

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Vegetal



**Diversidade microbiana,
suscetibilidade a antibióticos e
fatores de virulência em
Enterococcus spp.**

Dissertação

Verónica Soares dos Santos

Mestrado em Microbiologia Aplicada

2012

Universidade de Lisboa

Faculdade de Ciências

Departamento de Biologia Vegetal



**Diversidade microbiana,
suscetibilidade a antibióticos e
fatores de virulência em
*Enterococcus spp.***

Dissertação orientada pela Doutora Teresa Maria Leitão Semedo Lemsaddek e
pela Professora Doutora Ana Maria Gonçalves Reis

Verónica Soares dos Santos

Mestrado em Microbiologia Aplicada

2012



**Diversidade microbiana,
suscetibilidade a antibióticos e
fatores de virulência em
Enterococcus spp.**

Verónica Soares dos Santos

Tese de Mestrado

2012

Dissertação orientada pela Doutora Teresa Maria Leitão Semedo Lemsaddek (Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária Departamento de Produção Animal e Segurança Alimentar Secção de Tecnologia dos Produtos Animais, Avenida da Universidade Técnica – Pólo da Ajuda 1300-477 Lisboa) e pela Prof. Doutora Ana Maria Gonçalves Reis (Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Departamento de Biologia Vegetal, Campus da FCUL, 1749-016 Lisboa, Portugal).

“Grandes realizações não são feitas por impulso, mas por uma soma de pequenas realizações.”

Vincent Van Gogh

Agradecimentos

Não poderia deixar de agradecer a alguma pessoas que contribuíram, de uma forma ou de outra, para que eu cumprisse esta etapa da minha vida.

Em primeiro lugar, queria agradecer à Doutora Teresa Semedo Lemsaddek, por tudo. Pela sua constante partilha de conhecimentos, presença e preocupação, que tornaram o trabalho mais motivante e desafiante. Foi, sem dúvida, incansável.

À Professora Doutora Ana Maria Gonçalves Reis, por ter sido uma pessoa presente ao longo de todo o ano de trabalho e pela constante expressão de palavras de força e de amizade.

À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa, por me ter acolhido e proporcionado todas as condições, para o desenvolver do meu trabalho.

Aos meus colegas e amigos do Departamento de Produção Animal e Segurança Alimentar, Secção de Tecnologia dos Produtos Animais. Ao Professor Doutor António Salvador Barreto, à Professora e à Doutora Maria João Fraqueza, pela constante disponibilidade e ajuda. À Engenheira Maria José Fernandes, à Maria Helena Fernandes, à Ana Rita, à Ana Martins, à Sara Santos, à Marta Nascimento, à Irani Gouveia e à Susana Nisa, por toda a amizade e pronta ajuda sempre que precisei.

À Cynthia e à Sara Caveirinha. Obrigada por partilharem este ano comigo e pela vossa amizade, ajuda e partilha de bons momentos. Todas juntas formámos uma ótima equipa.

À minha “caxopa” Mafalda. Agradeço-te pelas noitadas de trabalho em que o desespero e a boa disposição reinavam naquele laboratório. Por todas as peripécias ao longo de todo o trabalho, que tornaram tudo mais especial. Por termos partilhado, não só, desesperos e preocupações mas também muitas alegrias. Obrigada minha amiga.

A todos os meus amigos, sem exceção, muito obrigada por todo o incentivo e apoio.

Ao meu mano, tia Mò, avó Fátima, avô Zeca, tio Manuel, tio Paulo, Miguel e Marco. Muito obrigada a toda esta magnífica família, que se preocupou comigo a cada dia que passou, que me apoiaram e que me deram carinho, amor e toda a força.

Aos meus pequeninos, Tomás e Afonso, que conseguiram transformar momentos de maior aperto em momentos de gargalhadas e alegrias.

Ao meu querido Hugo, por todo o apoio, carinho, amor e amizade, ao longo destes últimos anos. Por me ter transmitido segurança, por me ter ajudado sempre que precisei e por toda a paciência.

Aos meus queridos e fabulosos pais. Agradeço-vos simplesmente por TUDO, sem vocês nada seria possível. Gosto muito de vocês!

Resumo

Durante muitos anos os enterococos foram considerados inofensivos para o homem. No entanto, atualmente são considerados patogénicos emergentes, devido à sua elevada resistência a antibióticos e produção de fatores de virulência.

No presente estudo, foi avaliada a presença e a diversidade de *Enterococcus* spp. em amostras recolhidas numa queijaria, num matadouro de suínos e num hipermercado. Utilizando metodologias fenotípicas e moleculares, um total de 149 isolados foi obtido, a partir de amostras de alimentos, de águas e de superfícies. De seguida, para a avaliação da diversidade microbiana da coleção em estudo, foi aplicada a técnica de PCR-fingerprinting. Os perfis obtidos foram analisados utilizando o *software* BioNumerics e a construção de dendrogramas permitiu a seleção de 71 isolados como representantes da coleção, 38 pertencentes à espécie *E. faecalis*, oito *E. faecium*, um *E. durans* e um *E. casseliflavus*, sendo que 23 permaneceram por identificar.

Para estimar o potencial de patogenicidade dos isolados em estudo, estes foram avaliados quanto ao nível de suscetibilidade a agentes antimicrobianos (19 antibióticos) e presença de fatores de virulência (adesinas, fatores secretados e feromonas sexuais).

Todos os isolados mostraram-se resistentes ao trimetoprim-sulfametoxazol mas nenhum apresentou resistência à ampicilina, gentamicina, amoxicilina-ácido clavulânico, nitrofurantoína ou linezolid. Para a quinupristina-dalfopristina, tetraciclina e bacitracina as resistências verificadas foram acima dos 50% sendo que, para os restantes antibióticos, mantiveram-se abaixo desse valor.

Na pesquisa de fatores de virulência, 52% dos isolados revelaram-se β -hemolíticos, embora o gene *cylA* não tenha sido detetado; 39% foram gelatinase positivos, sendo que 45% possuíam o gene *gelE*, e 32% foram considerados lipolíticos. Para os restantes genes pesquisados, detetaram-se percentagens acima dos 50% para *ccf*, *cpd* e *efaA_{fs}* e abaixo dos 50% para *agg*, *esp* e *efaA_{fm}*.

Em conclusão, estas bactérias estão disseminadas pelos ambientes em estudo, embora em níveis reduzidos, uma vez que a maioria foi obtida após enriquecimento das amostras recolhidas. O facto de a maioria dos isolados terem sido identificados como *E. faecalis* (considerada a espécie mais patogénica), de 66% dos isolados serem multirresistentes e de ter sido detetada a presença de genes codificantes para adesinas, fatores secretados e feromonas sexuais, aponta para o seu potencial patogenicidade. No entanto, a sua suscetibilidade a antibióticos de importância clínica diminui o risco associado.

Palavras-chaves: enterococos, patogenicidade, suscetibilidade a antibióticos, fatores de virulência

Abstract

For many years, enterococci have been considered harmless to humans. However, due to their high antibiotic resistance and virulence factors production, they are currently considered as emerging pathogens.

In the present study, we evaluated the presence and diversity of *Enterococcus* spp. in samples collected from a cheese factory, a slaughterhouse and a supermarket. Using phenotypic and molecular methods, a total of 149 strains were obtained from samples of food, water and food-processing surfaces. Then, in order to evaluate the microbial diversity of the collection under study, PCR-fingerprinting was applied. The patterns obtained were analyzed using the BioNumerics software and the construction of dendrograms allowed the selection of 71 isolates as representatives of the collection, 38 belonging to the species *E. faecalis*, eight *E. faecium*, one *E. durans* and one *E. casseliflavus*, 23 enterococci remained unidentified.

To estimate the pathogenicity potential of the isolates under evaluation, their antimicrobial susceptibility to 19 antibiotics was assessed, as well as the presence of virulence factors (adhesins, secreted factors and sex pheromones).

All isolates were resistant to sulphamethoxazol/trimethoprim, but none were resistant to ampicillin, gentamicin, amoxicillin/clavulanate, nitrofurantoin or linezolid. For quinupristin-dalfopristin, tetracycline and bacitracin the resistance levels observed were above 50 %, while for the remaining antibiotics resistance was below this value.

Screening for virulence factors showed that 52% of the isolates were β -hemolytic, even though the gene *cylA* was not detected, 39% were gelatinase positive, and 45% had the *gelE* gene, while 32% were lipolytic. For the remaining genes surveyed, rates above 50% were observed for the *ccf*, *cpd* e *efaA₈* and below 50% for *agg*, *esp* and *efaA_{f_m}*.

Overall, we can conclude that these bacteria are disseminated among all the studied environments, thus in reduced levels, once the majority of isolates was obtained only after sample enrichment. Since most of the isolates were identified as *E. faecalis* (considered the most pathogenic species); 66% of the isolates were multidrug-resistant and genes coding for adhesins, secreted factors and sex pheromones were detected, their potential pathogenicity is suggested. However, due to their susceptibility to clinically important antibiotics, the associated risk is probably reduced.

Keywords: enterococci, pathogenicity, antibiotic susceptibility, virulence factors

Índice

1. Introdução.....	1
1.1.Características gerais do género <i>Enterococcus</i>	1
1.2.Dualidade de funções	4
1.2.1.Importância em tecnologia alimentar	4
1.2.2.Potencial de patogenicidade	6
1.2.2.1.Resistência a antibióticos	7
1.2.2.2.Fatores de virulência	14
1.3.Objetivos	18
2. Materiais e Métodos	19
2.1.Recolha/processamento de amostras e isolamento.....	19
2.2.Identificação ao nível de género.....	20
2.3.Análise da diversidade.....	21
2.4.Identificação ao nível de espécie	22
2.5.Suscetibilidade a antibióticos	22
2.5.1.Antibiogramas.....	22
2.5.2.Pesquisa de genes de resistência	23
2.6.Fatores de virulência.....	24
2.6.1.Testes em placa.....	24
2.6.2.Pesquisa de genes de virulência	24
2.7.Análise Estatística	25
3. Resultados e Discussão	25
3.1.Disseminação pelos ambientes/locais em estudo.....	25
3.2.Relações de semelhança e principais espécies envolvidas	27
3.3.Suscetibilidade a antibióticos	30
3.4.Fatores de virulência.....	34
3.5.Potencial de Patogenicidade.....	37
4. Conclusões	38
5. Referências.....	40
Anexo A.....	46
Anexo B.....	48
Anexo C.....	50

Índice de Figuras

Figura 1- Árvore filogenética baseada nas sequências do gene rRNA 16S, evidenciando as relações entre estirpes-tipo de 35 espécies do gênero <i>Enterococcus</i> (Lemsaddek e Tenreiro, 2011).	2
Figura 2- Principais nichos ecológicos conhecidos das 43 espécies do gênero <i>Enterococcus</i> (adaptado de Lemsaddek e Tenreiro, 2011).	3
Figura 3- Operação envolvido na resistência à bacitracina (Manson <i>et al.</i> , 2004).	12
Figura 4- Operação envolvido na expressão da citolisina em <i>E. faecalis</i> (adaptado de Coburn e Gilmore, 2003).	16
Figura 5- Representação esquemática dos genes relacionados com a produção da gelatinase (Qin <i>et al.</i> , 2000).	17
Figura 6- Exemplo de Ent-PCR.	26
Figura 7- Dendrograma obtido com base nos perfis de PCR-fingerprinting de todos os isolados do matadouro.	29
Figura 8- Exemplo de PCR-multiplex espécie-específico.	30
Figura 9- Resistências observadas nos 71 isolados testados, através da realização de antibiogramas.	31
Figura 10- Comparação entre a pesquisa de genes de resistência e respectivas resistências observadas em placa.	33
Figura 11 - Análise da atividade fenotípica de fatores virulência.	34
Figura 12- Resultados da análise de genes de virulência.	35

Índice Tabelas

Tabela 1- Primers e condições de reação de PCR usados na identificação ao nível de gênero.	20
Tabela 2- Primers e condições de reação de PCR usados na tipificação.	21
Tabela 3- Primers e condições de reação de PCR usados na identificação ao nível de espécie.	22
Tabela 4- Antibióticos usados e respectivas classes e alvos.	22
Tabela 5- Combinações utilizadas na pesquisa de genes de resistência e condições de reação de PCR.	23
Tabela 6- Pesquisa de fatores de virulência (testes em placa).	24
Tabela 7- Combinações utilizadas na pesquisa de genes de virulência e condições de reação de PCR.	24

1. Introdução

1.1 Características gerais do género *Enterococcus*

O género *Enterococcus* pertence à família *Enterococcaceae*, ordem *Bacillales*, classe *Bacilli*, filo *Firmicutes* e domínio *Bacteria* (Ludwin *et al.*, 2009).

