércio varejista apresentaram elevada contaminação por enterococos, 50% das amostras, sendo que 3% provenientes de carne de frango, identificadas como *E. faecalis*, foram resistentes à vancomicina (KOLUMAN; AKAN; ÇAKIROGLU, 2009). Essa resistência pode emergir por meio do uso de avoparcina na alimentação animal, que pode ser transferida para alimentos destinados ao consumo humano e destes

para os humanos (MANNU et al., 2003; WEGENER et al., 1999). Essa hipótese está sustentada pelo fato de que após a avoparcina ter sido banida da Europa, houve diminuição nas taxas de enterococos resistente à vancomicina (MANNU et al., 2003; KHUN et al., 2005).

A constatação do aumento da detecção de *E. faecalis* resistentes a altos níveis de aminoglicosídeos, isolados em ânus e carne de suínos, coincidiu com o aumento do número de pacientes internados em hospitais na Dinamarca, infectados com a mesma espécie, que apresentaram as mesmas características de resistência. Este fato pode sustentar a hipótese da veiculação desses microrganismos por alimentos (LARSEN et al., 2010). No Brasil, também foram detectados enterococos resistentes altos níveis de amiloglicosídeos (estreptomicina), em carnes de suínos e de aves (GOMES et al., 2008).

Alta frequência de enterococos resistentes à eritromicina, um antimicrobiano da classe dos macrolídeos, foi detectada quando esses eram provenientes de produtos lácteos (JAMET et al., 2012; OMAR et al., 2004). No primeiro estudo, a frequência foi maior quando enterococos foram isolados de amostras de queijos produzidos a partir de leite cru. Uma das razões para a alta incidência da resistência à eritromicina é uso da tilosina, outro macrolídeo, em animais de corte. Taxas elevadas de resistência a esse antimicrobiano reforçam a necessidade de atenção na clínica humana, uma vez que a eritromicina é prescrita como substituta da penicilina para pacientes alérgicos (OMAR et al., 2004).

Em um estudo recente, a resistência à tetraciclina foi detectada em 70% dos isolados obtidos de queijos brasileiros (FURLANETO-MAIA et al., 2014). Nesse mesmo estudo, foi constatado que todos os isolados resistentes à vancomicina também foram para antimicrobianos clinicamente importantes como eritromicina, tetraciclina, amicacina, norfloxacin, cefalotina e ácido nalidíxico. Mesmo que em baixa frequência, a resistência à vancomicina foi detectada em outros estudos envolvendo isolados de enterococos provenientes de leite e derivados (GOMES et al., 2008; RIBOLDI, et al., 2009).

Enterococos isolados de alimentos de origem vegetal também apresentam resistência a antimicrobianos. A resistência à ciprofloxacina foi a mais relatada, sendo que em isolados de *E. casseliflavus* provenientes de tomates a taxa foi elevada (MICALLEF et al., 2013). Em menor proporção foi relatada resistência à ciprofloxacina em *E. faecalis*, isolados de vegetais diversos, coletados na Alemanha

(SCHWAIGER et al., 2011), em enterococos obtidos de saladas prontas para consumo na Itália (PESAVENTO et al., 2014) e de amostras de repolho coletadas no Brasil (RIBOLDI et al., 2009).

A resistência à nitrofurantoína foi relatada por McGowan et al. (2006), Riboldi et al. (2009) e por Schwaiger et al. (2011). Estes últimos pesquisadores detectaram esta resistência em *E. casseliflavus* provenientes de tomates e rabanetes coletados nos EUA.

Enterococos resistentes à rifampicina (MICALLEF et al., 2013; SCHWAIGER et al., 2011), à levofloxacina (MICALLEF et al., 2013), à eritromicina (MICALLEF et al., 2013, PESAVENTO et al., 2014), à vancomicina (PESAVENTO et al., 2014; TERKURAN et al., 2014), penicilina (MCGOWAN et al., 2006; PESAVENTO et al., 2014), tetraciclina (PESAVENTO et al., 2014; RIBOLDI et al., 2009), quinupristin/dalfopristin (MICALLEF et al., 2013; RIBOLDI et al., 2009), sulfametoxazol/trimetropin, doxicilina, fosfomicina (SCHWAIGER et al., 2011), gentamicina (PESAVENTO et al., 2014) e daptomicina (MICALLEF et al., 2013) também foram isolados de vegetais.

Gousia et al. (2011) detectaram multirresistência em 8,8% dos isolados de enterococos provenientes de carne suína, para os antimicrobianos: ciprofloxacina/ampicilina/vancomicina, ampicilina/ciprofloxacina/tetraciclina e eritromicina/ciprofloxacina/vancomicina. Estudo realizado por Barbosa; Ferreira e Teixeira (2009) mostraram que 100% dos isolados provenientes de produtos cárneos fermentados, apresentaram resistência a pelo menos dois antimicrobianos, podendo ser resistentes a até quatro, sendo que as que mais ocorreram foram para: ciprofloxacina/rifampicina, tetraciclina/rifampicina e eritromicina/rifampicina. Em consequência desse cenário, os alimentos estão sendo apontados como reservatórios de enterococos resistentes a antimicrobianos (CAMPOS, J. et al., 2013; CHOI; WOO, 2015; GOUSIA et al., 2011; OGIER; SERROR, 2008).

Visto que alguns genes de fatores de virulência e de resistência a antimicrobianos partilham do mesmo mecanismo de transferência de genes, a conjugação, foi identificada associação entre virulência e resistência a antimicrobianos. Uma dessas, foi detectada entre genes que codificam *agg* e genes de resistência à tetraciclina presentes em *E. faecalis* isolados de alimentos, onde um plasmídeo induzível por feromônio denominado pCF10, atua na codificação de ambos os genes (CHOI; WOO, 2015). Outra, foi relatada no estudo de Billstrom et al.

(2008) onde observaram uma forte correlação entre isolados de *E. faecium* portadores de genes *esp* e uma maior ocorrência de resistência à ampicilina, à ciprofloxacina e imipenem ($p < 0,01$) nesses mesmos isolados. Os mesmos autores, sugerem que tal vínculo pode ser atribuído a taxas de conjugação mais elevadas em isolados de *E. faecium* que transportavam genes *esp*, enquanto que isolados que não possuíam esses genes as taxas de conjugação eram menores.

As razões para o aparecimento de resistência e sua disseminação são complexas, multifatoriais e pouco conhecidas (GOUSIA et al., 2011). Há uma grande variabilidade nas taxas de resistência, e ainda não é possível definir com clareza se isolados em alimentos são totalmente distinguíveis de isolados de amostras clínicas (OGIER; SERROR, 2008; EFSA, 2013). Tal complexidade pode ter relação com a forma de uso dos antimicrobianos que podem mudar de uma região para outra, com o tipo de amostra, identidade taxonômica do microrganismo (HUYS et al., 2004), bem como diferenças dependendo do método de isolamento (KLEIN, 2003). A rápida aquisição de resistência a antimicrobianos entre os enterococos provavelmente contribui para sua emergência como patógenos hospitalares (OGIER; SERROR, 2008).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAGEM E PREPARO DA AMOSTRA

No período de março a junho de 2015 foram adquiridas 66 amostras de vegetais folhosos (acelga, agrião hidropônico, alface, almeirão, broto de bambu, broto de feijão, cheiro-verde, couve manteiga fatiada, couve manteiga em maço, rúcula de plantio comum, rúcula hidropônica e repolho), legumes (abobrinha, brócolis, couve-flor, milho verde descascado, pepino, pimentão verde, pimentão vermelho, tomate e vagem) e raízes (cenoura e mandioca descascada) *in natura* e minimamente processados, comercializados em supermercados, feiras-livres e direto do produtor nas regiões Centro-sul e Norte do Paraná. Os vegetais foram acondicionados em suas embalagens originais ou em sacos plásticos sanitizados e transferidos para caixa isotérmica com gelo até o processamento.

Posteriormente, 25 g de cada produto foram pesados assepticamente e transferidos para 225 mL de água peptonada 1% (m/v) estéril. O frasco foi agitado vigorosamente por 30 s quando a amostra era proveniente de vegetais folhosos e por 2 min para os demais vegetais. Foi aguardada a decantação da amostra para o preparo das diluições seriadas.

4.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA DE *Enterococcus* sp.

A partir das diluições seriadas das amostras, uma alíquota de 100 μ L foi depositada e espalhada na superfície de Ágar KEA (Isofar) com alça de Drigalski. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica (Ethiktechnology, 410 SNDRE) a 37°C por 24 h. Colônias de coloração negra, características de enterococos, foram contadas e três delas foram inoculadas em ágar BHI (Himedia) seguida de incubação a 37°C por 24 h.

Paralelamente, a diluição 10^{-1} foi incubada a 37°C por 18 h. Não havendo colônias típicas no ágar KEA, previamente incubados, uma alíquota desta solução

foi semeada por esgotamento em superfície de KEA e em Ágar M17 e incubadas a 37°C por 24 h. Um total de três colônias típicas foram selecionadas de ambos os meios, conforme descrito acima.

As colônias provenientes do crescimento em ágar BHI foram submetidas aos testes fenotípicos: reação morfotintorial, teste de catalase e crescimento em meio hipersalínico em diferentes temperaturas.

A reação morfotintorial seguiu o protocolo da coloração de Gram (New Prov), com auxílio do microscópio óptico (Olympus, CX21FS1). Os isolados que se apresentaram como cocos Gram-positivos, aos pares, isolados ou em pequenas cadeias foram submetidos ao teste de atividade da enzima catalase. Para tanto, foi depositada uma suspensão bacteriana sobre lâmina de vidro e acrescentada uma gota de peróxido de hidrogênio 3% (v/v). Isolados sem formação de bolhas, indicativo de reação negativa, foram submetidos a teste de crescimento em caldo BHI acrescido de 6,5% (m/v) de cloreto de sódio, incubados a 10°C e a 45°C por 24 h (FACKLAM et al., 1999). Tubos que apresentaram turvação foram considerados positivos para crescimento de *Enterococcus*.

4.3 EXTRAÇÃO DE DNA E IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA GÊNERO-ESPÉCIE

A extração de DNA genômico foi realizada pelo método de fervura (MARQUES; SUZART, 2004). Os isolados foram cultivados em 3 mL de caldo BHI, e incubados a 37 °C sob agitação constante (120 rpm) por 18 h. Após este período, os tubos foram centrifugados por 10 min a 10.000 rpm, e o *pellet* foi resuspendido em 500 µL de água ultrapura estéril. Esta suspensão foi submetida ao aquecimento, em temperatura de 90 a 100°C, por 30 min. Em seguida, foi resfriada em banho de gelo e feita novamente centrifugação, nas mesmas condições citadas acima. Por fim, foi retirado 150 µL do sobrenadante contendo DNA total e armazenado em freezer a -20 °C. A integridade do DNA e quantificação foi realizada em gel de agarose 0,8%.

Os isolados de *Enterococcus* spp. foram identificados ao nível de gênero/espécie pela PCR, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Oligonucleotídeos iniciadores genero/espécie-específico utilizados para identificação de *Enterococcus* spp.

Gene	Gênero/Espécie	amplicon (pb)	Ta* (°C)	Oligonucleotídeos iniciadores	Fonte
				Sequência (5'-3')	
<i>tuf</i>	<i>Enterococcus</i> <i>sp.</i>	122	54	TACTGACAAACCATTTCATGAG ACTTCGTCACCAACGCGAAC	Dutka-Malen; Evers; Courvalin (1995)
AV1	<i>E. avium</i>	368	55	GCTGCGATTGAAAAATATCCG AAGCCAATGATCGGTGTTTTT	Silva, et al. (2012)
vanC-2 vanC-3	<i>E. casseliflavus</i> / <i>E. flavencens</i>	439	54	CTCCTACGATTCTCTTG CGAGCAAGACCTTTAAG	Dutka-Malen; Evers; Courvalin (1995)
CO1	<i>E. columbae</i>	284	55	GAATTTGGTACCAAGACAGTT GCTAATTTACCGTTATCGACT	Silva, et al. (2012)
ddl _{<i>E. faecalis</i>}	<i>E. faecalis</i>	941	54	ATCAAGTACAGTTAGTCT ACGATTCAAAGCTAACTG	Dutka-Malen; Evers; Courvalin (1995)
ddl _{<i>E. faecium</i>}	<i>E. faecium</i>	550	54	TAGAGACATTGAATATGCC TCGAATGTGCTACAATC	Dutka-Malen; Evers; Courvalin (1995)
vanC-1	<i>E. gallinarum</i>	822	54	GGTATCAAGGAAACCTC CTTCCGCCATCATAGCT	Dutka-Malen; Evers; Courvalin (1995)
sodA <i>E. hirae</i>	<i>E. hirae</i>	186	52	TAAATTCCTCCTTAAATGTTG CTTTCTGATATGGATGCTGT	Jackson; Fedorka-Cray; Barrett (2004)
sodA <i>E. mundtii</i>	<i>E. mundtii</i>	301	52	CAGACATGGATGCTATTCCATCT AGGTTTCTTGCCTTCCATCAAT	Jackson; Fedorka-Cray; Barrett (2004)
SE1	<i>E. seriolicida</i>	100	55	ACACAATGTTCTGGGAATGGC AAGTCGTCAAATGAACCAAAA	Silva, et al. (2012)
SO1	<i>E. solitarius</i>	371	55	AAACACCATAACACTTATGTGACG AATGGAGAATCTTGTTTTGGCGTC	Silva, et al. (2012)

A amplificação do DNA extraído de cada isolado foi realizada em termociclador (Techne-TC3000), em um volume final de 20 μ L, contendo 10 ng de DNA, 1,0 U Taq DNA polimerase (Invitrogen), 10X Tampão da Taq, 2,5 mM de $MgCl_2$, 0,17 mM de cada desoxidionucleotídeo trifosfato (dNTP), 1 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador. O termociclador foi programado para operar nas seguintes condições: desnaturação inicial de 94 $^{\circ}C$ por 2 min, seguido por 30 ciclos de 94 $^{\circ}C$ é 1 min, anelamento na temperatura ideal para cada oligonucleotídeo (Tabela 1), por 1 min, extensão a 72 $^{\circ}C$ por 1 min, e extensão final a 72 $^{\circ}C$ por 10 min. O controle negativo conteve todos os reagentes, porém sem adição da amostra de DNA. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese, em gel de agarose 1,0 % (m/v). Após a corrida eletroforética, os géis foram corados com solução de brometo de etídio 0,005% (m/v) durante 15 min, visualizados em transiluminador ultravioleta e fotodocumentados com sistema computadorizado (Loccus). O tamanho do produto amplificado foi comparado com o marcador de peso molecular Lambda DNA ladder de 1Kb plus (Amersham Pharmacia Biotech).