Ao longo de vários anos, a classificação e a nomenclatura deste género geraram bastante interesse e constante discussão. A primeira proposta do nome “*enterocoque*” surgiu em 1899 por Thiercelin e em 1902 Thiercelin e Jouhaud propuseram o nome genérico “*Enterococcus* “. No entanto, Andrewes and Horder em 1906, com base na capacidade destes microrganismos formarem cadeias curtas e em certas condições formarem cadeias longas, renomearam *Enterococcus* para “*Streptococcus faecalis*” sendo que, em 1937 os enterococos foram incluídos no género *Streptococcus*. Já em 1970, Kalina propôs que *Streptococcus faecalis* e *Streptococcus faecium* fossem renomeados como *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* respetivamente, visto que não existiam razões morfológicas nem biológicas para incluir os enterococos no género *Streptococcus* (Kalina, 1970). Porém, esta proposta não foi reconhecida oficialmente não tendo sido incluída na *Approved List of Bacterial Names*. Posteriormente, baseados em evidências filogenéticas envolvendo hibridações DNA-DNA e DNA-rRNA, Scheleifer e Kilpper-Bälz, em 1984, propuseram a reposição do género *Enterococcus* (Schleifer e Kilpper-Bälz, 1984). Juntamente com outros estudos que incluíam sequenciação de RNA ribossomal (rRNA) 16S, foi demonstrado que os enterococos pertencem a um género separado. Assim sendo, esta abordagem molecular permitiu a divisão de streptococos *sensu lato* em três géneros: (i) *Streptococcus sensu stricto*, que engloba a maioria das espécies conhecidas; (ii) *Enterococcus*, para o grupo entérico; (iii) *Lactococcus*, para os streptococos lácticos (Lemsaddek e Tenreiro, 2011).

Desde então, o género *Enterococcus* tem vindo a ser aceite como válido e até à data engloba 35 espécies válidas de acordo com *Taxonomic Outline of Bacteria and Archaea* (TOBA) (Lemsaddek e Tenreiro, 2011). De acordo com J. P. Euzéby [<http://www.bacterio.cict.fr/e/enterococcus.html> Data de consulta 12/09/2012], existem neste momento 41 espécies taxonomicamente validadas sendo que no presente ano foram aprovadas cinco novas espécies (*E. lactis*, *E. plantarum*, *E. quebecensis*, *E. rivorum* e *E. ureasiticus*). As espécies *E. lemanni* e *E. eurekensis* foram descritas recentemente por Cotta *et al.* (2012), no entanto estas ainda não constam da listagem apresentada por Euzéby.

Apesar das espécies validadas mais recentemente não estarem contempladas, na Figura 1 podem observar-se as relações filogenéticas entre 35 espécies de *Enterococcus*, baseadas nas sequências do gene rRNA 16S.

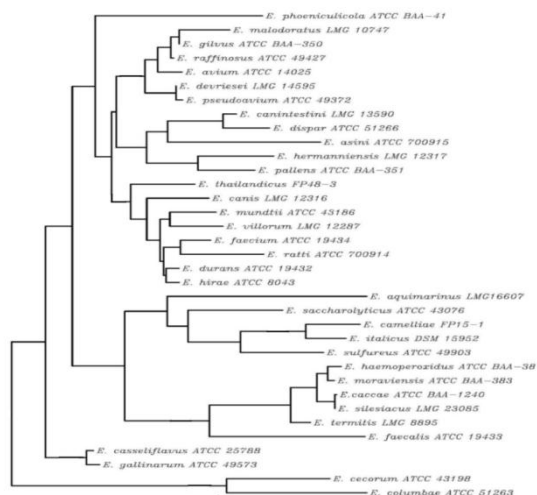


Figura 1- Árvore filogenética baseada nas sequências do gene rRNA 16S, evidenciando as relações entre estirpes-tipo de 35 espécies do género *Enterococcus* (Lemsaddek e Tenreiro, 2011).

Ao longo dos anos, várias reclassificações ao nível de espécie têm sido efetuadas, novas espécies têm sido validadas e os métodos aplicados na sua discriminação têm sido melhorados. Desta forma, Moreno *et al.* (2006) sugere que existe uma elevada probabilidade do sistema filogenético do género *Enterococcus* não estar completamente elucidado e que algumas reclassificações possam vir a ser necessárias num futuro próximo.

As bactérias pertencentes ao género *Enterococcus* são de forma ovoide, Gram positivas, podem surgir na forma individualizada ou organizada em pares ou cadeias curtas. São oxidase e catalase negativas, embora algumas estirpes revelem atividade de pseudocatalase (ex: *E. faecalis*, *E. haemoperoxidus*) em meio suplementado com sangue. São anaeróbias facultativas, não esporuladas e algumas estirpes podem possuir mobilidade por um flagelo de tamanho reduzido, assim como algumas espécies possuem pigmentação carotenóide amarela (Ludwin *et al.*, 2009). A maioria dos enterococos cresce a temperaturas entre os 10 e os 45 °C e determinadas espécies conseguem resistir 30 minutos a 60 °C (Manero e Blanch, 1999). Conseguem também crescer em 6,5% de NaCl e a um pH de 9,6, hidrolisam a esculina na presença de 40% de sais biliares e o seu conteúdo de G+C varia entre os 37 e os 45% (Semedo-Lemsaddek *et al.*, 2009). Mais de 90% das estirpes possuem o antigénio lipoteicoico do grupo D de Lancefield na parede celular (Koneman *et al.*, 2007). Contudo, deve ser tido em conta o facto de que nem todos os enterococos possuem as características descritas, sendo que já foi reportado por vários autores a existência de diferenças nas propriedades fisiológicas entre diferentes espécies e entre estirpes pertencentes à mesma espécie (Semedo-Lemsaddek *et al.*, 2009).

O habitat predominante destes microrganismos é o trato gastrointestinal de humanos e animais (Giraffa, 2002; Semedo-Lemsaddek *et al.*, 2009; Franz *et al.*, 2011). No entanto, tal como mostra a Figura 2, os enterococos são considerados microrganismos ubíquos, podendo ocupar diferentes nichos ecológicos como plantas, vegetais, alimentos crus e fermentados, solos e águas superficiais, entre outros (Giraffa, 2002; Semedo-Lemsaddek *et al.*, 2009; Lemsaddek e Tenreiro, 2011).

Espécies	Origem Ambiental									Origem Alimentar						Origem Humana e Animal														
	Geral	Água do mar e sedimentos	Água superficial	Águas de consumo	Ar interior de fábricas e habitações	Águas residuais	Silagem	Solo	Plantas		Geral	Produtos lácteos	Animais de criação	Produtos cárneos fermentados	Material vegetal fermentado	Alimentos congelados	Alimentos embalados a vácuo		Humanos	Outros mamíferos	Répteis	Pássaros	Moluscos	Crustáceos	Insetos	Órgãos ou fluidos corporais	Feces	Material clínico humano	Material clínico animal	
<i>Enterococcus aquinarus</i> ^a		•																												
<i>Enterococcus asini</i> ^a																				•								•		
<i>Enterococcus avium</i> ^a	•					•				•		•								•		•					•	•	•	
<i>Enterococcus coccae</i> ^a																			•									•		
<i>Enterococcus camelliae</i> ^a										•					•															
<i>Enterococcus canintestini</i> ^a																												•		
<i>Enterococcus canis</i> ^a																											•	•	•	
<i>Enterococcus casseliflavus</i> ^a	•	•	•			•	•	•	•	•	•	•	•						•	•			•		•		•	•	•	
<i>Enterococcus cecorum</i> ^a			•			•							•														•	•	•	
<i>Enterococcus columbae</i> ^a			•			•																						•		
<i>Enterococcus devriesei</i> ^a						•							•																	
<i>Enterococcus dispar</i> ^a												•															•	•	•	
<i>Enterococcus durans</i> ^a	•					•	•			•	•	•	•														•	•	•	
<i>Enterococcus eurekensis</i> ^b																												•		
<i>Enterococcus faecalis</i> ^a	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•		•				•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
<i>Enterococcus faecium</i> ^a	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•	•	•		•										•	•	•	•	
<i>Enterococcus gallinarum</i> ^a	•	•				•				•			•															•	•	•
<i>Enterococcus gilvus</i> ^a																											•		•	
<i>Enterococcus haemoperoxidus</i> ^a			•	•																										
<i>Enterococcus hermanniensis</i> ^a													•				•										•			
<i>Enterococcus hirae</i> ^a	•	•				•		•	•	•	•	•	•														•	•	•	•
<i>Enterococcus italicus</i> ^a												•																		
<i>Enterococcus lactis</i> ^c												•																		
<i>Enterococcus lemanii</i> ^b																												•		
<i>Enterococcus malodoratus</i> ^a												•																•		
<i>Enterococcus moraviensis</i> ^a			•	•																										
<i>Enterococcus mundtii</i> ^a		•						•	•			•	•															•	•	
<i>Enterococcus pallens</i> ^a																													•	
<i>Enterococcus phoeniculicola</i> ^a																											•			
<i>Enterococcus plantarum</i> ^d										•																				
<i>Enterococcus pseudoavium</i> ^a													•															•	•	•
<i>Enterococcus quebecensis</i> ^e				•																										
<i>Enterococcus raffinosus</i> ^a	•																											•		
<i>Enterococcus ratti</i> ^a																													•	
<i>Enterococcus rivorum</i> ^f																														
<i>Enterococcus saccharolyticus</i> ^a										•		•																•		
<i>Enterococcus silesiacus</i> ^a				•																										
<i>Enterococcus sulfureus</i> ^a										•																				
<i>Enterococcus termitis</i> ^a																										•	•			
<i>Enterococcus thailandicus</i> ^a													•																	
<i>Enterococcus ureasiticus</i> ^g				•																										
<i>Enterococcus viikkiensis</i> ^g					•																									
<i>Enterococcus villorum</i> ^a												•																	•	

^a, Lemsaddek e Tenreiro (2011); ^b, Cotta *et al.* (2012); ^c, Morandi *et al.* (2012); ^d, Švec *et al.* (2012); ^e, Sístek *et al.* (2012); ^f, Niemi *et al.* (2012); ^g, Rahkila *et al.* (2011)

Figura 2- Principais nichos ecológicos conhecidos das 43 espécies do género *Enterococcus* (adaptado de Lemsaddek e Tenreiro, 2011).

Atualmente, uma vasta variedade de métodos fenotípicos e moleculares são usados para a identificação e classificação de enterococos (Riboldi *et al.*, 2008). A identificação torna-se essencial para a proteção e segurança alimentar e ambiental, assim como para o diagnóstico e vigilância da saúde pública (Rasooly e Herold, 2008 *in* Diarra *et al.*, 2010). A identificação de espécies, usada por rotina em vários laboratórios, baseia-se em métodos fenotípicos (Riboldi *et al.*, 2008). Contudo, a abordagem fenotípica pode tornar-se problemática, visto que algumas espécies de *Enterococcus* não possuem as características típicas deste género (Ke *et al.*, 1999). A otimização dos métodos moleculares para a análise microbiana, tem vindo a tornar-se mais importante de dia para dia, com o principal objetivo de alcançar metodologias fiáveis, rápidas e simples para posterior aplicação rotineira em laboratórios, de maneira a melhorar a segurança e qualidade da análise. No caso dos enterococos já foram desenvolvidos variados métodos moleculares para a sua deteção e identificação ao nível de género ou de espécie. A deteção de DNA alvo inclui genes que codificam para rRNA, subunidade alfa da RNA polimerase e fenilalanina-tRNA sintetase, fator de alongação EF-Tu, ligase D-alanina:D-alanina, proteína de ligação à penicilina, muramidase, subunidade alfa da ATP sintetase bacteriana, proteínas de choque térmico (groEL), entre outros (Semedo-Lemsaddek *et al.*, 2009). Nos dias de hoje a identificação molecular prevalece em relação à fenotípica, no entanto esta última continua a ser utilizada como metodologia presuntiva e complementar.

1.2. Dualidade de funções

Segundo Moreno *et al.* (2006) o género *Enterococcus* pertence ao grupo mais controverso das bactérias lácticas (LAB). Isto porque, apesar do envolvimento destas bactérias, no desenvolvimento de características organolépticas vantajosas em vários produtos alimentícios, o que é facto é que também estão envolvidas na degradação de produtos de índole alimentar e neste momento, são considerados dos principais microrganismos nosocomiais.