4.4 TESTE DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

Os padrões de suscetibilidade a antimicrobianos foram determinados pelo método disco-difusão, de acordo com as normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI (CLSI, 2011).

Os ensaios foram realizados a partir de cultivos dos isolados confirmados como *Enterococcus* pela PCR, em caldo BHI, obtidos após incubação a 37 $^{\circ}C$ por 24 h. Posteriormente, foram preparadas suspensões bacterianas em solução salina a 0,85% (m/v), com turbidez semelhante   da solução padrão 0,5 de McFarland (aproximadamente 1×10^8 UFC/mL). As suspensões foram semeadas com zaragatoa sobre a superfície de placas de petri contendo  gar Mueller-Hinton - MHA. Sobre a superfície dos meios inoculados foram depositados discos de papel impregnados com os seguintes antimicrobianos: Ampicilina-AMP (10 μ g), Ciprofloxacina-CIP (5 μ g), Cloranfenicol-CLO (30 μ g), Eritromicina-ERI (15 μ g), Imipenem-IMP (10 μ g), Norfloxacina-NOR (10 μ g), Penicilina-PEN (10 μ g), Tetraciclina-TET (30 μ g), Teicoplanina- TEC (30 μ g) e Vancomicina-VAN (30 μ g)

(Laborclin).

As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C, sendo que os halos de inibição foram mensurados e posteriormente interpretados segundo a tabela de sensibilidade a antimicrobianos. Para o controle de qualidade foi utilizada a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

4.5 VERIFICAÇÃO GENOTÍPICA DE GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

A verificação da presença de genes de resistência foi feita pela técnica da PCR, para os genes que conferem resistência à vancomicina (*vanA*, *vanB*), tetraciclina (*tetL*, *tetM*), gentamicina (*aac(6')*) e eritromicina (*ermB*), constantes na Tabela 2.

Tabela 2 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para determinação da presença de genes de resistência a antimicrobianos.

Gene	amplicon (pb)	Ta* (°C)	Oligonucleotídeos iniciadores	Fonte
Sequência (5'-3')				
<i>vanA</i>	732	56	GGGAAAACGACAATTGC GTACAATGCGGCCGTTA	Dutka-Malen; Evers; Courvalin (1995)
<i>vanB</i>	635	56	ATGGGAAGCCGATAGTC GATTCGTTCCCTCGACC	Dutka-Malen; Evers; Courvalin (1995)
<i>tetL</i>	696	56	GTMGTTGCGCGCTATATTCC GTGAAMGRWAGCCACCTAA	Gevers et al. (2003)
<i>tetM</i>	656	56	GTAAATAGTGTTCCTGGAG CTAAGATATGGCTCTAACAA	Kim et al. (2004)
<i>aac(6')</i> - <i>leaph(2'')</i> - <i>la</i>	348	56	CAGAGCCTTGGGAAGATGAAG CCTCGTGTAATTCATGTTCTGGC	Vakulenko et al. (2003)
<i>ermB</i>	405	56	CATTTAACGACGAAACTGGC GGAACATCTGTGGTATGGCG	Gevers et al. (2003)

Ta*: Temperatura de anelamento com modificação.

A amplificação foi realizada em termociclador (Techne-TC3000), sendo que as reações foram realizadas para um volume final de 20 μ L contendo: 10 ng de DNA, 1,0 U Taq DNA polimerase (Invitrogen), 10X Tampão da Taq, 2,5 mM de $MgCl_2$, 0,17 mM de cada dNTP, 1 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (Tabela 2). As condições da PCR foram: desnaturação inicial a 94 °C por 2 min, seguido por 30 ciclos de 94 °C por 1 min, e anelamento a 56 °C. Como controle negativo, foram utilizados todos os reagentes sem a amostra de DNA. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,0% (m/v). Após a corrida eletroforética, os géis foram corados com solução de brometo de etídio 0,005% (m/v) durante 15 min, visualizados em transiluminador ultravioleta e fotodocumentados com sistema computadorizado (Loccus). O tamanho do produto amplificado foi comparado com o marcador de peso molecular DNA ladder de 1Kb plus (Amersham Pharmacia Biotech).

4.6 FORMAÇÃO DE BIOFILME

A formação de biofilme foi verificada, *in vitro*, pelo método de biomassa total e seguiu o protocolo descrito por Stepanovic' et al. (2007). Uma suspensão bacteriana com densidade óptica ($DO_{600\text{ nm}}$) de 0,08 a 0,1 foi obtida em caldo BHI. Um volume de 200 μ L foi depositado em placas de microtitulação em poliestireno, contendo 96 poços de fundo plano. O inóculo foi feito em duplicata e as placas incubadas a 37 °C por 24 h. O mesmo volume de meio, sem o isolado bacteriano, foi utilizado como controle negativo.

Após o período de incubação, o meio e as células plantônicas foram removidas dos poços, em seguida estes foram lavados com 200 μ L de solução salina estéril 0,85% (m/v) por 3 vezes, seguido de adição de metanol P.A. (Synth) por 15 min. O metanol foi esgotado e aguardada a secagem. Foram adicionados 200 μ L do corante cristal violeta 1% (Cinética) e deixado agir por 5 min. Após, foi feita a lavagem dos poços com 200 μ L de solução salina estéril a 0,85% (m/v). Por fim, foi adicionado 200 μ L de uma solução de ácido acético glacial a 33% (m/m) (Merk) e a $DO_{540\text{ nm}}$ foi medida em um leitor de microplacas.

A média da DO de cada isolado foi classificada como:

- não produtor de biofilme: $DO_{\text{isolado}} \leq DO_{\text{controle}}$;
- produtor de biofilme fraco: $DO_{\text{controle}} < DO_{\text{isolado}} \leq 2 \times DO_{\text{controle}}$;
- produtor de biofilme moderado: $2 \times DO_{\text{controle}} < DO_{\text{isolado}} \leq 4 \times DO_{\text{controle}}$;
- produtor de biofilme forte: $4 \times DO_{\text{controle}} < DO_{\text{isolado}}$.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As associações entre tipo de vegetal e suscetibilidade a antimicrobianos e entre espécies e suscetibilidade, foram verificadas estatisticamente pelo método não paramétrico do qui-quadrado e coeficiente de contingência de Pearson ($\alpha = 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES DE *Enterococcus* spp. EM VEGETAIS

Durante o período de março a junho de 2015 foram processadas 66 amostras de 21 diferentes tipos de vegetais distribuídos entre os grupos folhosos, legumes e raízes. Após a incubação das diluições seriadas nos meios de cultura KEA e M17, foram selecionados aleatoriamente 202 isolados bacterianos com características presuntivas. Estes foram submetidos aos testes fenotípicos, sendo que 109 (54%) apresentaram as características esperadas para o gênero.

Desses isolados, 85 (42%) foram confirmados para o gênero *Enterococcus*, pela técnica da PCR, que foram encontrados em 62% (41) das amostras analisadas. Estes resultados estão de acordo com estudos realizados por Camargo et al. (2014) e Campos, J. et al. (2013) que detectaram enterococos em 70% e 73,3% das amostras de vegetais, respectivamente.

Contudo, estudos apontam que alimentos de origem vegetal são menos contaminados por enterococos em comparação aos de origem animal (GOMES, et al., 2008; MCGOWAN, et al., 2006; PESAVENTO et al., 2014). Alguns autores relataram contaminação por enterococos em 100% de amostras de queijo (FURLANETO-MAIA et al., 2014) e em amostras de queijo e aves de corte (CAMARGO et al., 2004). No entanto, a frequência detectada nos resultados apresentados neste trabalho é elevada, ao ponto de servir de alerta, uma vez que espécies do gênero são apontadas como responsáveis por infecções nosocomiais (FISHER; PHILLIPS, 2009; OGIER; SERROR, 2008) e por atuarem como deteriorantes em alimentos (ALCANTARA et al., 2012).

Cinco espécies de *Enterococcus* foram identificadas (Tabela 3), sendo: 19% *E. casseliflavus/flavescens*, 6% *E. columbae*, 4% *E. faecium*, 4% *E. mundtii*, 2% *E. avium* e 65% *Enterococcus* sp.

Espécies de *Enterococcus* estiveram distribuídas em diversos tipos de vegetais analisados, com exceção de broto de feijão, pepino e vagem (Tabela 3). Em contra partida, as amostras de acelga, broto de bambu, couve-flor, milho verde, pimentão verde, pimentão vermelho, rúcula comum, repolho e tomate foram 100%

positivas para a presença de enterococos. No presente trabalho, 80% das amostras de mandioca descascada foram positivas para a presença de *Enterococcus*, resultado diferente do encontrado por Riboldi et al. (2009) em que todas as amostras de mandioca analisadas não continham enterococos

Tabela 3 - Espécies de *Enterococcus* spp. em alimentos de origem vegetal. Paraná, Brasil, 2015.

Tipo de vegetal	Quantidade de amostras	<i>E. sp.</i>	<i>E. casseliflavus/ flavescens</i>	<i>E. columbae</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. mundtii</i>	<i>E. avium</i>
Abobrinha	6	7	1			1	
Acelga	1	2	1				
Agrião hidropônico	3	4					
Alface	7	4	2				
Almeirão	3	3					
Brócolis	5	2		2			
Broto de bambu	1	1					
Broto de feijão	1						
Cenoura	4	2					
Cheiro-verde	6	2	3				2
Couve-flor	1	2					
Couve manteiga maço	2	1	1				
Couve manteiga fatiada	3	1	1				
Mandioca descascada	5	5			2		
Milho verde	3	2	2		1		
Pepino	1						
Pimentão verde	2	4					
Pimentão vermelho	1	4					
Rúcula comum	1	2					1
Rúcula hidropônica	6	5	5				1
Repolho	1			2			
Tomate	3	3		1			
Vagem	1						
Total de isolados por espécie		56	16	5	3	3	2

Nas análises realizadas, 50% (43/85) dos isolados foram provenientes de vegetais folhosos, 39% (33/85) foram encontrados em legumes e 11% (9/85) em raízes. Onze diferentes tipos de vegetais apresentaram duas espécies de *Enterococcus* spp. na mesma amostra. Ao observar a distribuição das espécies de acordo com os grupos de vegetais, a maior diversidade delas foi encontrada em vegetais folhosos e legumes, sendo detectadas 4 diferentes espécies, porém a diferença foi pequena comparada com o grupo das raízes onde foram encontradas 3 espécies diferentes.

Das espécies identificadas, *E. casseliflavus/flavescens* foi predominante e mais detectado em vegetais folhosos. Estudos de Campos J. et al. (2013), Gomes et al. (2008), McGowan et al. (2006) e Micallef et al. (2013) corroboram com o resultado deste trabalho, uma vez que detectaram *E. casseliflavus/flavescens* como espécie predominante em alimentos de origem vegetal. Essa espécie é naturalmente associada a plantas e ambientes aquáticos (MICALLEF et al., 2013), sendo também encontrada, em menor frequência, em produtos cárneos (BARBOSA; FERREIRA; TEIXEIRA, 2009) e lácteos (FURLANETO-MAIA et al., 2014; HUYS et al., 2004). A maioria (75%) dos isolados de *E. casseliflavus/flavescens* foram detectados em vegetais mais próximos da superfície de cultivo (abobrinha, acelga, alface, cheiro-verde e rúcula). Esse resultado é coerente com os achados de Micallef et al. (2013) cuja espécie foi mais frequentemente detectada em tomates e folhas de tomate mais próximas do solo, do que nos frutos e folhas coletadas no meio ou na ponta dos tomateiros.

E. casseliflavus é uma espécie envolvida ocasionalmente em infecções nosocomiais (DUYGU et al., 2011; SAMBHAV et al., 2011). Nos últimos anos, além de ter aumentado sua frequência em bacteremia, endocardite e meningite (AESIF; DELMAN; KEISER, 2015; LIU et al., 2014), foi apontada como responsável por casos de endoftalmite (SAMBHAV et al., 2011) e peritonite (NARCISO-SCHIAVON et al., 2015). Dados sobre mortalidade de casos humanos devido a presença da espécie não são precisos, em geral é associada a comorbidades que dificultam a elucidação das causas de morte. Embora a espécie seja isolada em baixa frequência nos casos clínicos, pode causar doença invasiva grave (ABAMECHA, WONDAFRASH; ABDISSA, 2015; AESIF; DELMAN; KEISER, 2015). Sendo assim, a presença dessa espécie em alimentos vegetais pode representar um perigo à saúde pública.

O relato da detecção de *E. columbae* em alimentos de origem vegetal é escasso. A presença da espécie foi constatada no processo de fermentação de amêndoas de cacau, em Gana (CAMU et al., 2007) e um isolado foi detectado em alimentos de origem vegetal coletados no Brasil (CAMARGO et al., 2014). Recentemente, sua presença foi descrita em panos usados para limpeza de superfícies de cozinhas domésticas (SHEN et al., 2014). A espécie é mais conhecida por ser a bactéria Gram-positiva predominante no intestino de pombos (BAELE et al., 2002). Alguns estudos sugerem que a baixa detecção ou ausência da espécie se deve ao uso de meios de cultura com alta seletividade e a falta de CO₂ necessário para o seu crescimento (BUTAYE et al., 2002; RADIMERSKI et al., 2010). No presente trabalho, os isolados da espécie se multiplicaram tanto no meio seletivo para enterococos (KEA) quanto no meio pouco seletivo (M17) e sem uso de CO₂.

E. faecium e *E. mundtii* foram detectados igualmente em terceiro lugar no presente trabalho. No entanto, *E. faecium* foi predominante em outros estudos cujas amostras eram de vegetais (ABRIOUEL, et al., 2008; RIBOLDI et al., 2009; PESAVENTO et al., 2014; SAID et al., 2015). As amostras em que essa espécie foi detectada, neste trabalho, foram mandioca e milho verde descascados.

Considerando que *E. faecium* é uma das espécies do gênero reconhecida como indicadora de contaminação fecal (SPENSE, 2014), uma provável fonte dessa contaminação pode ser a mão dos manipuladores durante o processo de descascamento, tal como sugerido por outros estudos que detectaram a mesma espécie em alimentos (FURLANETO-MAIA et al., 2014; NIETO-ARRIBAS et al., 2011; TERKURAN et al., 2014). Além dessa fonte, a água não tratada usada para a lavagem desses vegetais pode carrear essa espécie proveniente das fezes de animais.

Micallef et al. (2013) sugeriu que a proximidade dos tomates com o solo e a água de irrigação possam ser responsáveis pela presença de *E. faecium* em tomates localizados mais próximos do solo. A maior abundância dessa espécie, nesse estudo, foi detectada no solo e na água. De acordo com Campos, J. et al. (2013) e Micallef et al. (2013) esses ambientes podem ser contaminados pelas fezes de animais criados nas proximidades ou pelo uso de adubo orgânico nas plantações.

Adicionalmente, *E. faecium* é apontado como uma das espécies mais envolvidas em infecções no ambiente clínico (SAMBHAV et al., 2011). Diversos pesquisadores sugerem que a contaminação com espécies de maior potencial

patogênico, como *E. faecalis* e *E. faecium*, nos alimentos deve ser monitorada, pois representa um risco para a saúde pública (FONSECA 2010; MICALLEF et al., 2013; SHI; ZHU, 2009; VAN HOUDT; MICHIELS, 2010).

A detecção de *E. mundtii*, no presente trabalho, era esperada uma vez que foi inicialmente descrita como uma espécie associada a plantas (MULLER et al., 2001). Apesar disso, há poucos estudos que relatam a presença da espécie em alimentos de origem vegetal. Abriouel et al. (2008) detectaram a espécie em cerejas e Ronconi, Merino e Fernández (2002) em alface. A espécie também foi detectada em alimentos de origem animal tais como: salsichas artesanais fermentadas (FONTANA et al., 2009), ostras (CHEN, et al., 2013) e no intestino de peixes (PETERSEN; DALSGAARD, 2003).

A disseminação da espécie em outros ambientes, tal como nas fazendas piscícolas, pode ser atribuída a sua veiculação pela água ou por meio do uso de derivados de vegetais, como o farelo de arroz usado na alimentação de peixes (PETERSEN; DALSGAARD, 2003). Apesar de raramente ser associada a infecções em humanos (REPIZO et al., 2014), estudos filogenéticos recentes apontam que a espécie está muito próxima geneticamente de *E. faecium* (REPIZO et al., 2014; SHIWA, et al, 2014), frequentemente associada a infecções nosocomiais conforme citado anteriormente. Sendo assim, é necessário mais investigação quanto a presença de *E. mundtii* em alimentos de origem vegetal.

E. avium é frequentemente encontrado no intestino de aves, mas também foi relatado nas fezes de humanos, suínos e cães (CHAO; YANG; HUANG, 2013). Recentemente, foi encontrado um isolado dessa espécie em tomate (MICALLEF, et al., 2013) e em carne de frango (CAMARGO, et al., 2014). Na Itália, *E. avium* representou 5,7% dos enterococos detectados a partir de carne de frango, bovina e suína, além de 10% dos isolados coletados a partir de queijos (PESAVENTO et al., 2014). Raramente causa infecções em humanos, tendo sido relatada bacteremia, endocardite, meningite, infecções intra-abdominais, osteomielite, infecção de prótese de mama e abscessos cerebrais (MOHANTY et al., 2006). Houve o relato de um caso de peritonite causado por *E. avium*, onde o microrganismo poderia estar colonizado no intestino do paciente, pois o mesmo não possuía animais de estimação, nem havia indícios de infecção hospitalar (CHAO; YANG; HUANG, 2013).

A contaminação de alimentos de origem vegetal com *E. columbae* e *E.*

avium, típicos do intestino de aves, pode ocorrer devido a facilidade do trânsito desses animais nas plantações, especialmente nas pequenas propriedades, onde o plantio dos vegetais é próximo de áreas ribeirinhas e de áreas arborizadas, bem como pelo emprego de adubo orgânico produzido com fezes desses animais (MICALLEF et al., 2013).

A presença das espécies *E. casseliflavus*, *E. faecium*, *E. mundtii* e *E. avium*, envolvidas em infecções nosocomiais e o fato de que *E. casseliflavus* e *E. avium* são reconhecidas por colonizar o trato digestório humano (MICALLEF et al., 2013), sugerem que alimentos de origem vegetal possam veicular esses patógenos para o homem.

Estes resultados mostram a importância do desenvolvimento destes estudos para garantir a segurança dos alimentos. Cabe ressaltar ainda que este trabalho é pioneiro no estado do Paraná, para a pesquisa de enterococos presente em alimentos de origem vegetal *in natura* e minimamente processados.

No presente trabalho, 65% dos isolados foram identificados somente até o gênero. Considerando a descrição de mais de 54 espécies para este gênero (EUZÉBY, 2015), a dificuldade para obtenção de sequências de oligonucleotídeos para a identificação de algumas espécies e que há outras espécies descritas onde o sequenciamento do DNA ainda não foi determinado, a tarefa da identificação desses isolados representa um desafio e abre perspectivas para estudos futuros.

5.2 SUSCETIBILIDADE FENOTÍPICA A ANTIMICROBIANOS

Com a finalidade de aprofundar o conhecimento sobre o perfil de resistência a antimicrobianos, todos os isolados confirmados como *Enterococcus* foram submetidos ao antibiograma.

Um total de 64% (54/85) dos isolados apresentaram resistência fenotípica aos antimicrobianos testados neste trabalho, sendo a maioria destes clinicamente relevantes. Desses isolados, 58% (30/54) foram provenientes de vegetais folhosos, 33% (19/54) de legumes e 9% (5/54) de raízes. Todos os grupos de vegetais testados apresentaram uma alta incidência de isolados resistentes, com 70% (30/43) dos isolados de folhosos, 58% (19/33) dos legumes e 56% (5/9) das raízes (Tabela

4).

Tabela 4 - Suscetibilidade a antimicrobianos apresentada por enterococos, provenientes de diferentes tipos de vegetais, pelo método disco-difusão. Paraná, Brasil, 2015.

Tipo de vegetal	Porcentagem de isolados resistentes	Resistência	Sensibilidade
Folhosos	70%	AMP, CIP, CLO, ERI, IPM, NOR, PEN, TEC, TET, VAN	
Legumes	58%	AMP, CIP, ERI, IPM, NOR, PEN, TEC, TET, VAN	CLO
Raízes	56%	AMP, CIP, ERI, NOR, TEC, VAN	CLO, IPM, PEN, TET

AMP: ampicilina, CIP: ciprofloxacina, CLO: cloranfenicol, ERI: eritromicina, IMP: imipenem, NOR: norfloxacina, PEN: penicilina, TEC: teicoplanina; VAN: vancomicina.

Estatisticamente ($\alpha=0,05$), não houve correlação entre o tipo de vegetal e a suscetibilidade antimicrobiana, demonstrando que isolados sensíveis ou resistentes podem ser encontrados independente do tipo de vegetal. Cabe ressaltar ainda, que os isolados provenientes de vegetais folhosos apresentaram resistência a todos os antimicrobianos testados, enquanto que os provenientes de legumes foram sensíveis apenas ao cloranfenicol e os isolados de raízes foram sensíveis ao cloranfenicol, imipenem, penicilina e à tetraciclina.

Conforme pode ser observado no Gráfico 1, 33% (28/85) do total de isolados foram resistentes à vancomicina e 31% foram resistentes à teicoplanina. Estes resultados são similares aos detectados em queijos (21,9%) e em produtos cárneos (21,1%) (FURLANETO-MAIA, et al, 2014; GOUSIA et al., 2011).

Geralmente a resistência à vancomicina é pouco frequente em isolados de alimentos, incluindo vegetais, em torno de 3% (GOMES et al., 2008; KOLUMAN; AKAN; ÇAKIROGLU, 2009; RIBOLDI et al., 2009), sendo que em alguns estudos envolvendo alimentos de origem animal e vegetal na Espanha, Alemanha e Estados Unidos, não foi detectada resistência a esse antimicrobiano (MICHALLEF et al., 2013; OMAR, et al., 2004; SCHWAIGER et al., 2011). Isso mostra a importância dos resultados encontrados no presente trabalho.

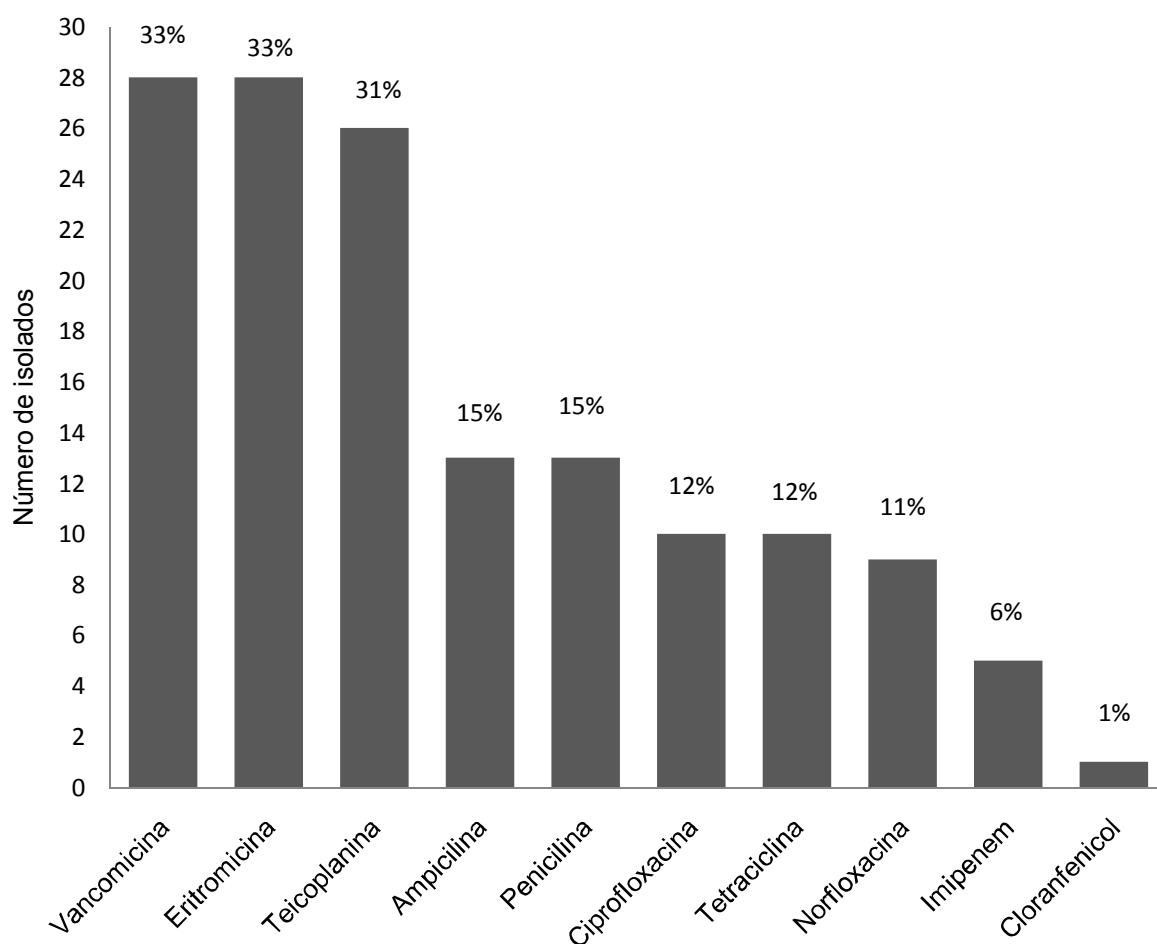


Gráfico 1 - Perfil de resistência fenotípico de enterococos, provenientes de vegetais, contra antimicrobianos testados pelo método disco-difusão. Paraná, Brasil, 2015.

O elevado número de isolados resistentes à vancomicina encontrados no presente trabalho pode ter ocorrido devido ao uso de antimicrobianos no meio ambiente, o que pode influenciar o perfil de resistência nos alimentos (HUYS et al., 2004; OMAR, et al., 2004). Essa hipótese está sustentada pelo fato de que após a avoparcina ter sido banida da Europa, houve diminuição nas taxas de enterococos resistente a esse antimicrobiano (KHUN et al., 2005; MANNU et al., 2003) e que há grupos de genes *vanA* indistinguíveis genotipicamente coexistindo em fontes humanas e não humanas (JENSEN et al., 1999; SIMONSEN et al., 1998). Isso mostra que genes de resistência à vancomicina estão sendo transmitidos entre os diferentes nichos ecológicos.

Quanto ao grupo dos antimicrobianos macrolídeos, foi observada resistência

à eritromicina em 33% do total de isolados (Gráfico 1) e foi associada com quase todos os demais antimicrobianos testados, exceto com o cloranfenicol. Uma taxa elevada (70%) de resistência à eritromicina foi detectada por Omar et al. (2004). A resistência à eritromicina é do tipo adquirida, transferida por conjugação e mediada por genes localizados em plasmídeos e transposons. Essa transferência pode ocorrer inclusive para outros gêneros, que contribui para a patogenicidade dos enterococos e para a alta incidência (FISCHER; PHILLIPS, 2009; SHARMA et al., 2014), podendo ocorrer em enterococos provenientes de alimentos.

O uso de outro macrolídeo, a tilosina, como promotor de crescimento em animais de corte, foi apontado como possível responsável pela alta incidência da resistência a essa classe de antimicrobianos (OMAR et al., 2004). No Brasil, este antimicrobiano e a espiramicina, da mesma classe, são autorizados para uso na medicina veterinária (CAMPOS, A. et al, 2013), que pode ser um dos motivos para o resultado obtido. Taxas elevadas de resistência à eritromicina são preocupantes, uma vez que ela é usada como substituta da penicilina em pacientes alérgicos (OMAR et al., 2004).

Os enterococos obtidos no presente trabalho exibiram 15% de resistência para ampicilina e para penicilina, e 6% para imipenem. Este gênero apresenta resistência intrínseca aos antimicrobianos beta-lactâmicos (SHARMA et al., 2014), de modo que era esperado algum nível de resistência a essa classe de antimicrobianos. Pesavento et al. (2014) relataram baixa incidência de resistência aos beta-lactâmicos em isolados de alimentos, e afirmam que as taxas elevadas detectadas para enterococos, são comuns em isolados clínicos.

No presente trabalho, a resistência à ciprofloxacina foi de 12% e à norfloxacina 11% (7/79). Estes resultados são similares ao encontrado por Pesavento et al. (2014) quando detectaram 7,7% de resistência à ciprofloxacina em enterococos isolados de vegetais. Porém, taxas elevadas são encontradas em alimentos de origem animal (BARBOSA; FERREIRA; TEIXEIRA, 2009; DEPECH, 2012), que pode ser reflexo do uso massivo dessas quinolonas na medicina humana e veterinária (BARBOSA; FERREIRA; TEIXEIRA, 2009).