1.2.1. Importância em tecnologia alimentar

Os enterococos fazem parte do microbiota envolvida em vários processos fermentativos em alimentos, tais como aqueles que envolvem leite, carne e vegetais. A sua presença em muitos destes produtos alimentares está parcialmente ou predominantemente associada ao desenvolvimento de características organolépticas como aroma, sabor e textura do produto final (Crespo e Alves, 2011). Esta contribuição na melhoria da qualidade dos produtos alimentares poderá provir da sua capacidade lipolítica e proteolítica, assim como da produção de componentes voláteis (Moreno *et al.*, 2006; Crespo e Alves., 2011). A robusta natureza dos enterococos permite-lhes tolerar e sobreviver a diversas concentrações salinas, pH e temperaturas, tornando possível o seu crescimento assim como a sua presença em níveis elevados, nestes alimentos (Franz *et al.*, 2011).

Em certos queijos, tipicamente produzidos em áreas Mediterrânicas, estes microrganismos possuem um importante papel no desenvolvimento do seu sabor e aroma (Moreno *et al.*, 2006; Franz *et al.*, 2011). Além disso, o estudo do microbiota destes alimentos indica que os enterococos também desempenham um papel importante na sua maturação, tendo desta forma importantes implicações na

indústria de laticínios (Giraffa, 2003; Moreno *et al.*, 2006). Normalmente estes queijos são produzidos com leite cru ou pasteurizado, de ovelha, cabra, búfala ou vaca (Crespo e Alves, 2011). A produção de enzimas proteolíticas envolvidas na degradação da caseína também contribui para a persistência dos enterococos nestes alimentos, uma vez que promove a libertação de aminoácidos que são essenciais para o crescimento bacteriano (Serio *et al.*, 2010).

Em produtos cárneos, as propriedades funcionais dos enterococos ainda não estão estudadas tão detalhadamente. Contudo, sabe-se que estas bactérias contribuem para o sabor final deste tipo de alimentos (Suzzi *et al.*, 2000; Moreno *et al.*, 2006; Crespo e Alves, 2011).

Segundo Franz *et al.* (2003), a presença e o crescimento de enterococos em alimentos fermentados como queijos e chouriços origina produtos organoleticamente únicos, que contribuem para o património gastronómico da região.

No que diz respeito aos vegetais, sabe-se que os enterococos também estão presentes nestes produtos. Essa presença está associada à sua ampla capacidade de tolerância a diversas condições ambientais, tal como referido anteriormente, sendo que a sua intervenção na fermentação da azeitona é um exemplo disso mesmo (Franz *et al.*, 2011).

Determinadas estirpes de origem alimentar, pertencentes a este género, apresentam características biotecnológicas vantajosas como a produção de bacteriocinas (enterocinas) e propriedades probióticas, que terão levado à sua aplicação em produtos fermentados (Sarantinopoulos *et al.*, 2001; Giraffa, 2002).

As características antimicrobianas provenientes da produção de enterocinas possibilitam a eliminação de variados patogéneos alimentares como *Bacillus cereus*, *Clostridium* spp., *Listeria monocytogenes* ou *Staphylococcus aureus* (Valenzuela *et al.*, 2009), assim como a melhoria do aroma de determinados alimentos (Moreno *et al.*, 2006). Para algumas estirpes detentoras destas características já foi aceite a sua aplicação como culturas *starter*, adjuvantes ou protetoras, visto ser um ponto de interesse na tecnologia alimentar face à sua contribuição na melhoria da segurança alimentar (Moreno *et al.*, 2006). No entanto, deve ser tido em conta o facto de que na produção de muitos produtos tradicionais a adição de culturas *starter* não é permitida, sendo que a fermentação dos mesmos é alcançada pela população microbiota inerente ao próprio alimento (Crespo e Alves, 2011).

Os enterococos com propriedades probióticas, não são incorporados como culturas *starter* nos alimentos, sendo utilizados como “suplementos alimentares” na forma de preparados farmacêuticos e como aditivos de rações alimentares (Franz *et al.*, 2011).

As espécies *E. faecalis* e *E. faecium* são aquelas que estão predominantemente associadas às vantajosas propriedades tecnológicas supracitadas (Valenzuela *et al.*, 2009; Franz *et al.*, 2011).

Apesar das características vantajosas associadas à presença de enterococos em alimentos, sabe-se também que estas bactérias podem estar envolvidas na deterioração de alimentos, podendo ser responsáveis pela danificação de produtos cárneos (Franz *et al.*, 1999; Aerestrup *et al.*, 2002; Franz *et al.*, 2011) vinho, cerveja, sumos de fruta (Aerestrup *et al.*, 2002) ou produtos lácticos (Aerestrup *et al.*, 2002; Giraffa, 2003), multiplicando-se durante o processo de fermentação (Giraffa, 2002).

Dentro dos laticínios, existem contradições em relação à influência do enterococos na produção de queijo. Apesar de em determinadas áreas Mediterrânicas estes serem considerados um dos principais responsáveis pelas características organolépticas do produto final, em alguns países Europeus são considerados como indicadores de reduzidas condições de higiene durante o processo de fabrico (Giraffa, 2002; Giraffa, 2003; Crespo e Alves, 2011). O leite usado na produção de queijo pode ser colonizado por enterococos diretamente, através de contaminação fecal humana/animal ou indiretamente, através de água contaminada, do exterior dos animais, do equipamento de ordenha ou de tanques de armazenamento de leite (Franz *et al.*, 2003; Moreno *et al.*, 2006; Crespo e Alves, 2011). Sarantinopoulos *et al.* (2001) refere que elevados níveis de contaminação por enterococos são considerados a principal causa de deterioração das propriedades sensoriais de alguns destes produtos alimentícios. Este facto está diretamente relacionado tanto com a termotolerância destas bactérias, que possibilita o aumento do seu número durante a refrigeração do leite e a sua sobrevivência após pasteurização do mesmo (Suzzi *et al.*, 2000; Giraffa, 2003), como com a sua capacidade de adaptação a diferentes substratos (Suzzi *et al.*, 2000).

No caso dos produtos cárneos, a sua frequente presença em carne de vaca, aves e carcaças de suínos, poderá ser devida ao facto de que a sua existência no trato gastrointestinal dos animais contamina a carne na fase da matança. Além de carnes cruas, os enterococos também são associados a carnes processadas, visto que a fonte de calor associada ao processamento é uma vantagem seletiva, uma vez que são das bactérias não esporuladas mais termotolerantes. Após sobrevivência ao processamento, *E. faecalis* e *E. faecium* são as espécies mais frequentemente associadas à deterioração de produtos de charcutaria (Giraffa, 2003; Moreno *et al.*, 2006).

1.2.2. Potencial de patogenicidade

O envolvimento dos enterococos em processos alimentares é também controverso, devido ao potencial risco para a saúde humana (Moreno *et al.*, 2006). Apesar destes microrganismos pertencerem ao grupo das bactérias lácticas, não são considerados organismos GRAS (*Generally Recognized As Safe*), limitando a sua aplicação como probióticos e culturas *starter* (Semedo-Lemsaddek *et al.*, 2009). Além disso, a sua deteção em águas superficiais e potáveis é o principal indicador de contaminação fecal, dentro das bactérias Gram positivas (Moreno *et al.*, 2006 in Werner, 2011).

Os enterococos são também bactérias patogénicas oportunistas isto é, são microrganismos que normalmente não causam doença em humanos saudáveis, no entanto são responsáveis por infeções em indivíduos imunocomprometidos (Semedo-Lemsaddek e Mato, 2011). Apesar de durante muitos anos estas bactérias terem sido consideradas inofensivas para o Homem (Lopes *et al.*, 2005), nos dias de hoje estão relacionados com infeções associadas aos cuidados de saúde (IACS), a doenças humanas como bacteremias, endocardites, infeções do trato urinário (Franz *et al.*, 2011), septicemia neonatal (Dukta-Malen *et al.*, 1995), infeções intra-abdominais, pélvicas e do sistema nervoso central (Moreno *et al.*, 2006), infeções de feridas cirúrgicas (Lopes *et al.*, 2005), infeções esporádicas em animais, incluindo animais destinados à alimentação (Jackson *et al.*, 2010), assim como a múltiplas

resistências a antibióticos (Moreno *et al.*, 2006). Os enterococos foram assim estabelecidos como importantes patogênicos nosocomiais (Semedo *et al.*, 2003a; López *et al.*, 2011), sendo que nos últimos anos, as infecções microbianas causadas por enterococos tem vindo a aumentar em frequência e severidade entre humanos (Semedo-Lemsaddek e Mato, 2011).

Devido a esta faceta, a utilização destes microrganismos na tecnologia alimentar tem vindo a gerar uma enorme controvérsia. Visto que os enterococos são detentores da capacidade de troca de informação genética por conjugação, Moreno *et al.* (2006) expõe o facto de que, apesar dos benefícios probióticos de algumas estirpes estarem estabelecidos, a crescente intervenção dos enterococos em doenças humanas e na múltipla resistência a antibióticos, causa enormes preocupações em relação a efetividade desta aplicação. Isto porque, existe a possibilidade de transferência de genes de resistência e de virulência no trato gastrointestinal entre os enterococos e outras bactérias. De igual modo, a aplicação de enterococos como culturas *starter*, adjuvantes ou protetoras torna-se alvo de cuidados redobrados.

As espécies *E. faecalis* e *E. faecium* voltam a ser nestas situações, as espécies predominantes sendo que, mais de 80% das infecções humanas são causadas por *E. faecalis* e das restantes, a maioria é causada por *E. faecium*. Estas são então as duas espécies mais proeminentes, visto que desempenham importantes funções tanto em doenças humanas, como em produtos fermentados e probióticos (Franz *et al.*, 2003; Valenzuela *et al.*, 2008).

A dualidade de funções destas bactérias tem levantado preocupações no que diz respeito aos riscos de propagação de potenciais estirpes virulentas e à propagação de resistência a antibióticos fora dos ambientes hospitalares, como por exemplo nos alimentos (Valenzuela *et al.*, 2008).

1.2.2.1. Resistência a antibióticos

Os enterococos são considerados *low-level pathogens*, no entanto a sua resistência intrínseca a vários antibióticos e a sua capacidade de aquisição de resistência a vários antibióticos disponíveis para tratamento clínico, levantam inúmeras preocupações (Giraffa, 2002; Vignaroli *et al.*, 2011). A resistência intrínseca (natural) é mediada por genes localizados no cromossoma, sendo esta uma característica presente em quase todas as estirpes e a resistência extrínseca (adquirida) é mediada por genes que residem em plasmídeos ou transposões (Franz *et al.*, 2003; Moreno *et al.*, 2006; Barbosa *et al.*, 2009). As resistências naturais e adquiridas, características do género *Enterococcus* podem ser observadas na Tabela 1.

Tabela 1- Resistências naturais e adquiridas a agentes antimicrobianos, por enterococos.

Resistência natural	Resistência adquirida
Muitos β -lactâmicos ^{a, b, d}	Tetraciclina ^{a, b, c, d}
Aminoglicósidos (níveis baixos) ^{a, b, c, d}	Aminoglicósidos (níveis elevados) ^{b, c, d}
Maioria das Lincosamidas ^{a, b, c, d}	Cloranfenicol ^{a, b, c, d}
Estreptograminas (<i>E. faecalis</i>) ^c	Glicopéptidos ^{a, b, c, d}
Sulfonamidas ^{b, d}	Eritromicina ^{a, b, c, d}
Vancomicina do tipo <i>van(C)</i> ^c	Clindamicina (níveis elevados) ^{b, d}

^a, Barbosa *et al.* (2009); ^b Franz *et al.* (2003); ^c, Moreno *et al.* (2006); ^d, Rathnayake *et al.* (2011).

A ampla utilização de antibióticos não só induz a seleção de bactérias patogênicas resistentes, como também exerce pressão seletiva do microbiota comensal (Aminov *et al.*, 2001). Assim, o aumento da incidência de enterococos resistentes a antibióticos poderá dever-se ao uso massivo de antibióticos tanto na agricultura (como promotor de crescimento animal) como nos sistemas de tratamento em saúde humana (Lopes *et al.*, 2005; Hwang *et al.*, 2009; Vignaroli *et al.*, 2011). Desta forma, o problema da resistência a antibióticos em enterococos não se restringe a contextos clínicos, abrangendo também outros ambientes como o trato intestinal de humanos saudáveis, animais para consumo humano e outros alimentos (Barros *et al.*, 2011). No que diz respeito aos alimentos, a sua presença já foi detetada em laticínios, produtos cárneos, alimentos prontos a comer e até mesmo em estirpes propostas como probióticas, contribuindo fortemente para a sua frequente vigilância (Giraffa, 2002; Moreno *et al.*, 2006).

Os enterococos podem atuar como reservatórios de genes que conferem resistência a antibióticos (Barros *et al.*, 2011), explicando a rápida disseminação da resistência entre estas bactérias (Aminov *et al.*, 2001). A transmissão de genes de resistência a antibióticos pode ser realizada horizontalmente por diversos processos, nomeadamente conjugação, transformação ou transdução, através de plasmídeos, transposões ou integrões (Delgado *et al.*, 2011). Em enterococos, a transferência de genes ocorre essencialmente por conjugação, embora já existam alguns relatos que sugerem que o processo de transdução pode também ser frequente (Coque *et al.*, 2011).