O presente trabalho constatou que 12% dos isolados de enterococos foram resistentes à tetraciclina. Resultado semelhante foi reportado por Campos, J. et al. (2013) que detectaram 6% de resistência em isolados de saladas prontas para consumo. É possível que a baixa taxa encontrada se deva ao uso limitado da

tetraciclina na clínica humana e porque alguns países baniram seu uso veterinário (CHOI; WOO, 2015). A resistência à tetraciclina foi apontada como um dos fenótipos mais comuns encontrados em alimentos (HUYS et al., 2004; OMAR et al., 2004), por isso é sugerido que diversos tipos de alimentos atuem como reservatório de resistência a esse antimicrobiano (CHOI; WOO, 2015).

Por fim, somente um isolado proveniente de acelga indentificado como *E. casseliflavus/flavescens*, apresentou resistência intermediária ao cloranfenicol. Este antimicrobiano foi banido para uso veterinário no Brasil desde o ano 2003 (CAMPOS, A. et al, 2013). Na Turquia foi detectado de 38 a 53% de enterococos resistentes ao cloranfenicol, em carcaças de frangos, e nesse país o medicamento também é proibido em animais. Os pesquisadores sugerem que mesmo sem a pressão seletiva do seu uso, a resistência pode ter persistido, ou que o produto poderia estar sendo usado ilegalmente (KASIMOGLU-DOGRU; GENÇAY; AYAZ, 2010).

Das espécies analisadas, *E. casseliflavus* foi a que apresentou resistência a maioria dos antimicrobianos (Tabela 5), sendo que 7 dos 16 isolados exibiram resistência. Neste trabalho, a taxa de resistência dessa espécie à ciprofloxacina foi de 25%, eritromicina 19% e penicilina 6%.

Tabela 5 - Número de isolados resistentes aos antimicrobianos testados pelo método disco-difusão, de acordo com as espécies de *Enterococcus* spp., identificadas a partir de vegetais. Paraná, Brasil, 2015.

	CIP	NOR	CLO	ERI	AMP	IMP	PEN	TET	TEC	VAN
<i>E. casseliflavus/flavescens</i>	4	2	1	3	2		2		1	1
<i>E. columbae</i>	1	1		1				3	1	1
<i>E. faecium</i>	2	1								
<i>E. mundtii</i>				3					2	2
<i>E. avium</i>				2	2				2	2

AMP: ampicilina, CIP: ciprofloxacina, CLO: cloranfenicol, ERI: eritromicina, IMP: imipenem, NOR: norfloxacina, PEN: penicilina, TEC: teicoplanina; VAN: vancomicina.

Em outro estudo, *E. casseliflavus*, isolado de tomates, apresentou resistência à ciprofloxacina (46,3%), eritromicina (1,2%) e penicilina (0,6%) (MICALLEF et al., 2013). A mesma espécie, detectada em queijos, apresentou resistência à eritromicina, tetraciclina e cefalotina de 25% (FURLANETO-MAIA, et al, 2014). No estudo de Veljović et al. (2015), onde isolaram *E. casseliflavus* de águas

de rios localizados em áreas industriais, detectaram resistência a sete antimicrobianos dentre eles à ciprofloxacina e eritromicina, como no presente trabalho. Resultado similar também foi encontrado por Petersen e Dalsgaard (2003) ao estudarem fazendas piscícolas com e sem uso de fezes de animais para alimentação dos peixes, onde além da resistência aos dois antimicrobianos, detectaram resistência ao cloranfenicol e à oxitetraciclina por *E. casseliflavus* isolados tanto das fezes de animais, quanto dos sedimentos na água e dos peixes.

No presente trabalho, somente um isolado apresentou resistência tanto à vancomicina quanto à teicoplanina. Barbosa; Ferreira e Teixeira (2009) e Ronconi; Merino e Fernandez (2002) detectaram *E. casseliflavus*, provenientes de carnes fermentadas e alface, resistentes a baixas concentrações de vancomicina. Na mesma região do presente trabalho, 25% dos isolados dessa espécie apresentam resistência à vancomicina (FURLANETO-MAIA et al., 2014), evidenciando o risco que essa espécie representa à saúde pública.

Conforme pode ser observado na Tabela 5, três dos cinco isolados de *E. columbae* exibiram resistência à tetraciclina, um à eritromicina e aos glicopeptídeos e um às quinolonas. De acordo com Butaye et al. (2002) e Kimpe et al. (2004) a espécie é freqüentemente resistente aos macrolídeos, corroborando com o resultado do presente trabalho para a resistência detectada à eritromicina. *E. columbae*, isolado de pombos, também apresentou resistência à tetraciclina (BUTAYE et al. (2002) tal como no presente trabalho. Por outro lado, Camargo et al. (2014) isolaram a espécie a partir de alimentos de origem vegetal coletados no Brasil e verificaram sensibilidade à vancomicina. Há poucos estudos que investigaram a presença dessa espécie em vegetais e seu perfil de resistência a antimicrobianos, o que evidencia a importância destes resultados.

E. faecium apresentou resistência somente às quinolonas. A resistência de *E. faecium* à ciprofloxacina e norfloxacina foi detectada em outros estudos, cujas fontes eram alimentos, tendo sua detecção variando de 4,8% a 45,45% de isolados resistentes (ABRIOUEL et al, 2008; DELPECH et al., 2012; FURLANETO-MAIA et al, 2014; RIBOLDI et al, 2009;. No entanto, é uma espécie que apresenta resistência a diversos antimicrobianos, sendo os mais apontados: eritromicina, tetraciclina, ampicilina, vancomicina, penicilina e cloranfenicol (ABRIOUEL et al, 2008; DELPECH et al., 2012; FURLANETO-MAIA et al, 2014; GOMES et al., 2008; RIBOLDI et al, 2009). Cabe ressaltar que a presença desta espécie em vegetais

causa preocupação, pois *E. faecium* resistente à vancomicina é frequentemente responsável por infecções graves no ambiente hospitalar, mesmo que no presente trabalho esse perfil de resistência não tenha sido encontrado.

Todos os isolados de *E. mundtii* apresentaram resistência à eritromicina e dois destes também aos glicopeptídeos. Segundo Fontana et al. (2009) esta espécie, isolada de salsichas artesanais argentinas, apresentou resistência fenotípica à eritromicina e à tetraciclina. Estudos recentes detectaram a espécie resistente a quatorze antimicrobianos dentre eles à eritromicina, como no presente trabalho, além de resistência à ampicilina, ciprofloxacina, cloranfenicol e penicilina (VELJOVIĆ et al., 2015). Também foi detectada resistência à estreptomicina em isolados dessa espécie, provenientes de alfaces coletadas na Argentina (RONCONI; MERINO; FERNANDEZ, 2002).

Todos os isolados de *E. avium* apresentaram resistência aos glicopeptídeos, à ampicilina e à eritromicina. Resultado semelhante foi relatado por Pesavento et al. (2014) que isolaram essa espécie de alimentos de origem animal e detectaram além de resistência aos glicopeptídeos e eritromicina, resistência à ciprofloxacina, gentamicina, linezolida, penicilina e à tetraciclina. A espécie também foi isolada de carne de frango no Brasil, no entanto, não apresentou resistência à vancomicina, nem a altos níveis de aminoglicosídeos (CAMARGO et al., 2014). *E. avium* resistente à eritromicina, estreptomicina e oxitetraciclina, foi detectado onde eram utilizadas fezes de animais para a alimentação dos peixes (PETERSEN; DALSGAARD, 2003). Poucos dados são encontrados na literatura a respeito da verificação de resistência à antimicrobianos para essa espécie isolada de alimentos. A maior parte dos trabalhos estudados envolve casos clínicos, embora também seja encontrado um pequeno número que relata resistência à vancomicina (LEE et al., 2004), à ciprofloxacina e à tetraciclina (CHAO; YANG; HUANG, 2013). Geralmente essa espécie, isolada de casos clínicos, é sensível à classe dos beta-lactâmicos e aos aminoglicosídeos (MOHANTY et al., 2006), o que não ocorreu no presente trabalho para, pelo menos, a ampicilina, da classe dos beta-lactâmicos.

E. avium, *E. casseliflavus/flavescens*, *E. columbae* e *E. mundtii* tiveram pelo menos um isolado resistente à classe dos glicopeptídeos e apresentaram considerável diversidade de fenótipo de resistência. Estatisticamente ($\alpha=0,05$), não houve correlação entre espécie e frequência de resistência a antimicrobianos, demonstrando que a resistência pode ser detectada independente da espécie. Isso

mostra que, inclusive alimentos de origem vegetal podem atuar como reservatório de diversas espécies de *Enterococcus* spp. resistentes a uma ampla gama de antimicrobianos.

Um total de 61% (33/54) dos isolados de enterococos investigados neste trabalho, apresentaram multirresistência. A resistência aos antimicrobianos vancomicina/teicoplanina/eritromicina (glicopeptídeos/macrolídeos) foi de 43% (23/54) e à vancomicina/teicoplanina/ampicilina/imipenem/penicilina (glicopeptídeos/beta-lactâmicos) foi de 30% (16/54). Além disso, os isolados que apresentaram resistência à vancomicina e teicoplanina simultaneamente, também foram resistentes a outros antimicrobianos testados, entre eles ampicilina, eritromicina, imipenem, norfloxacin, penicilina e tetraciclina (Tabela 6).

Tabela 6 - Distribuição dos perfis de multirresistência dos isolados de acordo com as espécies de *Enterococcus* spp., provenientes de vegetais. Paraná, Brasil, 2015.

Perfis de multirresistência	Número de isolados de acordo com as espécies de <i>Enterococcus</i> spp.				
	<i>E. casseliflavus/ flavescens</i>	<i>E. columbae</i>	<i>E. mundtii</i>	<i>E. avium</i>	<i>Enterococcus</i> sp.
AMP/CIP	1				
AMP/CIP/NOR					1
AMP/CLO	1				
AMP/ERI/IMP/TEC/VAN					1
AMP/ERI/PEN/TEC/VAN					4
AMP/ERI/TEC/VAN				2	1
AMP/PEN/TEC/VAN					1
CIP/ERI	1				
CIP/ERI/NOR	2				
ERI/IMP/TEC/TET/VAN					1
ERI/IMP/TEC/VAN					1
ERI/PEN/TEC/TET/VAN					1
ERI/PEN/TEC/VAN					4
ERI/TEC/VAN		1	2		5
IMP/NOR/PEN					1
NOR/TEC/VAN					1
NOR/TET					1

AMP: ampicilina, CIP: ciprofloxacina, CLO: cloranfenicol, ERI: eritromicina, IMP: imipenem, NOR: norfloxacin, PEN: penicilina, TEC: teicoplanina, TET: tetraciclina, VAN: vancomicina.

Semelhanças quanto à multirresistência foram apontadas por Furlaneto-Maia et al. (2014) na mesma região deste trabalho, onde todos os isolados provenientes de queijos, resistentes à vancomicina, foram também para antimicrobianos clinicamente importantes como eritromicina, norfloxacin, tetraciclina, amicacina, cefalotina e ácido nalidíxico. Este cenário é muito preocupante, uma vez que os glicopeptídeos ou a ampicilina ou a penicilina são utilizados em associação com a gentamicina para que tenham seu efeito bactericida nas infecções enterocócicas graves (FOULQUIE-MORENO, et al., 2006; LARSEN et al., 2010; SHARMA, et al., 2014). Assim, isolados resistentes à vancomicina ou a esses dois betalactâmicos, como foi detectado no presente trabalho, tornam o tratamento das infecções enterocócicas graves um grande desafio e aumentam as chances de óbitos (CETINKAYA et al., 2000; LARSEN et al., 2010).

5.3 PRESENÇA DE GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

Todos os isolados confirmados como *Enterococcus* foram investigados quanto a presença de genes que conferem resistência à vancomicina, tetraciclina gentamicina e eritromicina. Destes, 24 (28%) possuíam pelo menos um dos genes testados. Quanto ao perfil genotípico de resistência à vancomicina, somente (4) 5% dos isolados possuíam o gene *vanA* e (3) 4% o gene *vanB*. Cinco destes isolados expressaram resistência aos glicopeptídeos e à eritromicina no antibiograma, como pode ser observado na Tabela 7.

A presença de pequena quantidade de enterococos transportando genes *vanA* e *vanB* em alimentos também foi relatada por (DELPECH et al., 2012). Por outro lado, o gene *vanA* foi detectado em 68,6% dos isolados de *E. faecium* presentes em alimentos de origem animal (TALEBI et al., 2015) e em 80% dos isolados de queijos (FURLANETO-MAIA et al, 2014). Os genes *vanA* e *VanB* conferem resistência do tipo adquirida à vancomicina, sugerindo um perigo de que esses genes possam ser transferidos facilmente para a microflora intestinal humana, uma vez que foi relatada a transferência de genes *vanA* de *Enterococcus* para *Staphylococcus aureus* (NIEDERHAÜSERNET et al., 2011).

Tabela 7 - Genes de resistência a vancomicina, tetraciclina e gentamicina, presentes em diferentes espécies de *Enterococcus* spp. provenientes de vegetais. Paraná, Brasil, 2015.

Gene	Espécie	Suscetibilidade fenotípica
<i>vanA</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	AMP, ERI, PEN, VAN, TEC
<i>vanA</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	ERI, PEN, VAN, TEC
<i>vanA</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	Sensível
<i>vanA</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	Sensível
<i>vanB</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	ERI, PEN, VAN, TEC
<i>vanB/tetM</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	ERI, VAN, TEC
<i>vanB/aac-(6')</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	ERI, PEN, VAN, TEC
<i>tetL</i>	<i>E. avium</i>	AMP, ERI, VAN, TEC
<i>tetL</i>	<i>E. casseliflavus/ flavescens</i>	CIP, NOR, ERI
<i>tetL</i>	<i>E. columbae</i>	ERI, VAN, TEC
<i>tetL</i>	<i>E. faecium</i>	CIP
<i>tetL</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	TET
<i>tetL</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	Sensível
<i>tetL/tetM</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	Sensível
<i>tetM</i>	<i>E. casseliflavus/ flavescens</i>	AMP, CIP
<i>tetM</i>	<i>E. casseliflavus/ flavescens</i>	CIP, ERI
<i>tetM</i>	<i>E. casseliflavus/ flavescens</i>	Sensível
<i>tetM</i>	<i>E. casseliflavus/ flavescens</i>	Sensível
<i>tetM</i>	<i>E. casseliflavus/ flavescens</i>	Sensível
<i>tetM</i>	<i>E. casseliflavus/ flavescens</i>	Sensível
<i>tetM</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	AMP, PEN, VAN, TEC
<i>tetM</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	AMP, ERI, VAN, TEC
<i>tetM</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	CIP
<i>tetM</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	TET
<i>tetM/aac-(6')</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	AMP, ERI, PEN, VAN, TEC

AMP: ampicilina, CIP: ciprofloxacina, ERI: eritromicina, NOR: norfloxacina, PEN: penicilina, TEC: teicoplanina; VAN: vancomicina

Possivelmente, os outros vinte e três isolados resistentes fenotipicamente aos glicopeptídeos, que não possuíam os genes *vanA* ou *vanB*, podem transportar outros genes relacionados, ou estarem envolvidos em outros tipos de mecanismos de resistência (GILMORE, 2002). Na ausência da pressão seletiva de antimicrobianos, a resistência a íons metálicos e biocidas podem ser fatores de coseleção para a resistência a antimicrobianos (GARRIDO; GÁLVEZ; PULIDO, 2014; HIDANO et al., 2015).