Os antibióticos podem induzir a morte celular (antibióticos bactericidas) ou inibir apenas o crescimento celular (antibióticos bacteriostáticos). A maioria dos antibióticos têm sido associados com (i) formação de quebras da cadeia dupla de DNA → inibidores da síntese de DNA, (ii) inibição da RNA polimerase dependente de DNA → inibidores da síntese de RNA, (iii) lesão da parede celular e perda da sua integridade estrutural → inibidores da síntese da parede celular, (iiii) ligação ribossomal, e problemas na tradução proteica → inibidores da síntese de proteínas (Kohanski *et al.*, 2010).

Inibidores da síntese de proteínas

O processo de tradução do RNA mensageiro (mRNA) ocorre em 3 etapas sequenciais (iniciação, alongamento e terminação), envolvendo o ribossoma e um conjunto de fatores citoplasmáticos acessórios. O ribossoma é composto por duas subunidades, 50S e 30S que se associam durante a fase de iniciação.

Uma ampla gama de classes de antibióticos tem como principal alvo a inibição da síntese proteica, sendo que estes podem ser divididos em duas subclasses: inibidores da subunidade 50S e inibidores da subunidade 30S do ribossoma. Macrólidos, lincosamidas, estreptograminas, fenicóis e oxazolidinonas são exemplos de inibidores da subunidade 50S, já as tetraciclina e os aminoglicósidos são exemplos de inibidores da subunidade 30S. Entre os inibidores ribossomais apenas os aminoglicósidos são agentes amplamente bactericidas, sendo que todos os outros são bacteriostáticos. No entanto, deve ser tido em conta que antibióticos tipicamente bacteriostáticos podem ser bactericidas, dependendo especificamente da espécie ou do tratamento em causa (Kohanski *et al.* 2010).

A resistência à eritromicina assim como a outros macrólidos é bastante comum em enterococos (Eliopoulos, 2008). Os dois principais mecanismos que causam resistência aos macrólidos em enterococos são, a modificação do alvo pela metilase ribossomal, que é codificada pelos genes *erm* (*erm*(A), *erm*(B) e *erm*(C)) e o sistema de bomba de efluxo, mediado pela proteína de efluxo ligada à membrana e que é codificada pelos genes *mef*(A/E) e *msr* (Zou *et al.*, 2011). Em enterococos os genes da metilase ribossomal prevalecem (Emaneini *et al.*, 2008), sendo que estes conferem resistência pela modificação do nucleótido A2058 do constituinte rRNA 23S da subunidade 50S (Werner, 2011). O gene *erm*(B) é aquele que se encontra mais frequentemente associado à resistência aos macrólidos, entre enterococos e especialmente em *E. faecalis* e *E. faecium*, sendo que os genes *erm*(A) e *erm*(C) têm uma associação apenas ocasional (Werner, 2011). Este gene pode ser encontrado em várias transposões como por exemplo, Tn916/1545 (Graham *et al.*, 2009; Radhouani *et al.*, 2011) e Tn917, que têm sido detetados tanto em plasmídeos como em cromossomas (Eliopoulos, 2008).

A quinupristina-dalfopristina é uma combinação de antibióticos, constituída por derivados semi-sintéticos de antibióticos naturais pertencentes à classe das estreptograminas B e A respetivamente (Eliopoulos, 2008). Este composto é bastante útil no tratamento de infeções causadas por *E. faecium* resistentes à vancomicina (Soltani *et al.*, 2000; Butaye *et al.*, 2003; Hershberger *et al.*, 2004). A combinação dos componentes A e B atua por ligação ao rRNA 23S da subunidade 50S, formando um complexo estável que inibe irreversivelmente a síntese proteica, resultando na morte bacteriana. A resistência a estes agentes antimicrobianos é alcançada através de vários mecanismos, que incluem a inativação do antibiótico, bombas de efluxo mediadas por proteínas dependentes de ATP e a modificação do alvo. Em enterococos, esta é mediada pela inativação do antibiótico, através da produção de acetiltransferases que inativam as estreptograminas (Butaye *et al.*, 2003). Relativamente à espécie *E. faecalis*, esta é naturalmente resistente à combinação quinupristina-dalfopristina (Soltani *et al.*, 2000; Hershberger *et al.*, 2004), devido à expressão do gene *lsa* por parte destes organismos. O seu mecanismo de resistência não está completamente elucidado mas pensa-se que seja através do efluxo ativo do antibiótico (Hershberger *et al.*, 2004).

O cloranfenicol pertence à classe dos fenicóis. Segundo Eliopoulos (2008), este antibiótico tem vindo a ser empregue com algum sucesso no tratamento de infeções da corrente sanguínea, causadas por enterococos. A resistência ao cloranfenicol geralmente é devida à síntese da enzima cloranfenicol acetiltransferase (CAT) que inativa o antibiótico (Trieu-Cuot *et al.*, 1993). Em enterococos as acetiltransferases codificadas pelos genes *cat* podem provir tanto de plasmídeos como de cromossomas (Eliopoulos, 2008). Tendo como base, dados de sequenciação e hibridações DNA-DNA, pelo menos sete classes distintas de genes *cat* podem ser definidos: (I) *cat-86*, (II) *cat*_{pC194}, (III) *cat*_{pIP501}, *cat*_{pC221}, *cat*_{pUB112}, *cat*_{pSCS1} e *cat*_{pSCS6}, (IV) *cat*_{pC223}, *cat*_{pSCS5} e *cat*_{pSCS7}, (V) *catD* e *catP*, (VI) *catQ* e (VII) *catB*, já tendo sido detetado em enterococos os genes *cat*_{pIP501}, *cat*_{pC194}, *cat*_{pSCS7} (Trieu-Cuot *et al.*, 1993).

Dentro da classe das oxazolidinonas, apenas o linezolid foi aprovado para uso clínico. É frequentemente empregue em tratamento de infeções hospitalares causadas por estirpes resistentes

à vancomicina, que tipicamente são resistentes às penicilinas, assim como aos glicopéptidos. Apesar da resistência ao linezolid em estirpes de enterococos ser rara, estudos revelam a existência de estirpes clínicas resistentes a este antibiótico (Eliopoulos, 2008). Em estudos laboratoriais, a resistência ao linezolid em *E. faecalis* e em *E. faecium* tem sido associada a mutações pontuais no rRNA 23S (Aleksun *et al.*, 2007), sendo que o nível de resistência depende do número de alelos mutados por genoma (Werner, 2011).

Desde a introdução da tetraciclina em 1950, que o seu uso se tornou muito frequente, na medicina humana e veterinária e como promotor de crescimento na indústria animal. Presentemente, a resistência à tetraciclina encontra-se disseminada em todos os géneros de bactérias, pensando-se que poderá estar relacionada com o uso desmedido deste agente antimicrobiano. A tetraciclina inibe a síntese proteica em bactérias Gram positivas e negativas, pela inibição da ligação das moléculas de aminoacil-tRNA à subunidade 30S do ribossoma, evitando assim o crescimento da cadeia peptídica (Aminov *et al.*, 2001). A resistência a este agente antimicrobiano é mediada pela aquisição de diferentes genes *tet* que codificam proteínas de proteção ribossomal [*tet*(O), *tet*(M), *tet*(S)] ou bombas de efluxo [*tet*(K), *tet*(L)] (Werner, 2011). O gene *tet*(M) é aquele que habitualmente está associado a esta resistência em enterococos, encontrando-se frequentemente localizado em transposões conjugativos do tipo Tn916/Tn1545 ou Tn5397, que existem numa ampla gama de hospedeiros (Agero *et al.*, 2005), devido à sua baixa especificidade de integração (Coque *et al.*, 2011).

A classe dos aminoglicósidos engloba agentes antimicrobianos como a estreptomicina e a gentamicina. Após atingirem o citoplasma bacteriano, os aminoglicósidos ligam-se ao componente 16S da subunidade ribossomal 30S, promovendo erros de tradução através da incorporação de aminoácidos inapropriados na cadeia peptídica, o que contribui para a morte celular (Kohanski *et al.*, 2010). Além disso, os aminoglicósidos podem também afetar a composição da membrana, através da incorporação de proteínas membranares mal traduzidas na membrana citoplasmática. Desta forma a permeabilidade celular aumenta, facilitando o acesso do antibiótico e conseqüentemente, a concentração deste no interior da célula aumenta (Davis *et al.*, 1986). A aquisição de resistência a níveis elevados de gentamicina e estreptomicina, em *E. faecalis* e *E. faecium*, é mediada pela produção de enzimas modificadoras de aminoglicósidos (AMEs) que inibem a ligação destes ao ribossoma (Werner, 2011).

Os nitrofuranos são antibióticos sintéticos de largo espectro. Em 1995, a sua utilização na pecuária como promotores de crescimento foi completamente banida na União Europeia. Este facto deveu-se a preocupações acerca da carcinogenicidade dos resíduos do antibiótico e dos potenciais efeitos nocivos para a saúde humana. No entanto, a sua utilização é permitida em tratamentos clínicos de humanos e animais. Como exemplo disso mesmo, sabe-se que a nitrofurantoína é normalmente usada no tratamento de infeções do trato urinário (Vass *et al.*, 2008). A suscetibilidade bacteriana a este antibiótico está associada à presença de nitroreductases que convertem a nitrofurantoína em intermediários electrofílicos altamente reativos. Estes intermediários mostraram ser capazes de reagir com proteínas bacterianas ribossomais não específicas, causando inibição completa da síntese de proteínas (McOsker e Fitzpatrick, 1994).

Inibidores da síntese da parede

Glicopéptidos, β -lactâmicos e polipéptidos são exemplos de classes de antibióticos cuja inibição da parede é o principal alvo de ação.

Os glicopéptidos pertencem à classe de antimicrobianos de máxima importância em tratamento clínico contra estirpes de enterococos multirresistentes ou em caso de alergia ou ineficácia de outros antibióticos, como a ampicilina e a penicilina. Esta classe está associada a antibióticos de última linha (última opção terapêutica) no tratamento de patogêneos nosocomiais. Por esta razão, novos agentes antimicrobianos estão a ser rapidamente avaliados como candidatos à substituição da vancomicina, sendo que os mais promissores são os glicopéptidos semissintéticos, a quinupristina-dalfopristina, o linezolid e a daptomicina (Giraffa, 2002).

Existem evidências de que a resistência à vancomicina se terá manifestado através do uso do glicopéptido avoparcina na produção animal, na União Europeia (Barbosa *et al.*, 2009). No entanto, o facto de a resistência à vancomicina ser comum não só em animais alimentados com avoparcina mas também em humanos fora do ambiente hospitalar, torna clara a possibilidade de ocorrência ou de propagação clonal de estirpes resistentes ou de transferência de genes de resistência entre bactérias animais e humanas (Giraffa, 2002).

Os glicopéptidos como a vancomicina e a teicoplanina bloqueiam a incorporação das subunidades de ácido N-acetil-murâmico e N-acetil-glicosamina no peptidoglicano, pela sua ligação a estas moléculas (Werner, 2011). A resistência aos glicopéptidos é alcançada pela aquisição de genes *van* que são responsáveis pela produção de peptidoglicano modificado, cujos precursores contêm D-ala-D-lactato ou D-ala-D-serina em vez de D-ala-D-ala, inibindo assim a ligação dos agentes antimicrobianos (Rossolini *et al.*, 2010). Até à data diferentes genótipos de resistência aos glicopéptidos foram descritos em diversas espécies de enterococos. Os genótipos *van(A)* e *van(B)* são os de maior importância clínica assim como os mais prevalentes (Moreno *et al.*, 2006; Werner, 2011). O gene *van(A)* codifica para proteínas que conferem resistência a níveis elevados de vancomicina e teicoplanina e já foi detetado em várias espécies de enterococos (Dukta-Malen *et al.*, 1995; Semedo-Lemsaddek *et al.*, 2009). Este gene é parte integrante do transposão Tn1546 ou seus derivados, que normalmente estão localizados em plasmídeos (Werner, 2011). No caso do gene *van(B)*, este codifica para proteínas que conferem resistência a várias concentrações de vancomicina mas não à teicoplanina, tendo sido descrito nas espécies *E. faecalis* e *E. faecium* (Dukta-Malen *et al.*, 1995; Semedo-Lemsaddek *et al.*, 2009). Este gene faz parte do transposão Tn1547 ou do transposão conjugativo Tn1549/5382, que estão principalmente localizados em cromossomas e com menor frequência em plasmídeos (Werner, 2011). O gene *van(C)* é específico de espécies móveis de enterococos como *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*. (Semedo-Lemsaddek *et al.*, 2009).

Os β -lactâmicos bloqueiam a transpeptidação do peptidoglicano, pela inibição da reação de formação da ligação peptídica, que é catalisada pelas proteínas de ligação à penicilina -PBPs ou *penicillin binding proteins*-. Esta inibição é atingida, devido ao facto dos β -lactâmicos serem análogos do dipéptido terminal D-alanil-D-alanina do peptidoglicano, atuando assim como substrato das PBPs durante a fase de transpeptidação (Kohanski *et al.*, 2010). A resistência a estes agentes em

enterococos, está associada à modificação e/ou superprodução de determinadas PBPs, nomeadamente PBP4 em *E. faecalis* e PBP5 em *E. faecium* (Rossolini *et al.*, 2010). Apesar de rara, a produção de β -lactamases também está associada aos mecanismos de resistência aos β -lactâmicos em enterococos (Murray, 1992).

A bacitracina é um polipéptido antimicrobiano produzido pelo organismo *Bacillus licheniformis* (Manson *et al.*, 2004; Matos *et al.*, 2009) e por algumas estirpes de *Bacillus subtilis* (Matos *et al.*, 2009). Segundo Butaye *et al.* (2003), a bacitracina é usada em aplicações tópicas na medicina humana e veterinária. Apesar de a sua utilização como promotor de crescimento ter sido banida da Europa desde 1999, existem relatos recentes da deteção de fenótipos de resistência à bacitracina (Matos *et al.*, 2009). Este agente antimicrobiano tem como principal função a inibição da síntese da parede celular. A bacitracina, mediada por um ião metálico, forma um complexo com o lípido undecaprenol pirofosfato (UPP) que é um transportador dos precursores do peptidoglicano da membrana citoplasmática para a parede celular. A ligação ao UPP inibe a sua desfosforilação ou seja, impede a sua regeneração a undecaprenol monofosfato (UP), inibindo a síntese da parede celular (Matos *et al.*, 2009). Visto que os mecanismos de resistência à bacitracina em *Enterococcus* não são completamente claros, adicionalmente à superprodução da enzima *undecaprenol kinase* como mecanismo de resistência, Manson *et al.* (2004) propôs um sistema de transporte do tipo ABC envolvido nessa mesma resistência em *E. faecalis*. O sistema de transporte ABC permite o efluxo da bacitracina e a enzima *undecaprenol kinase* permite a desfosforilação de UPP, superando a ligação bacitracina-UPP e aumentando a resistência do organismo a este composto antimicrobiano. Ambos os mecanismos são codificados pelo operão *bcrABD*, que é controlado pelo gene regulador *bcrR*, tal como o evidenciado pela Figura 3 (Manson *et al.*, 2004).

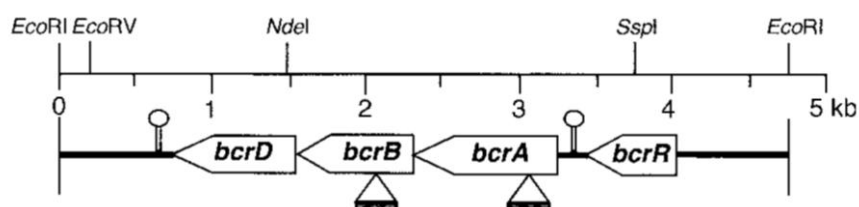


Figura 3- Operão envolvido na resistência à bacitracina (Manson *et al.*, 2004).

Os genes *bcr(A)* e *bcr(B)*, codificam BcrA (domínio de ligação do ATP) e BcrB (domínio transmembranar) respetivamente, sendo que estes constituem um transportador do tipo ABC, cuja função é essencial para a resistência à bacitracina. Os genes *bcr(A)* e *bcr(B)* e *bcr(D)* são transcritos como uma mensagem policistronica que é induzida pelo aumento da concentração de bacitracina. O gene *bcrR* é expresso constitutivamente e a sua deleção resulta num fenótipo sensível à bacitracina (Manson *et al.*, 2004).

Inibidores da síntese de DNA

As quinolonas e as sulfonamidas são exemplos de classes de agentes antimicrobianos cujo principal alvo de ação passa pela inibição da síntese de DNA.

Relativamente às quinolonas, estas exibem um largo espectro de ação (Drlica *et al.*, 2008). Hoje em dia, quinolonas de 1ª geração como o ácido nalidíxico raramente são usadas, devido à sua toxicidade. As quinolonas sintéticas (fluoroquinolonas) de segunda (norfloxacin, ciprofloxacina), terceira (levofloxacina) e quarta (gemifloxacina) geração são classificadas com base na sua estrutura química e através das diferenças qualitativas dos seus mecanismos de ação (Kohanski *et al.*, 2010). Esta classe interfere na manutenção da estrutura cromossomal através do aprisionamento da topoisomerase II (DNA girase) e da topoisomerase IV na fase de clivagem do DNA, inibindo o re-enrolamento da cadeia cromossómica e consequentemente afetando mecanismos como a replicação do DNA e a divisão celular (Drlica *et al.*, 2008). Apesar de ambas as topoisomerases apresentarem semelhanças relativamente às suas funções gerais, a sua suscetibilidade às quinolonas varia consoante a espécie bacteriana (Kohanski *et al.*, 2010). Pensa-se que mutações do gene *gyrA*, que codifica a topoisomerase II e no gene *parC*, que codifica a topoisomerase IV, sistemas de efluxo, modificação enzimática e mecanismos mediado por plasmídeos, contribuam para a resistência às fluoroquinolonas em enterococos (Yasufuku *et al.*, 2011).

As sulfonamidas foram a primeira classe antimicrobiana a ser descoberta, em 1932. Pensa-se que sulfonamidas, como por exemplo o sulfametoxazol, combinadas com o antibiótico trimetoprim resultem em efeitos sinérgicos (Huovinen, 2001). Ambos afetam a síntese de ácido fólico, prejudicando consequentemente a biossíntese de nucleótidos e a replicação de DNA (Kohanski *et al.*, 2010). Especificamente, as sulfonamidas inibem a enzima sintetase dihidropteroato (DHPS) e o trimetoprim inibe a enzima dihidrofolato redutase (DHFR) (Huovinen, 2001). O trimetoprim-sulfametoxazol não é um agente bactericida contra enterococos *in vitro*, tendo-se demonstrado a capacidade destas bactérias em tornar-se resistentes pela incorporação de folatos exógenos. Desta forma, o seu papel como opção terapêutica para infeções provocadas por enterococos é controverso, havendo relatos de falhas clínicas (Wisell *et al.*, 2008).

Inibidores da síntese de RNA

A inibição da síntese de RNA é induzida por antibióticos bactericidas semi-sintéticos como a rifampicina, que pertence à classe das rifamicinas. Estas desencadeiam, tal como aqueles que inibem a síntese de DNA, efeitos catastróficos no metabolismo do ácido nucleico procariota, sendo um meio poderoso de indução da morte celular bacteriana (Floss e Yu, 2005). As rifamicinas inibem o processo de transcrição de DNA através de uma ligação estável e de elevada afinidade com a subunidade β (codificada pelo gene *rpoB*) da RNA polimerase. Desta forma, impedem a inicialização da cadeia nascente de RNA, visto que a subunidade β localiza-se no canal que é formado pelo complexo DNA-RNA polimerase, a partir do qual emergem as cadeias de RNA sintetizadas. Apesar das rifamicinas serem consideradas apenas bacteriostáticas para bactérias Gram negativas, no caso das Gram positivas são bactericidas, sendo que esta diferença está relacionada com a absorção do agente

antimicrobiano e não com a sua afinidade para a subunidade β da RNA polimerase (Kohanski *et al.*, 2010). A resistência à rifampicina por enterococos é induzida por mutações no gene *rpoB* (Enne *et al.*, 2004).

1.2.2.2. Fatores de virulência

A resistência a antibióticos em enterococos não é suficiente para explicar a virulência destas bactérias (Franz *et al.*, 2001; Moreno *et al.*, 2006). No passado considerava-se que os enterococos possuíam características de virulência subtile, que eram difíceis de identificar. No entanto, foram desenvolvidos progressos na identificação de fatores de virulência de isolados clínicos, sendo que cada um deles pode estar associado a uma ou a mais fases da infecção (Franz *et al.*, 2003). Os fatores de virulência em enterococos incluem fatores associados com a colonização e invasão dos tecidos do hospedeiro, assim como resistência específica e não específica aos mecanismos de defesa do hospedeiro. Além disso, estirpes virulentas podem provocar mudanças patológicas diretamente, por produção de toxinas ou indiretamente, por inflamação (Franz *et al.*, 2011). Certas características do hospedeiro humano possuem um importante papel no que diz respeito à sua suscetibilidade ou resistência à infecção, incluindo *stress* físico e emocional, idade, higiene pessoal e estado geral de saúde e nutricional.

Apesar da descrição de vários fatores de virulência no género *Enterococcus*, principalmente na espécie *E. faecalis*, e apesar de ser considerado que quando maior for o número de fatores de virulência presentes, mais severa será a doença causada, nenhum fator é considerado essencial ou suficiente para causar doença e nenhum foi considerado como sendo ubíquo de isolados clínicos, nem completamente ausente entre estirpes alimentares. É ainda importante salientar que a associação entre o consumo de alimentos contendo enterococos e o desenvolvimento de doença não está completamente estabelecida (Semedo-Lemsaddek e Matos, 2011).

Da mesma forma que estes microrganismos têm capacidade em adquirir resistência a antibióticos por elementos genéticos móveis, fatores de virulência como a produção de citolisina e a capacidade de adesão também são conhecidos por serem transmitidos por mecanismos de transferência génica (Eaton e Gasson, 2001).

Adesinas

A aderência aos tecidos do hospedeiro é um passo crucial no processo de infecção. Visto que as adesinas promovem a ligação aos recetores das células hospedeiras, é espectável que estas possuam um importante papel no estabelecimento e manutenção da colonização (Semedo *et al.*, 2003a; Carlos *et al.*, 2010). Sabe-se também, que além de promoverem a ligação a componentes da matriz extracelular, a células eucarióticas e a linhas celulares humanas, as adesinas também promovem a ligação a componentes abióticos (Semedo-Lemsaddek e Mato, 2011).

A substância de agregação (SA) é a adesina mais bem estudada em enterococos (Semedo *et al.*, 2003a). A expressão desta proteína de superfície é induzida por feromonas (Semedo *et al.*, 2003a), estando envolvida na formação de agregados entre células dadoras de plasmídeos e células

recetoras, através de um recetor complementar, o que conseqüentemente facilita a transferência de plasmídeos conjugativos. Adicionalmente, medeia a aderência a diferentes células do hospedeiro (Semedo-Lemsaddek e Mato, 2011), atuando como fator de virulência durante o processo infeção do hospedeiro (Semedo *et al.*, 2003a). Desta forma, SA contribui tanto para a disseminação de fatores de virulência e de resistência a antimicrobianos codificados por plasmídeos, como para a colonização de células eucarióticas e internalização, resultando na invasão dos tecidos. Esta adesina é codificada pelo gene *agg*, que se localiza ou em plasmídeos que respondem a feromonas sexuais de enterococos, tais como pAD1, pPD1 e pCF10 ou em ilhas de patogenicidade cromossômicas (Semedo-Lemsaddek e Mato, 2011).

Outro exemplo de adesina é a proteína de superfície Esp -*enterococcal surface protein*-, que foi inicialmente identificada e caracterizada por Shankar *et al.* (1999), em isolados clínicos de *E. faecalis*. É uma proteína extracelular de elevada massa molecular, codificada cromossomicamente pelo gene *esp* (Shankar *et al.*, 1999). O seu verdadeiro papel na virulência em enterococos ainda está sob análise. No entanto, a elevada prevalência do gene *esp* em isolados clínicos, evidencia indiretamente que este contribui para a patogenicidade de enterococos e para a sua transmissão nosocomial. Além disso, vários estudos sugerem que Esp contribui para a colonização e persistência de enterococos nas células epiteliais do trato urinário, na matriz extracelular do hospedeiro humano e na formação de biofilmes em superfícies abióticas. (Semedo-Lemsaddek e Mato, 2011).

Da análise do soro de doentes com endocardite provocada por *E. faecalis*, foi identificado um antigénio semelhante a adesinas, designado por EfaA (antigénio A de *E. faecalis*) (Lowe *et al.*, 1995). Estudos em modelos animais (ratos) sugerem que EfaA seja um fator de virulência, estando envolvido na infeção de tecidos de hospedeiros humanos (Low *et al.*, 2003). Além disso, presume-se que também estejam envolvidos na adesão a superfícies bióticas e abióticas (Valenzuela *et al.*, 2008). Genes que codificam adesinas semelhantes a EfaA foram detetados em outras estirpes de *E. faecalis* e *E. faecium*, sendo estes *efaA_{fs}* e *efaA_{fm}* respetivamente (Semedo *et al.*, 2003a). Eaton e Gasson (2001) referem que, apesar da influência na patogenicidade em modelos animais do gene *efaA_{fs}* já ter sido demonstrada, o papel de *efaA_{fm}* ainda não é claro.