Alguns genes que conferem resistência a íons metálicos estão nos mesmos elementos genéticos móveis que os genes de resistência a antimicrobianos, o que sugere um risco para a coseleção de resistência. O sulfato de cobre é utilizado na medicina veterinária como antimicrobiano e promotor de crescimento. Um gene de

resistência ao cobre, *tcrB*, localizado em plasmídeo, é associado geneticamente aos genes *ermB* e *vanA* (GARRIDO; GÁLVEZ; PULIDO, 2014).

Os biocidas são substâncias empregadas na área de alimentos, em ambientes clínicos e em produtos de cuidados pessoais com a finalidade de promover desinfecção ou como conservante. Alguns deles tem os mesmos mecanismos de ação bioquímica dos antimicrobianos (FERNANDES-FUENTES et al., 2012). Fernandes-Fuentes et al. (2012) detectaram enterococos resistentes a biocidas portando genes que conferem resistência para o mecanismo bioquímico bomba de efluxo e genes que conferem resistência para aminoglicosídeos, cloranfenicol e lincosaminas. Os autores sugerem que a pressão seletiva promovida pelos biocidas pode contribuir para a expressão e dispersão de resistência a antimicrobianos, em humanos e no meio ambiente.

Os enterococos que transportavam o gene *tetM* representaram (12) 15% dos isolados e os que transportavam *tetL*, (7) 8%, sendo que um isolado possuía os dois genes. Estes resultados estão de acordo com Campos et al. (2013b) que detectaram uma menor incidência dos genes *tetM* e *tetL*, de 6%, em saladas cruas prontas para consumo. Por outro lado, taxas mais elevadas (23,65% e 23,3%, respectivamente) desses genes em isolados de enterococos provenientes de queijos e de alimentos servidos em restaurantes tipo *fast food* foram detectadas (FURLANETO-MAIA et al, 2014; MACOVEI; ZUREK, 2007).

Somente dois isolados que transportavam os genes *tet* testados também expressaram resistência à tetraciclina no teste de disco-difusão. Quanto a presença desses genes entre as diferentes espécies identificadas, sete isolados eram de *E. casseliflavus* e outros três eram das espécies *E. avium*, *E. columbae* e *E. faecium*. Em outro estudo, 3,7% dos isolados de *E. casseliflavus* presentes em alimentos servidos em restaurantes transportavam o gene *tetM* e 39,5% o gene *tetS*. *E. faecium* transportava os genes *tetM*, *tetS* e *tetO* em 3,6% dos isolados (MACOVEI, ZUREK, 2007).

No presente trabalho, os genes *tet* testados estavam amplamente dispersos nos locais de amostragem foram detectados em isolados dos diferentes grupos de vegetais e na maioria das espécies de *Enterococcus* spp. identificadas. Huys et al. (2004) sugerem que a prevalência dos genes *tet* varia de acordo com o tipo de alimento, origem geográfica e da identidade taxonômica. O gene *tetL* confere resistência para o mecanismo de bomba de efluxo e *tetM* para o mecanismo de

proteção ribossomal (HIDANO et al., 2015), embora há relatos de outros genes que conferem resistência à tetraciclina (*tetS* e *tetO*) (CHOPRA;ROBERTS,2001; MACOVEI, ZUREK, 2007).

Shaiwger et al. (2009) verificaram a coexistência dos genes *tetL* e *tetM*, no mesmo isolado, conferiram aumento na concentração inibitória mínima para a doxiciclina, outro antimicrobiano da classe das tetraciclinas, e sugeriram que a sinergia ocorre quando os genes conferem resistência para mecanismos bioquímicos diferentes. Hidano et al. (2015) também detectaram associação positiva entre *tetL* e *tetM*, já entre *tetO* e *tetM* a associação foi negativa. Os genes *tetL* foram associados à resistência de alto nível à oxitetraciclina, outro antimicrobiano da mesma classe, e *tetO* e *tetM* com resistência a baixos níveis, o que mostra complexas inter-relações entre os genes e suas expressões fenotípicas.

Outros elementos genéticos estão sendo apontados por atuarem na rápida disseminação de resistência a antimicrobianos. Jahan et al. (2015) constataram a transferência de resistência à tetraciclina a partir de *E. faecium* obtidos de alimentos para *E. faecium* de isolados clínicos. Os mesmos sugerem que além do transposon Tn916-1545 (OMAR et al., 2004), envolvido na resistência à tetraciclina, podem atuar integrons, que são outros elementos genéticos móveis capazes de transferir resistência a antimicrobianos, especialmente para bactérias Gram-negativas e para algumas Gram-positivas (JAHAN et al., (2015).

É importante considerar que os genes *tet* podem apresentar padrões distintos de ligação com outros genes de resistência como com o gene *ermB*, que confere resistência à eritromicina, e *aac(6')*, que confere resistência à gentamicina (HIDANO et al., 2015). No presente trabalho um isolado transportava simultaneamente dos genes *tetM* e *aac-(6')*, corroborando com o descrito por Said et al. (2015) que também detectou os dois genes em um mesmo isolado de enterococos.

Dois isolados (2%) transportavam o gene *aac(6')leaph(2'')-la*. Um dos isolados também possuía o gene *vanB* e o outro o gene *tetM*. Porém, taxas elevadas, acima de 66%, foram detectadas em enterococos provenientes de carne de frango, carne suína e em queijos (CHOI; WOO, 2013; FURLANETO-MAIA, 2014; LARSEN et al., 2010). Esse gene é o mais prevalente dentre os que conferem resistência a altos níveis de gentamicina e pode ser localizado em plasmídeos ou transposons (CHOI; WOO, 2013), sugerindo que a transferência da resistência seja facilitada.

Enterococos resistentes a altas concentrações de gentamicina, dificultam ainda mais o tratamento das infecções enterocócicas graves, conforme explanado anteriormente. Poucos estudos visam verificar associações entre diferentes genes que conferem resistência a antimicrobianos e sua expressão. Um desses estudos envolvendo enterococos provenientes de alimentos orgânicos, o gene *aac(6')* estava presente em dois isolados que também transportavam o gene *cat*, que confere resistência ao cloranfenicol, e ainda, no mínimo dois genes que conferem resistência a biocidas, sugerindo possíveis inter-relações (FERNANDES-FUENTES et al., 2014). Já no estudo de Hidano et al. (2015) esse gene foi associado com *tetG*.

Neste trabalho, nenhum isolado possuía o gene *ermB* que confere resistência adquirida à eritromicina, contudo, 33% dos isolados apresentaram fenótipo de resistência. Campos, J. et al. (2013) constataram resultado similar, onde apenas 3% dos isolados possuíam o gene *ermB* em contraste com 22,3% de fenótipo de resistência à eritromicina apresentados por enterococos também provenientes de vegetais. Em estudos conduzidos por Furlaneto-Maia et al. (2014), Makovei e Zurek (2007) e Said et al. (2015) a prevalência desse gene variou de 6,6% a 86,7% em enterococos provenientes de outras fontes alimentares.

5.4 FORMAÇÃO DE BIOFILME

Todos os isolados confirmados para o gênero *Enterococcus* foram submetidos ao teste de formação de biofilme, *in vitro*. Do total de isolados, 100% demonstraram algum nível de formação. Este resultado corrobora com Medeiros et al. (2014) que constataram formação de biofilme em 94,6% dos isolados de enterococos, provenientes de alimentos. Por outro lado, David e Oluwaniyi (2015), detectaram formação de biofilme em 56% dos isolados de enterococos provenientes de alimentos de origem vegetal, valor inferior ao presente trabalho.

Segundo a classificação sugerida por Stepanovic´ et al. (2007) os isolados foram classificados em 27% como produtores de biofilme fraco, 60% como moderado e 13% forte (Tabela 8).

Tabela 8 - Capacidade de formação de biofilme, *in vitro*, de enterococos provenientes de diferentes tipos de vegetais. Paraná, Brasil, 2015.

Tipo de vegetal	Capacidade de formação de biofilme			Total de isolados por tipo de vegetal
	Fraco	Moderado	Forte	
Folhosos	12	27	4	42
Legumes	7	19	7	33
Raízes	4	5	0	9
Total de isolados classificação biofilme	23 (27%)	51 (60%)	11 (13%)	85

Os isolados produtores de biofilme moderado e forte representaram 73% do total de isolados avaliados para formação de biofilme. Comparativamente aos estudos de Gomes et al. (2008) onde isolados de *E. faecium* e *E. faecalis* obtidos de produtos de origem animal e vegetal demonstraram somente capacidade de formação de biofilme fraca, no presente trabalho, os isolados apresentaram melhor capacidade. Por outro lado, 56% dos isolados de *E. faecalis*, também de alimentos de origem animal e vegetal, foram produtores de biofilme forte (MEDEIROS et al., 2014). Isso demonstra uma grande variabilidade na formação de biofilme em isolados de enterococos provenientes de alimentos. Adicionalmente, há escassez de estudos que avaliam o potencial de formação de biofilme por outras espécies de enterococos provenientes de alimentos, demonstrando a necessidade de ampliar esses estudos ainda mais.

Quanto aos isolados que apresentaram a classificação de produtor de biofilme fraco, 52% (12/23) foram provenientes de vegetais folhosos, 31% (7/23) de legumes e 17% (4/23) de raízes (Tabela 8). Dos que apresentaram produção de biofilme moderada 53% (27/51) foram isolados de vegetais folhosos, 37% (19/51) de legumes e 10% (5/51) de raízes (Tabela 8).

Com a finalidade de compreender melhor o papel dos biofilmes sobre a segurança dos alimentos vegetais, o Gráfico 2 apresenta como ocorre a distribuição da capacidade de formação de biofilme, entre as diferentes tipos de vegetais.

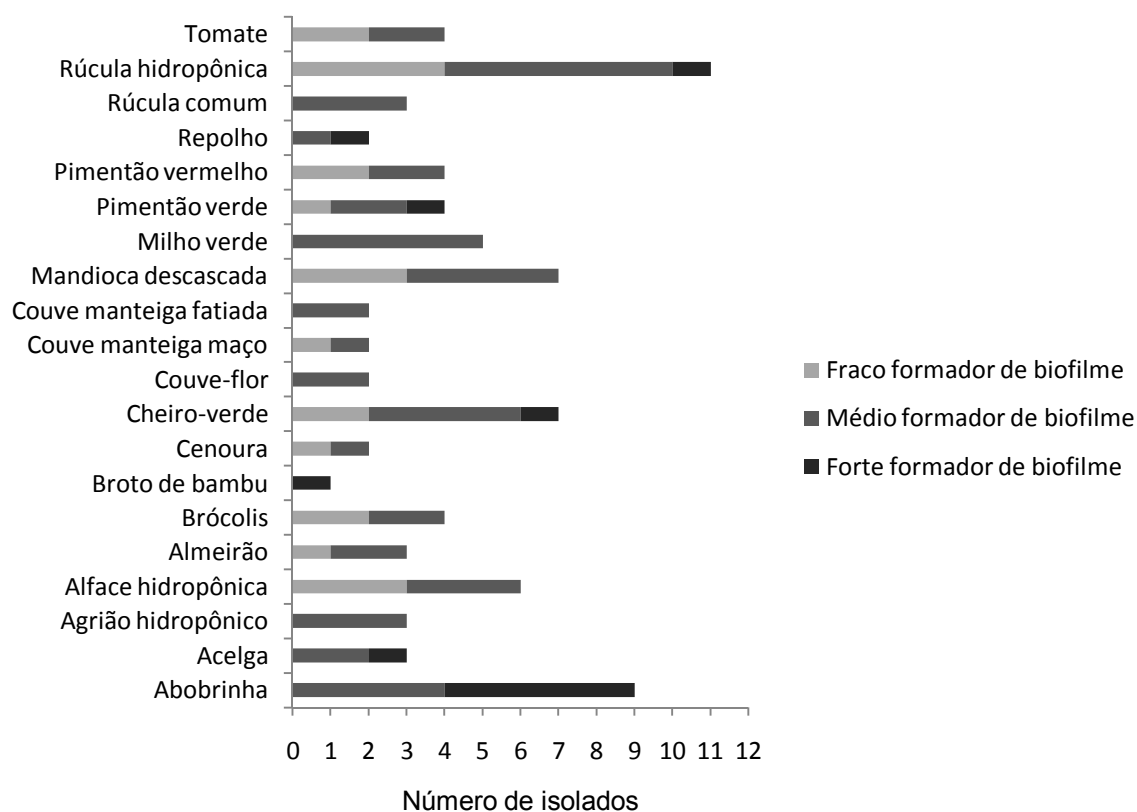


Gráfico 2 - Capacidade de formação de biofilme, *in vitro*, de enterococos provenientes de diferentes espécies de vegetais. Paraná, Brasil, 2015.

Com relação à intensidade do biofilme formado, foram verificadas as três intensidades nos vegetais folhosos e nos legumes, enquanto que nas raízes os isolados apresentaram somente produção de biofilme fraca e moderada. Nos três grupos de vegetais predominaram os isolados que apresentaram capacidade de produção de biofilme moderada, sendo de 63% para folhosos, 58% para legumes e 56% para raízes.

Os biofilmes bacterianos podem se formar na superfície de folhas, nas raízes e nos espaços intercelulares dos tecidos vegetais. A contaminação nos vegetais por bactérias patogênicas pode ser proveniente do solo, água, adubos ou diretamente expostos nas raízes, no crescimento hidropônico. Bactérias podem se fixar nas raízes das plantas e depois migrarem para a parte superior. Adicionalmente, a compreensão atual sobre os fatores que afetam a formação de biofilme em vegetais e seu papel na persistência de microrganismos patogênicos nesses alimentos é insuficiente (YARON; ROMLING, 2014). A maioria dos estudos avaliam a formação de biofilme por meio de testes *in vitro*. Considerando a natureza

complexa da superfície e composição dos vegetais, as respostas obtidas nos testes *in vitro* podem não apresentar os mesmos resultados dos testes *in vivo*.