Fatores secretados

Semedo-Lemsaddek e Mato (2011) referem que os enterococos, com o intuito de se disseminarem no interior do hospedeiro, produzem exoproteases e hemolisinas, as quais além de causarem danos nos tecidos, podem hidrolisar componentes do sistema imunitário, como proteínas do sistema de complemento e imunoglobulinas, facilitando assim a progressão da infeção.

O primeiro fator de virulência a ser descrito no género *Enterococcus* foi detetado devido à capacidade hemolítica destas bactérias, sendo que nos dias de hoje essa ação é atribuída à citolisina. Esta hemolisina é comumente denominada como citolisina devido à ampla gama de células alvo, que inclui tanto células eucariotas como procaríotas (Semedo *et al.*, 2003b). Este é o fator de virulência melhor caracterizado nestas bactérias, sendo considerado como uma proteína-toxina que causa reações β-hemolíticas bactericidas em eritrócitos de humanos, coelhos, bovinos e cavalos (Semedo-

Lemsaddek e Mato 2011). A atividade da citolisina está associada ao aumento da virulência de enterococos em modelos de infecção e em estudos epidemiológicos, estando relacionada com a mortalidade dos pacientes. Esta é codificada ou por plasmídeos que respondem a feromonas, como o pAD1, ou por ilhas de patogenicidade cromossômicas (Coburn e Gilmore, 2003; Poeta *et al.*, 2006a). O operão que regula a produção de citolisina e que está representado na Figura 4, é codificado por cinco produtos gênicos que segundo Semedo *et al.* (2003b), são necessários e suficientes para a expressão deste fator de virulência.

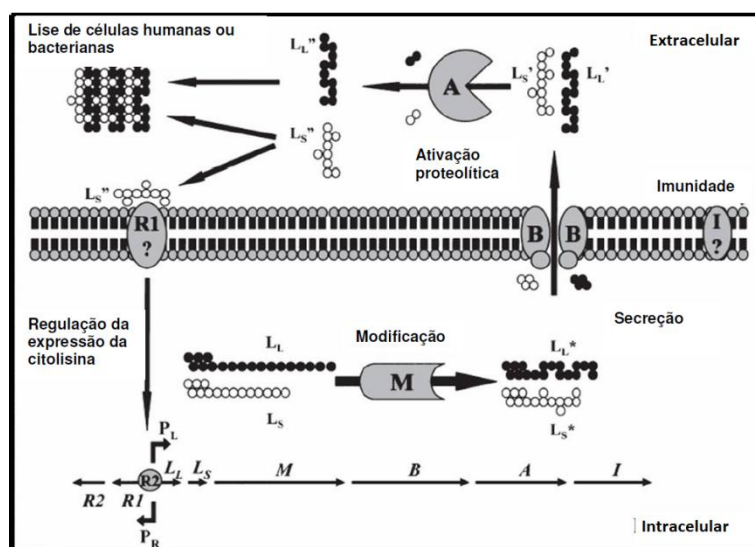


Figura 4- Operão envolvido na expressão da citolisina em *E. faecalis* (adaptado de Coburn e Gilmore, 2003).

O modelo para a expressão e ativação da citolisina inclui duas subunidades estruturais de citolisina, que são codificadas pelos genes *cyiL_L* e *cyiL_S*. Estas são modificadas pos-traducionalmente no interior da célula, pelo produto do gene *cyiM*. Posteriormente, são transportadas para o exterior por um transportador ABC, codificado pelo gene *cyiB*. Após externalização, os componentes precursores da citolisina são ativados pelo produto do gene *cyiA* (ativador extracelular) (Semedo T. *et al.*, 2003b). Apesar de vários estudos mostrarem claramente que a citolisina apresenta um papel importante na virulência de enterococos, o preciso mecanismo que contribui para a infecção ainda não foi determinado (Semedo-Lemsaddek e Mato, 2011).

Outro dos fatores de virulência mais bem estudado em enterococos é a gelatinase. Esta é caracterizada como sendo uma metaloendopeptidase extracelular capaz de hidrolisar gelatina, colagénio, caseína e outros pequenos péptidos biologicamente ativos (Semedo *et al.*, 2003a; Lindenstrauß *et al.*, 2011), sugerindo a sua participação na iniciação e propagação do processo inflamatório (Barbosa *et al.*, 2010). O gene *gelE* codifica a gelatinase e está localizado junto ao gene *sprE*, que codifica uma endopeptidase de serina. Tal como o evidenciado pela Figura 5, ambos os genes localizam-se a jusante do locus *fsr*, que é composto pelos genes *fsrA*, *fsrB*, e *fsrC* (Poeta *et al.*, 2006a). Estes regulam positivamente a expressão tanto de *gelE* como de *sprE* e são necessários

para a atividade das proteases, gelatinase (GelE) e endopeptidase de serina (SprE) (Franz *et al.*, 2003; Semedo-Lemsaddek e Mato, 2011).

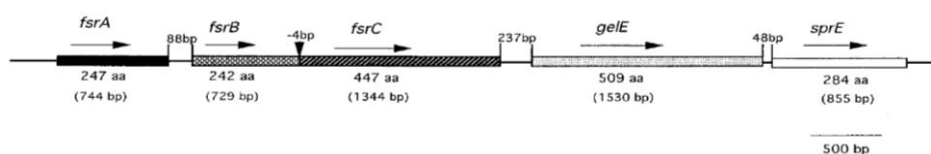


Figura 5- Representação esquemática dos genes relacionados com a produção da gelatinase (Qin *et al.*, 2000).

A contribuição de outros fatores secretados como lipases e desoxirribonuclease (DNAse), em infecções causados por enterococos continua a necessitar de ser esclarecida (Semedo *et al.*, 2003a). No entanto, no que diz respeito à atividade lipolítica, uma variedade de lipases já foi descrita, sendo que o papel mais proeminente das lipases extracelulares passa pela digestão de lípidos celulares do hospedeiro para a obtenção de nutrientes, resultado na adesão e invasão do mesmo (Furumura *et al.*, 2006). Quando à DNAse, esta permite a degradação de estruturas extracelulares compostas por cromatina, excretadas pelos neutrófilos, facilitando a evasão ao sistema imunitário do hospedeiro (Brinkmann e Zychlinsky, 2007).

Feromonas Sexuais

Sabe-se que o processo de conjugação é o mais importante mecanismo de transferência horizontal de genes em cocos Gram positivos, como os enterococos, sendo este facilitado pela produção de feromonas sexuais (Dunny *et al.*, 1995).

Vários autores consideram que as feromonas sexuais (pequenos polipéptidos secretados), apesar de favorecerem a disseminação de caracteres de virulência e de resistência a antibióticos, não podem ser consideradas por si só como fatores de virulência. Contudo, segundo Eaton e Gasson (2000), as feromonas sexuais podem ser consideradas fatores de virulência visto que, além de codificarem genes cujos produtos estão envolvidos nas fases iniciais dos processos de conjugação, estão também envolvidas no desenvolvimento de uma resposta inflamatória. Além disso, são também quimiotáticas *in vitro* para os leucócitos polimorfonucleares de humanos e ratos.

O sistema das feromonas sexuais foi descoberto pela observação de uma reação de aglutinação em estirpes de *E. faecalis* durante a transferência conjugativa de plasmídeos. Verificou-se que apenas um tipo especial de plasmídeos em *E. faecalis*, denominados plasmídeos que respondem a feromonas, são transferidos por via deste mecanismo. De que forma se processa este fenómeno? Estirpes recetoras que podem ser, ou não, livres de plasmídeos secretam feromonas sexuais codificadas pelo cromossoma, indicando que estas não possuem os plasmídeos que respondem às respetivas feromonas excretadas. Estirpes dadoras são capazes de detetar a presença de feromonas sexuais e como resposta sintetizam a proteína de agregação. Esta adesina vai permitir o contacto físico entre as estirpes dadoras e recetoras levando à transferência conjugativa do plasmídeo que responde a feromonas. Após a transferência do plasmídeo a síntese da adesina cessa, levando ao desaparecimento dos aglomerados bacterianos (Wirth, 1994). Deve ainda ser enfatizado o facto de

que quando um plasmídeo específico é adquirido pela célula recetora, esta deixa de excretar a feromona correspondente, excretando apenas outras feromonas, cujos plasmídeos que respondem a feromonas ainda não tenham sido adquiridos (Clewell e Weaver, 1989; Wirth, 1994).

Os plasmídeos que respondem a feromonas são comumente encontrados na espécie *E. faecalis* e eventualmente na espécie *E. faecium*. Mais de vinte plasmídeos de feromonas já foram identificados, sendo que pAD1, pPD1 e pCF10 são os mais estudados. Estes plasmídeos podem também codificar fatores de virulência como a citolisina e/ou elementos de resistência a antibióticos como as tetraciclina, os glicopéptidos e os aminoglicósidos (Coque *et al.*, 2011).

1.3. Objetivos

Visto que os enterococos são considerados patogénicos emergentes, é posta em causa a sua presença e uso seguro em alimentos. A dualidade de funções dos enterococos aumenta a preocupação no que diz respeito aos riscos de disseminação de estirpes potencialmente virulentas e resistentes a múltiplos antibióticos, fora de ambientes hospitalares e especialmente em géneros alimentícios ou superfícies com que estes contactam. Além disso, o facto de estas bactérias serem caracterizadas como tendo capacidade em se disseminar do ambiente para os alimentos, dos alimentos para o trato gastrointestinal de humanos/animais e de ambientes hospitalares para o corpo humano, enfatiza a crescente preocupação a elas associadas.

Face a esta problemática, o desenvolver do presente trabalho teve como objetivo responder a questões como: De que forma estão os enterococos disseminados em ambientes de produção/comercialização de alimentos? Serão os enterococos isolados desses ambientes genomicamente diferentes? São suscetíveis a antibióticos, especialmente aos de relevância clínica? Possuem fatores de virulência? Poderão ser considerados um risco para a saúde pública da população em geral?

Para tentar responder a estas e outras questões, procedeu-se à recolha de amostras alimentares, de águas e de superfícies numa queijaria, num matadouro de suínos e num hipermercado. Após identificação ao nível de género/espécie e tipificação genómica, realizou-se a análise da suscetibilidade a 19 agentes antimicrobianos (pertencentes a 13 classes distintas) e à avaliação da presença de fatores de virulência (adesinas, fatores secretados e feromonas sexuais).

O presente estudo torna-se importante visto que, apesar de nunca se ter provado a relação direta entre a ingestão de alimentos contaminados por enterococos e o desenvolvimento de uma infeção, o controlo de estirpes patogénicas no mercado alimentar continua a ser de extrema importância, principalmente para consumidores pertencentes a grupos de risco (e.g. crianças, idosos, pessoas com elevado risco para infeções oportunistas).

2. Materiais e Métodos

2.1. Recolha/processamento de amostras e isolamento

Procedeu-se à recolha de amostras alimentares líquidas e sólidas, de águas e de superfícies, em 3 locais distintos, nomeadamente numa queijaria, num matadouro de suínos e num hipermercado (antes e após a higienização do mesmo).

O processamento de todas as amostras foi realizado nas 24 h seguintes à recolha, tendo sido aplicadas, com pequenas alterações, as normas NP2079 (Anónimo, 1989) para as amostras líquidas e sólidas, ISO 7899-2 (Anónimo, 2000) para as amostras de água e ISO 18593 (Anónimo, 2004) para as amostras de superfície.

Amostras Sólidas e Líquidas

A cada amostra alimentar sólida e líquida, 25 g e 25 mL respetivamente, adicionaram-se 225 mL de água peptonada tamponada (APT) (Scharlau, Barcelone, Spain).

No caso das amostras de água o seu processamento passou pela aplicação do método das membranas filtrantes. Para tal, foram filtrados sob vácuo 250 mL de cada uma das amostras, recorrendo a membranas com porosidade de 0,45 µm (Scharlau, Barcelone, Spain).

Amostras de superfície

Utilizando delimitador estéril amostrou-se uma área de 100 cm² por passagem da zaragatoa em todas as direções. Posteriormente a zaragatoa foi colocada num saco estéril contendo 250 mL de APT.

Com exceção das amostras de água, em que as membranas foram diretamente colocadas sob o meio seletivo, todas as amostras foram processadas utilizando um homogeneizador peristáltico (Stomacher Lab-Blender 400). Seguidamente foram realizadas diluições decimais, as quais foram aplicadas (0,1 mL), pelo método de espalhamento, em meio seletivo Slanetz and Bartley Agar (SBA) (Scharlau, Barcelone, Spain) e incubadas a 42 °C entre 24 a 48 h. Para os isolamentos utilizou-se, além de meio SBA, meio SBA suplementado com vancomicina (10 µg/mL).

Em amostras a partir das quais não se verificou, em qualquer diluição, crescimento característico após 24 h de incubação, as respetivas soluções-mãe, enriquecidas a 37 °C durante essas mesmas 24 h, foram inoculadas em novas placas.

Após incubação e observação do crescimento, foram selecionadas entre 4 a 5 colónias características, as quais foram submetidas a 5 passos de purificação em meio seletivo.

2.2. Identificação ao nível de género

Métodos Fenotípicos

Para identificação presuntiva ao nível de género foram realizados os testes de catalase e oxidase, coloração Gram e avaliação da capacidade de hidrólise da esculina em meio BÍlis Esculina Azida Agar (Scharlau, Barcelone, Spain). Os isolados hidrólise da esculina positivos, Gram positivos e catalase/oxidase negativos, foram conservados em duplicado tanto em meio Brain Heart Infusion (BHI) (Scharlau, Barcelone, Spain) com 20% (v/v) de glicerol a -80 °C, como em tubos com meio BHI pelo método de picada, para uso rotineiro (mantidos a 4 °C).

Métodos Moleculares

Para confirmação da identificação ao nível de género, procedeu-se à extração de DNA pelo método de fervura na presença de Chelex[®] 100 (10% de Chelex em TE), tendo-se posteriormente realizado uma reação de amplificação por PCR (Ent-PCR) adaptada de Ke *et al.* (1999). Os primers pA e 907r (primers universais dirigidos para o rRNA 16S) foram usados como controlos internos da reação. Ver condições de reação na Tabela 1 e informações adicionais no Anexo A.

Tabela 1- Primers e condições de reação de PCR usados na identificação ao nível de género.

Primers	Concentração de cada Primer (μM) (NZYTech, Lda, Lisboa, Portugal)	Concentração de Reagentes (NZYTech, Lda, Lisboa, Portugal)	Condições de PCR (Termociclador Doppio, VWR, Radnor, Pennsylvania, USA)
Ent1 Ent2	0,5	tampão 1X 2 mM MgCl ₂	94 °C (3 min) 94 °C (1 min) 48 °C (1 min)
pA 907r	0,2	0,2 mM de cada dNTP 1 U de Taq polimerase	72 °C (1 min) 72 °C (5 min) 4 °C (infinito)

Após amplificação, 8 μL de cada produto de PCR juntamente com 4,5 μL de uma mistura de GelRed (iNtRON Biotechnology, Inc, Korea) e azul de bromofenol (2:1), foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% em TBE 0.5X a 110 V durante aproximadamente 1 h.

Um marcador de massa molecular (1 Kb Plus, Invitrogen, Life Technologies) foi adicionado em dois locais opostos, de todos os géis. O registo dos resultados foi feito fotograficamente pelo sistema de imagem ImageMaster (PharmaciaBiotech, GE Healthcare, UK). Deve-se salientar que este procedimento foi seguido para todos os géis de agarose realizados ao longo do trabalho experimental.

2.3. Análise da diversidade

A tipificação dos isolados para posterior análise da diversidade foi realizada utilizando a técnica de PCR-fingerprinting. Tal como explicitado pela Tabela 2, foram usados em reações independentes os primers OPC19 e (GTG)₅. Para informação mais detalhada ver Anexo A.

Tabela 2-Primers e condições de reação de PCR usados na tipificação.

Reação	Primers	Concentração de Reagentes (NZYTech, Lda, Lisboa, Portugal)	Condições de PCR (Termociclador Doppio, VWR, Radnor, Pennsylvania, USA)
1	OPC19	tampão 1X 3 mM MgCl ₂ 2 μM de primer	94 °C (3 min) 40 °C (1 min) 72 °C (2 min) 94 °C (45 s) } 40 ciclos
2	(GTG) ₅	0,2 mM de cada dNTP 1 U de Taq polimerase	72 °C (5 min) 4 °C (infinito)

Após amplificação, 12 μL de cada produto de PCR juntamente com 4,5 μL de uma mistura de GelRed (iNtRON Biotechnology, Inc, Korea) e azul de bromofenol (2:1), foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1.2% em TBE 0,5X a 110 V durante aproximadamente 3 h.

A análise dos perfis de bandas obtidos foi efetuada no programa BioNumerics (versão 6.6.2, Applied Maths, Kortrijk, Belgium), ou seja, todos os perfis foram normalizados, foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson para análise de semelhança entre os perfis obtidos e foram construídos dendrogramas através do método de aglomeração pela média aritmética não ponderada (UPGMA). O nível de reprodutibilidade da técnica foi obtido pela realização de 10% de réplicas e para a análise do seu poder discriminante, foram calculados os índices de diversidade de Simpson (D') (Hunter e Gaston, 1988) e de Shannon-Weaver (J') (Tramer, 1969).

$$D' = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s nj(nj-1)$$

N=número total de isolados analisados; s=número total de grupos formados; nj=número total de isolados de cada grupo formado.

$$H' = \frac{N \log_2 N - \sum_{j=1}^s nj \log_2 nj}{N}$$

$$H'_{\text{máx}} = \log_2 S$$

$$J' = \frac{H'}{H'_{\text{máx}}}$$

N=número total de isolados analisados; s=número total de grupos formados; nj=número total de isolados de cada grupo formado; J' = rácio de diversidade observada sobre a diversidade máxima possível.

2.4. Identificação ao nível de espécie

Foram otimizadas reações de amplificação utilizando primers espécie-específicos, como apresentado na Tabela 3. Ver no Anexo A informações adicionais.

Tabela 3- Primers e condições de reação de PCR usados na identificação ao nível de espécie.

PCR	Primers (NZYTech, Lda, Lisboa, Portugal)	Espécie Alvo	Concentração de Reagentes (NZYTech, Lda, Lisboa, Portugal)	Condições de PCR (Termociclador Doppio, VWR, Radnor, Pennsylvania, USA)
Multiplex	ddlE1 + ddlE2	<i>E. faecalis</i>	tampão 1X 2,5 mM MgCl ₂ 0,2 mM de cada dNTP 1 μM de cada primer 1 U de Taq polimerase	95 °C (5 min) 95 °C (1 min) 57 °C (1 min) 72 °C (1 min) 72 °C (10 min) 4 °C (infinito)
	ddlF1 + ddlF2	<i>E. faecium</i>		
	mur2edF + mur2edR	<i>E. durans</i>		
Single	CA1 + CA2	<i>E. casseliflavus</i>		

Após amplificação, 8 μL de cada produto de PCR juntamente com 4,5 μL de uma mistura de GelRed (iNtRON Biotechnology, Inc, Korea) e azul de bromofenol (2:1), foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,2% em TBE 0,5X a 110 V durante aproximadamente 1 h.

2.5. Suscetibilidade a antibióticos

2.5.1. Antibiogramas

A análise da suscetibilidade a um total de dezanove agentes antimicrobianos, pertencentes a treze classes e dirigidos para quatro alvos diferentes da célula (ver Tabela 4), foi realizada pelo método de difusão em disco. Os diâmetros dos halos de inibição foram interpretados de acordo com *Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (2008)*. No caso da bacitracina, visto que os respetivos halos de inibição não estão definidos para *Enterococcus* pelo CLSI, foram usados os estabelecidos pelos laboratórios Sanofi (1994).

Tabela 4- Antibióticos usados e respetivas classes e alvos.

Alvo	Classe	Antibiótico (Oxoid, UK)	Símbolo	Dose por disco
Inibição da Síntese de Proteínas	Aminoglicósidos	Gentamicina	CN	120 μg
		Estreptomina	S	300 μg
	Macrólidos	Eritromicina	E	15 μg
	Oxazolidinonas	Linezolid	LZD	30 μg
	Fenicóis	Cloranfenicol	C	30 μg
	Streptograminas	Quinupristina-Dalfopristina	QD	15 μg
	Tetraciclina	Tetraciclina	TE	30 μg
	Nitrofuranos	Nitrofurantoína	F	300 μg
Inibição da Síntese da Parede	Glicopéptidos	Vancomicina	VA	30 μg
		Teicoplanina	TEC	30 μg

Inibição da Síntese da Parede	β-Lactâmicos	Penicilinas	Penicilina G	P	10 U
		β-Lactâmicos semi-sintéticos	Ampicilina Amoxicilina-Ác.Clavulânico	AMP AMC	10 µg 20/10 µg
		Polipéptidos	Bacitracina	B	10 U
Inibição da Síntese de DNA	Quinolonas	Sulfonamidas	Trimetoprim-Sulfametoxazol	SXT	1,25/23,75 µg
		Fluoroquinolonas	Norfloxacina	NOR	10 µg
			Levofloxacina	LEV	5 µg
Ciprofloxacina	CIP		5 µg		
Inibição da Síntese de RNA		Rifamicinas	Rifampicina	RD	5 µg

2.5.2. Pesquisa de genes de resistência

Para os isolados que mostraram ser fenotipicamente resistentes à bacitracina, eritromicina, tetraciclina, vancomicina e cloranfenicol, foram pesquisados genes possivelmente envolvidos nessas mesmas resistências. Para isso foram realizados duas reações de PCR-multiplex e uma reação PCR-single envolvendo os genes e condições descritos na Tabela 5. Para informação mais detalhada ver Anexo A.

Tabela 5- Combinações utilizadas na pesquisa de genes de resistência e condições de reação de PCR.

PCR	Antibiótico	Gene	Concentração de Reagentes (NZYTech, Lda, Lisboa, Portugal)	Condições de PCR (Termociclador Doppio, VWR, Radnor, Pennsylvania, USA)		
Multiplex 1	Bacitracina	<i>brc(B)</i>	tampão 1X 3 mM MgCl ₂ 0,2 mM de cada dNTP 1 µM de cada primer 1 U de Taq polimerase	95 °C (5 min) 94 °C (45 s) 52 °C (45 s) 72 °C (1 min) 72 °C (10 min) 4 °C (infinito)		
	Eritromicina	<i>erm(B)</i>				
	Tetraciclina	<i>tet(M)</i>				
Multiplex 2	Vancomicina	<i>van(A)</i>	tampão 1X 1,5 mM MgCl ₂ 0,2 mM de cada dNTP 0,4 µM de cada primer 1 U de Taq polimerase		} 30 ciclos	
		<i>van(B)</i>				
		<i>van(C)</i>				
Single	Cloranfenicol	<i>cat_pIP501</i>		tampão 1X 1,5 mM MgCl ₂ 0,2 mM de cada dNTP 0,4 µM de cada primer 1 U de Taq polimerase		} 30 ciclos

Após amplificação, 8 µL de cada produto de PCR juntamente com 4,5 µL de uma mistura de GelRed (iNtRON Biotechnology, Inc, Korea) e azul de bromofenol (2:1), foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,2% em TBE 0,5X a 110 V durante aproximadamente 1 h.

2.6. Fatores de virulência

2.6.1. Testes em placa

Tal como referido na Tabela 6, para análise de fatores de virulência recorreu-se a quatro testes em placa.

Tabela 6- Pesquisa de fatores de virulência (testes em placa).

Teste	Meio de Cultura	Procedimento	Positividade do Teste
β -Hemólise	Columbia suplementado com 5% de sangue de cavalo (Biogerm, S.A. Maia, Portugal)	-Inocular por riscado -Incubar durante 48 h a 37 °C	Presença de zonas transparentes à volta das colónias
Gelatinase	Gelatinase Peptone Agar (Liofilchem S.R.L. Italia)	-Inocular por riscado -Incubar durante 24 h a 37 °C -Adicionar solução saturada de sulfato de amónio (40 g/mL)	
Lipase	Spirit Blue Agar (Difco, Franklin Lakes, USA)	-Inocular por riscado -Incubar durante 24 h a 37 °C	
DNase	DNase Test Agar (Liofilchem S.R.L. Italia)	-Inocular por riscado -Incubar durante 24 h a 37 °C -Adicionar solução de azul de toluidina 0,1%	

2.6.2. Pesquisa de genes de virulência

A presença de genes envolvidos na virulência do género *Enterococcus* foi testada pela realização de três reações de PCR-multiplex (ver Tabela 7). Informação mais pormenorizada descrita no Anexo A.

Tabela 7- Combinações utilizadas na pesquisa de genes de virulência e condições de reação de PCR.