A adesão dos microrganismos na superfície dos alimentos frescos pode ser considerada um primeiro passo para a contaminação microbiológica desses produtos (BENITO et al., 1997), contribuindo para a veiculação de isolados patogênicos portadores de fatores de virulência e resistência a antimicrobianos, sendo um risco para a saúde pública (VAN HOUDT, MICHELS, 2010).

De acordo com Bae et al. (2014) ao estudarem bactérias deteriorantes encontradas em vegetais frescos, a capacidade de formação de biofilme muda conforme a espécie (BAE et al., 2014). As baixas temperaturas promovem uma diminuição na multiplicação microbiana e na formação de biofilme (BAE et al., 2014; FERNANDES; KABUKI; KUAYE, 2015; MARINHO et al., 2013).

O Gráfico 3 apresenta a classificação de formação de biofilme nas espécies analisadas. Em *E. casseliflavus* predominou a capacidade de produção de biofilme moderada, representando 56% do isolados da espécie. O estudo conduzido por Lleo et al. (2007) detectou essa espécie proveniente de amostras clínicas capaz de produzir biofilme em moderada intensidade.

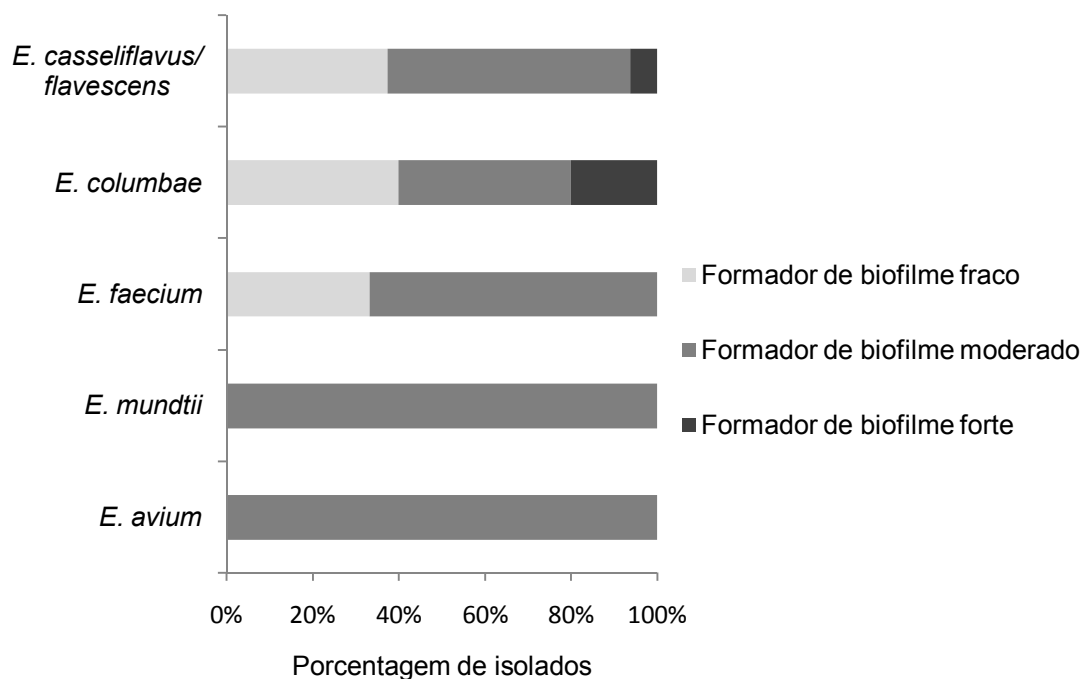


Gráfico 3 - Perfil da capacidade de formação de biofilme, *in vitro*, das espécies de *Enterococcus* spp. provenientes de vegetais. Paraná, Brasil, 2015.

E. faecium apresentou produção de biofilme fraca e moderada. Em estudos conduzidos por Gomes et al. (2008) e Pereira et al. (2013) essa espécie proveniente de diversos tipos de alimentos não apresentou formação de biofilme em mais de 75% dos isolados. Aqueles isolados que formaram biofilme apresentaram as três intensidades. Apesar da baixa frequência de formação de biofilme relatada nos estudos anteriores, Lleo et al. (2007) constataram que *E. faecium* e *E. casseliflavus*, provenientes de amostras clínicas, foram capazes de formar biofilmes até doze dias após serem submetidos a condições adversas de cultivo.

No presente trabalho, *E. columbae* apresentou os três níveis de formação de biofilme e os isolados das espécies *E. avium* e *E. mundtii* apresentaram somente produção moderada. Estudos conduzidos por Lleo et al. (2007) detectaram as duas últimas espécies, provenientes de amostras clínicas, produtoras de biofilme fraco. Isolados de *E. mundtii* apresentaram seis genes envolvidos na formação de biofilme, apesar de sua expressão não ter sido avaliada neste estudo (REPIZO et al, 2014).

Não é possível determinar se alguma espécie identificada neste trabalho apresenta uma característica definida quanto à capacidade de formação de biofilme, apenas foi verificado que todas são capazes de formá-lo. A maioria dos trabalhos estão centrados no estudo do biofilme nas espécies *E. faecalis* e *E. faecium* obtidos de isolados clínicos. Estudos cuja fonte são alimentos também apresentam resultados principalmente para essas duas espécies, de modo que resultados relativos a formação de biofilme para outras espécies de enterococos provenientes de alimentos vegetais são escassos.

Neste sentido, o presente trabalho apresenta resultados que poderão ser úteis para o estabelecimento dessas características nas espécies identificadas, bem como para o aprimoramento sobre a compreensão do possível papel que essas espécies possam desempenhar como reservatórios ou veículos de fatores de virulência.

Enterococos em biofilme apresentam maior resistência a antimicrobianos que as células livres (MOHAMED; HUANG, 2007). Neste trabalho, foram os produtores de biofilme moderado, 61% (33/54), que mais apresentaram resistência a antimicrobianos, além disso concentraram o maior número de isolados com resistência aos glicopeptídeos, eritromicina e penicilina (Tabela 9).

Tabela 9 - Número de isolados resistentes aos antimicrobianos testados pelo método disco-difusão de acordo com a classificação de formação de biofilme, *in vitro*, de enterococos isolados de vegetais. Paraná, Brasil, 2015.

Antimicrobiano	Produtor de biofilme fraco (n=16)	Produtor de biofilme moderado (n=33)	Produtor de biofilme forte (n=5)
Ampicilina	3	8	2
Penicilina	2	11	0
Ciprofloxacina	5	5	0
Norfloxacina	5	3	1
Eritromicina	6	20	2
Inipenem	1	3	1
Tetraciclina	3	6	1
Teicoplanina	4	19	3
Vancomicina	5	20	3

n - número de isolados resistentes a antimicrobianos

O fator de virulência *esp*, que está diretamente ligado com a formação de biofilme em enterococos (FISHER; PHILLIPS, 2009; HEIKENS et al., 2007; TOLEDO-ARANA et al., 2001), também pode contribuir para as propriedades de resistência antimicrobiana, por impedir o transporte de massa dos antimicrobianos através do biofilme, provavelmente por ligação direta a estes agentes (DONLAN, 2002). Recentemente, foram descobertos outros determinantes genéticos que atuam na formação de biofilme, associados com resistência a antimicrobianos detectados em *E. faecalis*, entre esses, estão componentes do sistema de *quorum sensing* como *gelE*, *fsrA* e *fsrC*, além de dois genes que codificam a enzima glicosiltransferase (DALE et al., 2015).

A presença de enterococos em alimentos de origem vegetal e o fato de muitos deles serem consumidos crus ou minimamente processados, aumenta a preocupação de que isolados patogênicos possam contribuir para a disseminação de resistência e fatores de virulência para a flora intestinal humana, bem como, no ambiente clínico (ABRIOUET et al., 2008; SHWAIGER et al., 2011).

O papel da carne como reservatório de enterococos resistentes a antimicrobianos e sua veiculação via alimento para a comunidade foi apontada por GOUSIA et al. (2011) e LARSEN et al. (2010). No entanto, a eficiência da colonização do trato digestório por enterococos mediante o consumo de alimento contaminado ainda é desconhecida (MICALLEF et al., 2011). Também são poucos os trabalhos que estudam a presença desta bactéria em vegetais.

Produtos lácteos contaminados com enterococos resistentes à vancomicina

(FURLANETO-MAIA et al., 2014) se somam aos resultados semelhantes obtidos por este trabalho, envolvendo vegetais. Isso torna preocupante o cenário da terapêutica das infecções enterocócicas graves, uma vez que a vancomicina é o fármaco de última escolha nesses casos (HUYCKE et al., 1998), e a ocorrência de enterococos resistentes à vancomicina vem aumentando no ambiente hospitalar (BEARMAN; WENZEL, 2005; MENICHETTI, 2005).

Apesar das evidências mostrando a contribuição do uso dos antimicrobianos na agricultura para o aparecimento e disseminação da resistência nos alimentos, este não deve ser o único motivo, uma vez que as razões são complexas e multifatoriais, requerendo mais investigação (GOUSIA et al., 2011).

6 CONCLUSÕES

- Foi detectada a presença de *E. casseliflavus/flavescens*, *E. columbae*, *E. faecium*, *E. mundtii* e *E. avium* em alimentos de origem vegetal no Paraná, Brasil.

- A resistência fenotípica foi expressa para todos os antimicrobianos testados, sendo a resistência à vancomicina, eritromicina e teicoplanina mais expressiva.

- A resistência genotípica foi detectada para os genes *tetM*, *tetL*, *vanA*, *vanB* e *aac-(6')*.

- Todos os isolados avaliados neste estudo apresentaram capacidade de formar biofilme, distribuídos em produtor de biofilme fraco, moderado e forte.

De acordo com estes resultados, alimentos de origem vegetal podem atuar como reservatório de enterococos resistentes a antimicrobianos.

REFERÊNCIAS

- ABAMECHA, A.; WONDAFRASH, B.; ABDISSA, A. Antimicrobial resistance profile of *Enterococcus* species isolated from intestinal tracts of hospitalized patients in Jimma, Ethiopia, **BMC Research Notes**, v. 8:213, p. 1-7, 2015.
- ABRIOUEL, H.; OMAR, N.B.; MOLINOS, A.C.; LÓPEZ, R. L.; GRANDE, M. J.; MARTINEZ-VIEDMA, P.; ORTEGA, E.; CAÑAMERO, M.M.; GALVEZ, A. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 123, p. 38–49, 2008.
- AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Investigação e controle de bactérias multirresistentes. Disponível em: http://www.professores.uff.br/jorge/manual%20_controle_bacterias.pdf. Acesso em 19/08/2015.
- ALCÂNTARA, M.; MORAIS, I.C.L.; SOUZA, . C.M.O.C.C. Principais Microrganismos envolvidos na deterioração das características sensoriais de derivados cárneos, **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 6, p. 1-20, 2012.
- AESIF, S.W.; DELMAN, M.; KEISER, J.F. Case of *Enterococcus casseliflavus* Endocarditis, **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 37, p. 41, 2015.
- BAELE, M.; DEVRIESE, L.A.; BUTAYE, P.; HAESEBROUCK, F. Composition of enterococcal and streptococcal flora from pigeon intestines, v.92, p. 348-51, 2002.
- BAE, Y-M.; ZHENG, L.; HYUN, J-E.; JUNG, K-S.; HEU, S.; LEE, S-Y. Growth Characteristics and Biofilm Formation of Various Spoilage Bacteria Isolated from Fresh Produce, **Journal of Food Science**, v. 79, p. 2072 - 2080, 2014.
- BARBOSA, J.; FERREIRA, V.; TEIXEIRA, P. Antibiotic susceptibility of Enterococci isolated from traditional fermented meat products. **Food Microbiology**, v. 26, p. 527-532, 2009.
- BEARMAN, G. M. L.; WENZEL, R. P. Bacteraemias: a leading cause of death. **Archives of Medical Research**, v. 36, p. 646–659, 2005.
- BENITO, Y; PIN, C; MARIN, ML.; GARCIA, ML.; SELGAS, MD.; CASAS, C. Cell surface hydrophobicity and attachment of pathogenic and spoilage bacteria to meat surfaces, **Meat Science**, v. 45, p. 419–425, 1997.
- BILLSTROM, H.; LUND, B.; SULLIVAN, A.; NORD, C. E. Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, p. 374–377, 2008.

BUTAYE, P.; BAELE, M.; DEVRIESE, L.; HAESEBROUCK, F. Comparison of Susceptibility to Antimicrobials of the Enterococcal Species Isolated from Pigeons (*Columba livia*), **Microbial Drug Resistance**, v. 8, p., 2002.

CABALLERO-GRANADO, F.J.; BECERRIL, B.; CUBEROS, L.; BERNABEU, M.; CISNEROS, J.M.; PACHON, J. Attributable mortality rate and duration of hospital stay associated with enterococcal bacteremia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, p. 587–594, 2001.

CAMARGO, C.H.; BRUDER-NASCIMENTO, A.; LEE, S.H.; FERNANDES Jr, A.; KANENO, R.; RALL, V.L.M. Prevalence and phenotypic characterization of *Enterococcus* spp. isolated from food in Brazil, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 111-115, 2014.

CAMPOS, A.C.F.B.; SOUZA, N.R.; SILVA, P.H.C.; SANTANA, A.P. Resistência antimicrobiana em *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* isolados de carcaças de frango, **Pesq. Vet. Bras.**, v.33, p. 575-580, 2013.

CAMPOS, J.; MOURÃO, J.; PESTANA, N.; PEIXE, L.; NOVAIS, C.; ANTUNES, P. Microbiological quality of ready-to-eat salads: An underestimated vehicle of bacteria and clinically relevant antibiotic resistance genes, **International Journal of Food Microbiology**, v. 166, p. 464–470, 2013.

CAMU, N.; WINTER, T.; VERBRUGGHE, K.; CLEENWERCK, I.; VANDAMME, P.; TAKRAMA, J.S.; VANCANNEYT, M.; VUYST, L. Dynamics and Biodiversity of Populations of Lactic Acid Bacteria and Acetic Acid Bacteria Involved in Spontaneous Heap Fermentation of Cocoa Beans in Ghana, **Applied and Environmental Microbiology**, p. 1809–1824, 2007.

CARDAMONE, C.; ALEO, A.; MAMMINA, C.; OLIVERI, G.; DI NOTO, A.M. Assessment of the microbiological quality of fresh produce on sale in Sicily, Italy: preliminary results, **Journal of Biological Research**, v. 22, p. 1-6, 2015.

CASSENEGO, A.P.V. **Análise dos fatores de virulência em *Enterococcus faecalis* isolados de humanos, alimentos e frangos**, 2014. 127 f. Tese (Doutorado em Microbiologia molecular de procaríotos) - Instituto de ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

CETINKAYA, Y.; FALK, P.; MAYHALL, C.G. Vancomycin-resistant enterococci. **Clinical Microbiology Rev**, v.13, p. 686- 707, 2000.

CHANG, Q.; WANG, W.; REGEV-YOCHAY, G.; LIPSITCH, M.; HANAGE, W.P. Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be?, **Evolutionary Applications**, v.8, p. 240–245, 2015.

CHAO, C.T.; YANG, S.Y.; HUANG, J.W. Peritoneal Dialysis Peritonitis Caused by *Enterococcus avium*, **Peritoneal Dialysis International**, v. 33, p. 335-336, 2013.

CHEN, H.; LIU, Z.; WANG, M.; CHENA, S.; CHENA, T. Characterisation of the spoilage bacterial microbiota in oyster gills during storage at different temperatures, **J Sci Food Agric**, v. 93, p. 3748–3754, 2013.

CHOI, J-M.; WOO, G-J. Transfer of Tetracycline Resistance Genes with Aggregation Substance in Food-Borne *Enterococcus faecalis*, **Curr Microbiol**, v. 70, p. 476–484, 2015.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology Molecular Biology Rev**, v. 65, p. 232–260, 2001.

CHRISTENSEN, E.A.; JOHO, K.; MATTHEWS, K.R. Streptogramin resistance patterns and virulence determinants in vancomycin-susceptible enterococci isolated from multi-component deli salads. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 1260-1265, 2008.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement**. CLSI/NCCLS document M100-S21, 2011.

COCCONCELLI, P.S.; PORRO, D.; GALANDINI, S.; SENINLI, L. Development of RAPD protocol for typing of strains of lactic acid bacteria and enterococci. **Letters in Applied Microbiology**, v. 21, p. 376–379, 1995.

COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections, **Science**, v. 284, p. 1318-1322, 1999.

CRETI, R.; KOCK, S.; FABRETTI, F.; BALDASSARI, L.; HUEBNER, J. Enterococcal colonization of the gastro-intestinal tract: role of biofilm and environmental oligosaccharides, **BMC Microbiology**, v. 6, p. 1-8, 2006.

DALE, J.L.; CAGNAZZO, J.; PHAN, C.Q.; BARNES, A.M.T.; DUNNY, G.M. Multiple roles for *Enterococcus faecalis* glycosyltransferases (GTFs) in biofilm-associated antibiotic resistance, cell envelope integrity, and conjugative transfer, **Antimicrob. Agents Chemother**, 2015.

DELPECH, G.; POURCEL, G.; SCHELLI, C.; DE LUCA, M.; BASUALDO, J.; BERNSTEIN, J.; GRENOVERO, S.; SPARO, M. Antimicrobial Resistance Profiles of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Isolated from Artisanal Food of Animal Origin in Argentina, **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, p. 939-944, 2012.

DEVRIESE, L.A.; POT, B. The genus *Enterococcus*. In: Wood, B.J.B., Holzapfel, W.H. (Eds.), *The Lactic Acid Bacteria. The Genera of Lactic Acid Bacteria*, vol. 2. Blackie Academic & Professional, London, United Kingdom, p. 327–367, 1995.

DEVRIESE, L.A.; POT, B.; COLLINS, M.D. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 75, p. 399-408, 1993.

DONLAN, R.M.; Biofilms: Microbial Life on Surfaces, **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, p. 881-890, 2002.

DOMIG, K.J.; MAYER, H.K.; KNEIFEL, W. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation, and identification of *Enterococcus* spp. media for isolation and enumeration. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 147-164, 2003.

DONABEDIAN, S.; CHOW, J.W.; SHLAES, D.M.; GREEN, M.; ZERVOS, M.J. DNA hybridization and contour-clamped homogeneous electric field electrophoresis for identification of enterococci to the species level. **Journal Clinical Microbiology**, v. 33, p. 141-145, 1995.

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

DUYGU, F.; BALCI, P.O.; SOLMAZ, M.; UÇAR, N.S. Meningitis associated with Vancomycin resistant *Enterococcus casseliflavus*: First report, **Journal of Microbiology and Infectious Diseases**, v. 1, p. 138-140, 2011.

EFSA (European Food Safety Authority). **Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2013): FSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ)**. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3449.pdf>. Acessado em 11.ago.2014.

EFSA (European Food Safety Authority). **Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2010): FSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ)**. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/fr/scdocs/doc/1944.pdf>. Acessado em 11.ago.2014.

EUZÉBY, J.P. **List of prokaryotic names with Standing in Nomenclature - genus *Enterococcus***. Disponível em <http://www.bacterio.cict.fr/e/enterococcus.html>. Acessado em 20.mar. 2015.

FACKLAN R.R.; SAHM D.F.; TEIXEIRA, L.M. *Enterococcus*. In: MURRAY PR, BARON EJ, PFALLER MA, TENOVER FC, YOLKEN RH. **Manual of Clinical Microbiology**. 7 ed. Washington: American Society for Microbiology Press, p. 297-305, 1999.

FERNANDES, M.S.; KABUKI, D.Y.; KUAYE, A.Y. Biofilms of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from the processing of ricotta and the control of these pathogens through cleaning and sanitization procedures, **International Journal of Food Microbiology**, v. 200, p. 97-103, 2015.

FERNANDEZ-FUENTES, M.A.; ABRIOUL, H.; MORENTE, E.O.; PULIDO, R.P.; GÁLVEZ, A. Genetic determinants of antimicrobial resistance in Gram positive bacteria from organic foods, **International Journal of Food Microbiology**, v. 172, p. 49-56, 2014.

FISCHER, K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, v. 155, p. 1749–1757, 2009.

FONTANA, C.; GAZZOLA, S.; COCCONCELLI, P.S.; VIGNOLO, G. Population structure and safety aspects of *Enterococcus* strains isolated from artisanal dry fermented sausages produced in Argentina **Letters in Applied Microbiology**, v. 49, p. 411–414, 2009.

FOUQUIÉ-MORENO; M. R.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E.; DE VUYST, L. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, p. 1-24, 2006.

FONSECA, J.F.S.G. **Avaliação da capacidade de adesão e produção de biofilme em enterococos clínicos e alimentares**, 2010. 46 f. Dissertação (Mestrado em microbiologia aplicada) – Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2010.

FRANZ, C.M.A.P.; STILES, M. E.; SCHLEIFER, K. H.; HOLZAPFEL, W. H. Enterococci in foods – a conundrum for food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 105-122, 2003.

FURLANETO-MAIA, L.; ROCHA, K.R.; HENRIQUE, F.C.; GIAZZI, A.; FURLANETO, M.C. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* sp isolated from soft chesse in Southern Brazil, **Advances in Microbiology**, v. 4, p.175-181, 2014.

GARRIDO, A.M.; GÁLVEZ, A.; PULIDO, R.P. Antimicrobial resistance in Enterococci, **Journal of Infectious Diseases & Therapy**, v. 2, p. 1-7, 2014.

GEVERS, D.; DANIELSEN, M.; HUYS, G.; SWIGS J. Molecular characterization of *tet(M)* genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry sausage, **Appl Environ Microbiol**, v. 69, p.1270-1275, 2003.

GILMORE, M. The Enterococci: pathogenesis, molecular biology and antibiotic resistance. Washington, DC: **American Society for Microbiology**, 2002.

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

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

GÓMEZ, J.; GÓMEZ-LUS, M.L.; BAS, P.; RAMOS, C.; CAFINI, F.; MAESTRE, J.R. PRIETO, J. ¿Es la cuantificación del biofilm un elemento diferenciador en la patogenia de bacilos gramnegativos? **Rev Esp Quimioter**, v. 26, p. 97-102, 2013. GOUSIA, P.; ECONOMOU, V.; SAKKAS, H.; LEVEIDIOTOU, S.; PAPADOPOLOU, C. Antimicrobial resistance of major foodborne pathogens from major meat products. **Foodborne Phatogens and Disease**, v. 8, p. 27-38, 2011.

HEIKENS, E.; BONTEN, M.J.M. WILLEMS, R.J.L. Enterococcal Surface Protein Esp Is Important for Biofilm Formation of *Enterococcus faecium* E1162, **Journal of Bacteriology**, v. 189 , p. 8233–8240, 2007.

HIDANO, A. YAMAMOTO, T, HAYAMA, Y, MUROGA, N, KOBAYASHI, S.; NISHIDA, T.; TSUTSUI, T. Unraveling Antimicrobial Resistance Genes and Phenotype Patterns among *Enterococcus faecalis* Isolated from Retail Chicken Products in Japan, **PLOS ONE**, v. 10, p. 1-15, 2015.

HUYCKE, M.M.; SAHN, D.F.; GILMORE, M.S. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, p. 239-249. 1998.

HUYS,G; D'HAENE, K; COLLARD, J.M.; SWINGS, J. Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from food. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p. 1555-1562, 2004.

IZUMI, H.; NAGANO, M; OSAKI, Y. Microbial evaluation of fresh marketed vegetables, **Mem. School. B.O.S.T. Kinki University**, v. 13, p. 15-22, 2004.

JACKSON, C.R.; FEDORKA-CRAY, P.J.; BARRET, J.B. Use of genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci, **J. Clin.Microbiol**, v. 42, p. 3558-3565, 2004.

JAHAN, M.; ZHANEL, G.G.; SPARLING, R.; HOLLEY, R.A. Horizontal transfer of antibiotic resistance from *Enterococcus faecium* of fermented meat origin to clinical isolates of *E. faecium* and *Enterococcus faecalis*, **International Journal of Food Microbiology** , v. 199, p. 78–85, 2015).

JAMET, E.; AKARY, E.; POISSON, M.A.; CHAMBA, J.F.; BERTRAND, X.; SERROR, P. Prevalence and characterization of antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* in French cheeses, **Food Microbiology**, v. 31, p. 191e198, 2012.

JENSEN, L.B.; HAMMERUM, A.M.; POULSEN, R.L.; WESTH, H. Vancomycin resistant *Enterococcus faecium* strains with highly similar pulsed-field gel electrophoresis patterns containing similar Tn1546-like elements isolated from a hospitalized patient and pigs in Denmark. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 724–725, 1999.

KASIMOGLU-DOGRU, A.; GENÇAY, Y.E.; AYAZ, N.D. Prevalence and antibiotic resistance profiles of *Enterococcus* species in chicken at slaughter level: absence of *vanA* and *vanB* genes in *E. faecalis* and *E. faecium*, **Res. Vet. Sci**, v. 89, p. 153-158, 2010.

KAUR, P.; RAI, N. Bacteriological analysis of fresh vegetables from main market of Dehradun, **International Journal of PharmTech Research**, vol. 8, p. 415-425, 2015.

KIMPE, A.; DECOSTERE, A.; BAELE, M.; DEVRIESE, L.; HAESEBROUCK, F. Presence and mechanism of macrolide-lincosamide resistance in *Enterococcus*

columbae strains belonging to the intestinal flora of pigeons, **Avian Pathology**, v. 33, p. 310-331, 2004.

KIM, S-R.; NONAKA, L.; SUZUKI, S. Occurrence of tetracycline resistance genes *tet(M)* and *tet(S)* in bacteria from marine aquaculture sites. **FEMS Microbiology Letters**, v. 237, pg 147 – 156, 2004.

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

KLIBI, N.; SAID, N.B.; JOUINI, A.; SLAMA, K.B.; LOPEZ, M.; SALLEM, R.B.; BOUDABOUS, A.; TORRES, C. Species distribution, antibiotic resistance and virulence traits in enterococci from meat in Tunisia, **Meat Science**, v. 93, p. 675-680, 2013.

KOLUMAN, A.; AKANB, L.S.; ÇAKIROGLUB, F.P. Occurrence and antimicrobial resistance of Enterococci in retail foods. **Food Control**, v. 20, p. 281, 283, 2009.

KÜHN, I.; IVERSEN, A.; FINN, M. GREKO, F.; BURMAN, L.G.; BLANCH, A.R.; VILANOVA, X.; MANERO, A.; TAYLOR, H. ; CAPLIN, J. ; DOMINGUEZ, L. ; HERRERO, I.A.; MORENO, M. A. ; MOLLBY, R. Occurrence and Relatedness of Vancomycin-Resistant Enterococci in Animals, Humans, and the Environment in Different European Regions, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 5383–5390, 2005.

LARSEN, J.; SHONHEYDER, H.C.; LESTER, C.H.; OLSEN, S.S.; PORSBO, L.J.; GARCIA-MIGURA, L.; JENSEN, L.B.; BISGAARD, M.; HAMMERUM, A.M. Porcine-Origin Gentamicin- Resistant *Enterococcus faecalis* in Humans, Denmark, **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, p. 682-684, 2010.

LEE, P.P.; DONALD, M.D.; FERGUSON Jr, A.; LAFFAN, J.J. Vancomycin-Resistant *Enterococcus avium* Infections, **Infectious Diseases in Clinical Practice** , v. 12, p. 239-244, 2004.

LIU , Y, WANG, Y.; DAI, L. ; WUA, C.; SHEN, J. First report of multiresistance gene *cfr* in *Enterococcus casseliflavus* and *gallinarum* of swine origin **Veterinary Microbiology**, v. 170, p. 352–357, 2014.

MACOVEI, L. ZUREK, L. Influx of Enterococci and Associated Antibiotic Resistance and Virulence Genes from Ready-To-Eat Food to the Human Digestive Tract, **Applied and Environmental Microbiology**, p. 6740–6747, 2007.

MADIGAN M.T., MARTINKO J.M., DUNLAP P.V., CLARK DP. **Microbiologia de Brock**. 12. ed Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160 p.

MALANI, P.N.; KAUFFMAN, C.A.; ZERVOS, M.J. Enterococcal disease, epidemiology, and treatment. In: Gilmore, M.S., Clewell, D.B., Courvalin, P., Dunny, G.M., Murray, B.E., Rice, L.B. (Eds.), *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic resistance*. ASM, Washington, D.C., pp. 385–408, 2002.

- MANERO, A.; BLANCH, A.R. Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key, **Appl. Environ. Microbiol**, v. 65, p. 4425 – 4430, 1999.
- MANNU, L.; PABA, A.; DAGA, E.; COMUNIAN, R.; ZANETTI, S.; DUPRE, I.; SECHI, L. A. 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.
- MARINHO, A.R.; MARTINS, P.D.; DITMER, E.M.; D'AZEVEDO, P.M.; FRAZZON, J. VAN DER SAND, S.T.; FRAZZON, A.P.G. Biofilm formation on polystyrene under different temperatures by antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from food Brazilian, **Journal of Microbiology**, v. 44, 2, p. 423-426, 2013.
- 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.
- MARTINEZ, J. L.; BAQUERO, F. Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. **Clinical Microbiology Rev**, v. 15, p. 647–679, 2002.
- MCGOWAN, L.; JACKSON, C.R.; BARRET, J.B.; et al. Prevalence and antimicrobial resistance of enterococci isolated from retail fruits, vegetables, and meats, **Journal of Food Protection**, v. 69, p. 2976-2982, 2006.
- MEDEIROS, A.W.; PEREIRA, R.I.; OLIVEIRA, D.V.; MARTINS, P.D.; AZEVEDO, P.A. VAN DER SAND, S.; FRAZZON, J. FRAZZON, A.P.G. Molecular detection of virulence factors among food and clinical *Enterococcus faecalis* strains in South Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 327-332, 2014.
- MENICHETTI, F. Current and emerging serious gram-positive infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, p. 22–28, 2005.
- MICALLEF, S.A.; GOLDSTEIN, R.E.R.; GEORGE, A.; EWING, L. TALL, B.D.; BOYER, M.S.; JOSEPH, S.W.; SPKOTA, A.R. Diversity, distribution and antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. recovered from tomatoes, leaves, water and soil on U.S Mid-Atlantic farms, **Food Microbiology**, v. 36, p. 465-474, 2013.
- MOELLERING, R.C. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen, **Clinical Infectious Diseases**, v. 14, p. 1173-1176, 1992.
- MOHAMED, J.A; HUANG, D.B. Biofilm formation by enterococci. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 1581-1588, 2007.
- MOHANTY, S.; KAPIL, A.; DAS, B.K.; DHAWAN, B. *Enterococcus avium* cerebellar abscess, **Neurology India**, v. 54, p. 108-109, 2006.

MONTALBÁN-LOPEZ, M.; SÁNCHEZ-HIDALGO, M.; VALDIVIA, E.; MARTÍNEZ-BUENO, M.; MAQUEDA, M. Are bacteriocins underexploited? Novel applications for old antimicrobials, **Curr Pharm Biotechnol**, v. 12, p. 1205-20, 2011.

MÜLLER, T.; ULRICH, A.; OTT, E.M.; MÜLLER, M. Identification of plant-associated enterococci. **J Appl Microbiol**, v. 91, p. 268-78, 2001.

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

MURRAY, B.E. Vancomycin-resistant enterococcal infections. **The New England Journal of Medicine**, 342, 710-721, 2000.

NARCISO-SCHIAVON, J.L.; BORGONOVO, A.; MARQUES, P.C.; TONON, D.; BANSHO, B.T.O.; MAGGI, D.C.; DANTAS-CORREA, E.B.; SCHIAVON, L.L. *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus gallinarum* as causative agents of spontaneous bacterial peritonitis, **Annals of Hepatology**, v. 14, p. 270-272, 2015.

NAVARRO, F.; COURVALIN, P. Analysis of genes encoding D-alanine:D-alaninylase-related enzymes in *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus flavescens*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 38, p. 1788-1793, 1994.

NIEDERHAÜSERN, S.; BONDI, M.; MESSI, P.; ISEPPI, R.; SABIA, C.; MANICARDI, G.; ANACARSO, I. Vancomycin resistance transfer-ability from VanA enterococci to *Staphylococcus aureus*, **Curr Microbiol**, v.62, p. 1363–1367, 2011.

NIETO-ARRIBAS, P.; SESENA, S.; POVEDA, J.M.; CHICON, R.; CABEZAS, L.; PALOP, L. Enterococcus populations in artisanal Manchego cheese: biodiversity, technological and safety aspects, **Food Microbiology**, v. 28, p. 891-899, 2011.

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

OMAR, N.B.; CASTRO, A.; LUCAS, R.; ABRIOUEL, K.; YOUSIF, N.M.K.; FRANZ, C.M.A.P.; HOLZAPFEL, W.H.; PÉREZ-PULIDO, R.; MARTINEZ-CANÁMERO, M.; GÁLVEZ, A. Functional and safety aspects of Enterococci isolated from different Spanish foods. **Systematic Applied Microbiology**, v. 27, p. 118–130, 2004.

PEREIRA, R.I.P.; SANTESTEVAN, J.; D'AZEVEDO, P.A.; FRAZZON, A.P.G. Identificação genotípica, fatores de virulência e capacidade de formação de biofilme *in vitro* de *Enterococcus* spp. isolados de leite bubalino no sul do Brasil, Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/96042>. Acesso em 16/11/2015.

PESAVENTO, G.; CALONICO, C.; DUCCI, B.; MAGNANINI, A.; LO NOSTRO, A. Prevalence and antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. isolated from retail cheese, ready-to-eat salads, ham, and raw meat, **Food Microbiology**, v. 41, p. 1-7, 2014.

PETERSEN, A.; DALSGAARD, A. Species composition and antimicrobial resistance genes of *Enterococcus* spp., isolated from integrated and traditional fish farms in Thailand, **Environmental Microbiology**, v, 5, p. 395–402, 2003.

PETERS, J.; MAC, K.; WICHMANN-SCHAUER, H.; KLEIN, G.; ELLERBROEK, L.. Species distribution and antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from food of animal origin in Germany. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 311–314, 2003.

PILLAI, S.K.; SAKOULAS, G.; ELIOPOULOS, G.M.; MOELLERING, R.C. ; MURRAY, B.E.; INOUE, R.T. Effects of Glucose on fsr-Mediated Biofilm Formation in *Enterococcus faecalis*, **JID**, v.190, 967-969, 2004.

POTES, M.E.; MARINHO, A.A. Utilização de diferentes meios de cultura na identificação e recuperação de bactérias lácticas. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 102, p. 145-151, 2007.

RADIMERSKI, T.; FROLKOVA, P.; JANOSZOWSKA, D.; DOLEJSKA, M.; SVEC, P.; ROUBALOVA, P.; CIKOVA, P.; CIZEK, A.; LITERAK, I. Antibiotic resistance in faecal bacteria (*Escherichia coli*, *Enterococcus* spp.) in feral pigeons, **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p.1687–1695, 2010.

RAMÍREZ , M.D.F.; SMID, E.J.; ABEE, T.; GROOT, M.N.N . Characterisation of biofilms formed by *Lactobacillus plantarum* WCFS1 and food spoilage Isolates, **International Journal of Food Microbiology**, v. 207, p. 23–29, 2015.

REPIZO, G.D.; ESPARIZ, M.; BLANCATO, V.S.; SUAREZ, C.A.; ESTEBAN, L.; MAGNI, C. Genomic comparative analysis of the environmental *Enterococcus mundtii* against enterococcal representative species, **BMC Genomics** , v. 15, p. 2-13, 2014.

RIBOLDI, G.P.; FRAZZON, J.; AZEVEDO, P.A.; FRAZZON, A.P.G. Antimicrobial resistance profile of *Enterococcus* spp. isolated from food in Southern Brazil, **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, 125-128, 2009.

RONCONI, M.C.; MERINO, L.A.; FERNNÁNDEZ, G. Detección de *Enterococcus* resistentes a altos niveles de aminoglucósidos y resistentes a glucopéptidos en *Lactuca sativa* (lechuga), **Enferm Infec Microbiol Clin**, v. 20, p. 380-383, 2002.

SAMBHAV, K.; MATHAI, A.; REDDY, A.K.; REDDY, B.V.; BHATIA, K.; BALNE, B, K. Endogenous endophthalmitis caused by *Enterococcus casseliflavus*, **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, p. 670–672, 2011.

SANTOS, K.M.O.; VIEIRA, A.D.S.; SALLES, H.O.; OLIVEIRA, J.S.; ROCHA, C.R.C.; BORGES, M.F.; BRUNO, L.M.; FRANCO, B.D.G.M.; TODOROV, S.D. Safety, beneficial and technological properties of *Enterococcus faecium* isolated from Brazilian cheeses, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 237-249, 2015.

SAID, L.B.; KLIBI, N.; DZIRI, R.; BORGIO, F.; BOUDABOUS, A.; SLAMA, K.B.; TORRES, C. Prevalence, antimicrobial resistance and genetic lineages

of *Enterococcus* spp. from vegetable food, soil and irrigation water in farm environments in Tunisia, **Science of Food Agriculture**, Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25988398>, 2015.

SCHWAIGER, K.; HELMKE, K.; HOLZEL, C.S.; BAUER, J. Antibiotic resistance in bacteria isolated from vegetables with regards to the marketing stage (farms vs. supermarket), **International Journal of Food Microbiology**, v. 148, p. 191-196, 2011.

SCLEIFER, K.H; KILPPER-BALZ, R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* com. nov. and *Enterococcus faecium* com. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 34, p. 31-34, 1984.

SETTANNI, L.; CORSETTI, A. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology, Rev**, v. 121, p. 123–138, 2008.

SHARMA, P.; TOMAR, S.K.; GOSWAMI, P.; SANGWAN, V.; SINGH, R. Antibiotic resistance among commercially available probiotics. **Food Research International**, v. 57, p. 176-195, 2014.

SHEN, J.; ZHAO, B.X.; LI, T.; BAN, H.; TIAN, L.; GE, Y.L.; CHEN, T.Y.; LI, S.Y.; ZHANG, L.B. Microbial presence on kitchen dishcloths in Chinese households, **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 27, p. 978-981, 2014.

SHIWA, Y.; YANASE, H.; HIROSE, Y.; SATOMI, S.; ARAYA-KOJIMA, K.; WATANABE, S.; ZENDO, T.; CHIBAZAKURA, T.; SHIMIZU-KADOTA, M. YOSHIKAWA, H.; SONOMOTO, K. Complete Genome Sequence of *Enterococcus mundtii* QU 25, an Efficient L-(1)-Lactic Acid-Producing Bacterium, **DNA Research**, v. 21, p. 369–377, 2014.

SILVA, V.L.; CAÇADOR, N.C.; SILVA, C.S.F.; FONTES, C.O.; GARCIA, G.D.; NICOLI, J.R.; DINIZ, C.G. Occurrence of Multidrug-Resistant and Toxic-Metal Tolerant Enterococci in Fresh Feces from Urban Pigeons in Brazil, **Microbes Environ.**, v. 27, p. 179–185, 2012.

SHI, XM.; ZHU, XN. Biofilm formation and food safety in food industries. **Trends Food Sci Technol**, v. 20, p. 407–413, 2009.

SIMONESEN, G.S.; HAAHEIM, H.; DAHL, K.H.; KRUSE, H.; LOVSETH, A.; OLSVIK, O.; SUNDSFJORD, A. Transmission of VanA-type vancomycin-resistant enterococci and vanA resistance elements between chicken and humans at avoparcin-exposed farms. **Microbial Drug Resistance**, v. 4, p. 313–318, 1998.

SOUZA, M.A. **Emergência e disseminação de Enterococo Resistente à Vancomicina em Hospital Universitário no Centro Oeste do Brasil**. 2013. 57 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical e Saúde Pública) - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública) – Faculdade de Ciências, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

SPENSE, R. **Distribution and taxonomy of Enterococcus from the Davis Station Wastewater discharge, Antartica**. 2014. 126f. Dissertação (Master of Applied Science) - (School of Earth, Environmental and Biological Sciences) - Science and Engineering Faculty, Queensland University of Technology, , 2014.

STEPANOVIC´, S.; DRAGANA, V.; HOLA, V.; VENTURA, G.B.; DJUKIC, S.; , C´IRKOVIC´, I.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci, **APMIS**, v.115, p. 891–899, 2007.

SULTANA, F.; KAMRUNMNAHAR; AFROZ. H. ; AFROZ, J.; FAKRUDDIN, M.; DATTA, S. Multi-antibiotic resistant bacteria in frozen food (ready to cook food) of animal origin sold in Dhaka, Bangladesh, **Asian Pac J Trop Biomed**, v. 4, p.268-271, 2014.

TALEBI, M.; SADEGHI, J.; RAHIMI, F.; POURSHAFIE, M.R. Isolation and Biochemical Fingerprinting of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* From Meat, Chicken and Cheese, **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 8, p. , 2015.

TENDOLKAR, P.M.; BAGHDAYAN, A.S.; GILMORE, M.S.; SHANKAR, N. Enterococcal Surface Protein, Esp, Enhances Biofilm Formation by *Enterococcus faecalis*, **Infection and Immunity**, v. 72, p. 6032–6039, 2004.

TIWARI, K.; BANERJEE, T.; FILGONA, J.; ANUPURBA, S. Study of virulence factors in association with antimicrobial resistance amongst urinary isolates of enterococci, **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 33, p. 455-457, 2015.

TOLEDO-ARANA, A.; VALLE, J.; SOLANO, C.; ARRIZUBIETA, M.J.; CUCARELLA, C.; LAMATA, M.; AMORENA, B.; LEIVA, J.; PENADE'S, J.R.; LASA, I. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation, **Applied Environmental Microbiology**, v. 67, p. 4538–4545, 2001.

TOP, J.; PAGANELLI, F.L.; ZHANG, X.; SCHAIK, W.; LEAVIS, H.L.; LUIT-ASBROEK, M.; POLL, T.; LENDERTSE, M; BONTEN, M.J.M.; WILLEMS, R.J.L. The *Enterococcus faecium* Enterococcal Biofilm Regulator, EbrB, Regulates the esp Operon and Is Implicated in Biofilm Formation and Intestinal Colonization, **PLOS ONE** , v.8, p. 1-15, 2013.

VAN HOUDT, R; MICHIELS, CW. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. **Journal Applied Microbiology**, v. 109, p. 1117–1131, 2010.

VAKULENKO, S.B.; DONABEDIAN, S.M.; VORKRESENS- KIY, A.M.; ZERVOS, M.J.; LERNER, M.A.; CHOW, J.W. Multiplex PCR for detection of aminoglycoside resistance genes in enterococci, **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 47, p. 1423-1426, 2003.

VELJOVIĆ , K.; POPOVIĆ , N.; VIDOJEVIĆ, A.T.; TOLINACKI,M.; MIHAJLOVIĆ, S.; JOVCIĆ , B.; KOJIĆ, M. Environmental waters as a source of antibiotic-resistant

Enterococcus species in Belgrade, Serbia, **Environ Monit Assess**, v. 187 (599), p. 1-15 - , 2015.

WEGENER, H.C.; AARESTRUP, F.M.; JENSEN, L.B.; HAMMERUM, A.M.; BAGER, F. Use of antimicrobial growth promoters in food animals and *Enterococcus faecium* resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, p. 329–335, 1999.

WENZEL, R.P.; EDMOND, M.B.. The impact of hospital-acquired bloodstream infections. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, p. 174–177, 2001.

YARON, S.; ROMLING, U. Biofilm formation by enteric pathogens and its role in plant colonization and persistence, **Microbial Biotechnology**, v.7, p. 496–516, 2014.