PCR	Produto	Gene	Concentração de Reagentes (NZYTech, Lda, Lisboa, Portugal)	Condições de PCR (Termociclador Doppio, VWR, Radnor, Pensilvânia, USA)
Multiplex 1	Substância de agregação de enterococos	<i>agg</i>	tampão 1X 3 mM MgCl ₂ 0,2 mM de cada dNTP 1 μ M de cada primer 1 U de Taq polimerase	95 °C (3 min) 95 °C (30 s) 55 °C (30 s) 72 °C (30 s) 72 °C (5 min) 4 °C (infinito)
	Citolisina	<i>cylA</i>		
	Adesina da parede celular da espécie <i>E. faecalis</i>	<i>efaA_{fs}</i>		
	Proteína de superfície	<i>esp</i>		
Multiplex 2	Adesina da parede celular da espécie <i>E. faecium</i>	<i>efaA_{fm}</i>	35 ciclos	
	Gelatinase	<i>gelE</i>		
Multiplex 3		<i>ccf</i>		
	Feromonas Sexuais	<i>cob</i>		
		<i>cpd</i>		

Após amplificação, 8 µL de cada produto de PCR juntamente com 4,5 µL de uma mistura de GelRed (iNtRON Biotechnology, Inc, Korea) e azul de bromofenol (2:1), foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,2% em TBE 0,5X a 110 V durante aproximadamente 1 h.

Para todos os procedimentos laboratoriais, descritos de 2.2 a 2.6, foram realizadas, sem exceção, 10% de réplicas.

2.7. Análise Estatística

A análise do χ^2 foi utilizada para determinar a independência estatística entre resistência/virulência e os grupos *E. faecalis* e não-*E. faecalis*. Valores de *p-value* <0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

3. Resultados e Discussão

3.1. Disseminação pelos ambientes/locais em estudo

O nicho ecológico usualmente associado a espécies de *Enterococcus* é o intestino de humanos e de outros animais. No entanto, estes podem ser encontrados nos mais diversos locais, incluindo uma enorme variedade de produtos alimentares.

Na tentativa de avaliar a disseminação destas bactérias em ambientes de produção/comercialização de alimentos, foram recolhidas um total de 89 amostras alimentares líquidas e sólidas, amostras de água e amostras de superfícies, numa queijaria, num matadouro de suínos e num hipermercado (antes e após higienização do mesmo) (ver Anexo B).

Na fase de isolamento, o meio seletivo de eleição foi o SBA, visto ser o recomendando pela norma Europeia para a deteção e enumeração de enterococos, na avaliação da qualidade da água (ISO 7899-2). Tendo em conta a dependência de alguns enterococos pela vancomicina isto é, determinadas estirpes de enterococos só crescem na presença deste antibiótico (Koneman *et al.*, 2007), foi adicionalmente usado meio SBA suplementado com 10 µg/mL de vancomicina (SBA+van). As colónias com coloração rosa arroxeado em ambos os meios foram consideradas como enterococos presuntivos.

A partir de cada amostra, exceto amostras de água, foram realizadas várias diluições para posterior contagem de colónias, de maneira a estimar a presença de enterococos. Nos casos em que não foi observado crescimento característico nas primeiras 24 h de incubação, a solução-mãe, após enriquecimento durante 24 h a 37 °C, foi inoculada em SBA sem vancomicina (SBA) e SBA+van. Desta forma, das 89 amostras recolhidas, observou-se crescimento característico em 59, provenientes do isolamento em SBA e em apenas 23, no caso do isolamento em SBA+van. Estas diferenças no crescimento observado em SBA e SBA+van eram esperadas, visto que a vancomicina inibe o crescimento bacteriano. De seguida, tendo em conta possíveis diferenças morfológicas das

colónias, foram selecionadas quatro a cinco colónias características, a partir da menor diluição contável ou a partir do enriquecimento, na tentativa de obter uma amostragem representativa. Estas foram sujeitas a cinco passos de purificação sucessivos com o intuito de garantir a sua pureza.

Posteriormente, para confirmação de que as colónias características correspondiam de facto a enterococos, todos os isolados foram crescidos em Bili Esculina Azida Agar (ISO 7899-2). Microrganismos como os *Enterococcus* têm capacidade de hidrolisar a esculina em esculetina e dextrose. A esculetina reage com o citrato férrico formando um visível complexo castanho muito escuro à volta do crescimento bacteriano. Por conseguinte, apenas os isolados positivos para a hidrólise da esculina passaram à fase seguinte deste estudo.

Para confirmação adicional ao nível de género, foram utilizadas características gerais do género *Enterococcus* e portanto os isolados foram sujeitos aos testes Gram, catalase e oxidase. Todos aqueles que mostraram ser Gram positivos e catalase e oxidase negativos foram presuntivamente classificados como *Enterococcus* spp.

Apesar dos métodos fenotípicos permitirem um despiste inicial de isolados bastante assertivo, os métodos moleculares transmitem mais segurança, visto serem mais fidedignos. Desta forma, a identificação fenotípica presuntiva foi confirmada através de uma reação de amplificação por PCR (Ent-PCR). A metodologia seguida foi adaptada da descrita por Ke *et al.* (1999), sendo que o produto de reação possui um tamanho de 112 pb, tal como evidenciado pela Figura 6. Esta foi a técnica de eleição uma vez que permite a deteção da maioria das espécies de enterococos com uma excelente sensibilidade e especificidade aceitável (Semedo-Lemsaddek *et al.*, 2009). À reação foi adicionado um controlo interno com vista à amplificação do rRNA 16S, de forma a tentar minimizar a existência de falsos negativos, e cujo amplicão tem um tamanho de 907 pb (Figura 6).

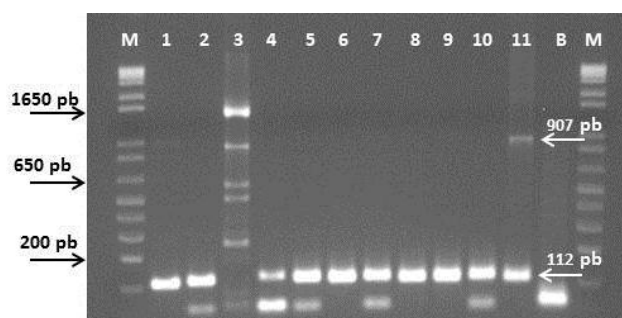


Figura 6- Exemplo de Ent-PCR. Poços 1-2 e 4-10, isolados provenientes do matadouro identificados como pertencentes ao género *Enterococcus*; 3, isolado proveniente do matadouro considerado como não pertencente ao género *Enterococcus*; 11, *E. faecium* DSMZ 2146^T; B, branco; M, marcador de massa molecular 1 Kb Plus (Invitrogen, Life Technologies).

A análise do gel e mais especificamente a visualização do poço 3 permite-nos confirmar os possíveis erros inerentes à identificação fenotípica. Este resultado poderá ser devido ao facto de, no meio SBA poderem ter crescido outro tipo de microrganismos com características fenotípicas semelhantes aos enterococos.

Com a aplicação da técnica de Ent-PCR, um total de 149 isolados foram identificados como pertencendo ao género *Enterococcus* spp., 132 provenientes do meio SBA e 17 do meio SBA+van.

Pela análise das amostras assinaladas a amarelo no Anexo B, e que correspondem às amostras a partir das quais se observou crescimento efetivo de enterococos (confirmado por Ent-PCR), comprova-se que estes microrganismos se encontram amplamente disseminados por todo o ambiente, visto a sua presença ter sido detetada em mais de 50% (51/89) das amostras recolhidas e especialmente nos alimentos uma vez que em, todos eles (exceto um) foi observada a sua presença. Também no Anexo B pode-se observar qual a proveniência relativamente ao meio de cultura (SBA ou SBA+van) e qual o tipo de inóculo (enriquecido ou não), das amostras em que se verificou crescimento de enterococos. Assim, observa-se relativamente ao meio SBA, que em 76% (39/51) das amostras o respetivo inóculo proveio do enriquecimento. No que diz respeito ao meio SBA+van, o resultado é relativamente semelhante ou seja, em 57% (4/7) o inóculo era enriquecido. O facto de na maioria das amostras positivas os enterococos apenas terem sido detetados após enriquecimento, evidencia um potencial risco reduzido, dos locais/ produtos amostrados, para a saúde pública.

De todos os locais em estudo aquele que apresentou uma maior percentagem de amostras positivas para enterococos foi o matadouro de suínos. Sendo este um local cujos produtos (carne de suíno) serão posteriormente cozinhados, esse facto diminui o risco associado, visto que, as temperaturas elevadas possibilitarão a diminuição da carga microbiana presente. No hipermercado, local de maior risco, pois alguns dos produtos disponíveis estão prontos a consumir, observou-se uma menor percentagem de positivos, o que pode evidenciar um adequado controlo da persistência destas bactérias.

Na tentativa de avaliar a presença de enterococos nas amostras cujo inóculo era não enriquecido e cujas contagens de colónias se encontravam dentro dos padrões estabelecidos (entre 15 a 150), foi possível verificar que para as amostras de superfície a frequência foi em média 10^2 UFC/mL tanto em meio SBA como em meio SBA+van e para amostra de água não tratada a frequência foi de $1,2 \times 10$ UFC/100mL. Relativamente às amostras alimentares a sua frequência foi $<10 \times 10^2$ UFC/g exceto no caso do lombo em que foi $>10 \times 10^3$ UFC/g, valores estes que poderão constituir um perigo, especialmente para indivíduos pertencentes a grupos de risco.

3.2. Relações de semelhança e principais espécies envolvidas

Existindo a possibilidade de muitos dos isolados da amostragem serem clones, uma vez que a partir de cada amostra foram retiradas entre quatro a cinco colónias, o objetivo seguinte foi eliminá-los e selecionar apenas representantes da diversidade presente na amostra. Para tal, procedeu-se à tipificação dos 149 isolados por aplicação da técnica de PCR-fingerprinting, recorrendo a primers dirigidos para sequências repetidas no genoma, como o OPC19 e o (GTG)₅. Esta é uma das mais populares técnicas de análise genómica usada para distinguir diferenças em genomas bacterianos, tendo a vantagem de ser rápida, barata e fácil de executar. Recorrer a dois primers distintos, dirigidos para diferentes sequências do genoma, permitiu uma análise mais abrangente do mesmo, proporcionando um maior entendimento das relações de semelhança entre os isolados da coleção.

Recorrendo ao *software* BioNumerics os géis de PCR-fingerprinting foram analisados, o que permitiu a construção de vários dendrogramas, todos eles englobando os perfis de bandas obtidos por ambos os primers.

Para avaliação da reprodutibilidade da técnica procedeu-se à construção de um dendrograma que incluiu os isolados e os 10% de réplicas, sendo que a análise do mesmo permitiu determinar o nível de 80% para a reprodutibilidade.

De seguida, com o intuito de avaliar a diversidade microbiana da coleção em estudo, foi construído um dendrograma com base nos perfis de PCR-fingerprinting de todos os isolados (resultados não apresentados). A linha de corte considerada para a definição de *clusters* correspondeu ao nível de reprodutibilidade da técnica, 80%. Assim, grupos de isolados com níveis de semelhança iguais ou superiores a 80% foram considerados iguais ou extremamente semelhantes.

Após o traçar da linha de corte e de definidos os grupos genómicos, foram calculados os índices de diversidade de Simpson (D') e de Shannon-Weaver (J'). O índice de Simpson é interpretado como sendo a probabilidade de selecionar aleatoriamente dois indivíduos e estes pertencerem ao mesmo grupo. No entanto como o índice de Simpson é inversamente proporcional à diversidade, aplica-se o seu complementar ($D'=1-D$), que se refere à probabilidade de selecionar aleatoriamente dois indivíduos e estes pertencerem a grupos diferentes. Para que a diversidade de uma amostragem seja considerada aceitável o resultado deve ser superior a 0,90. Visto que o resultado obtido foi de 0,93 foi-nos possível considerar que a nossa amostragem permitiu isolar indivíduos distintos. Relativamente ao índice de Shannon-Weaver, o seu princípio é o mesmo, a única diferença é que tem em conta a diversidade máxima (H'_{max}) e portanto, a sensibilidade da análise aumenta visto que é considerado um máximo possível e o que se pretende é ver qual a diversidade observada face a esse máximo. A diversidade máxima foi 5,43 e a observada foi 4,49 sendo que o seu rácio foi de 0,83 o que reforçou o facto de a amostragem ter permitido isolar indivíduos genomicamente distintos.

Para eliminar clones e simultaneamente selecionar representantes da coleção de *Enterococcus* spp., foram construídos três dendrogramas, cada um deles respeitante aos isolados obtidos a partir de cada local de amostragem. Esta separação por local de amostragem permitiu uma seleção de representantes, mais correta e simplificada e uma menor perda de diversidade, uma vez que a entropia viu-se diminuída. A título exemplificativo mostra-se na Figura 7 o dendrograma construído para os isolados provenientes do matadouro.

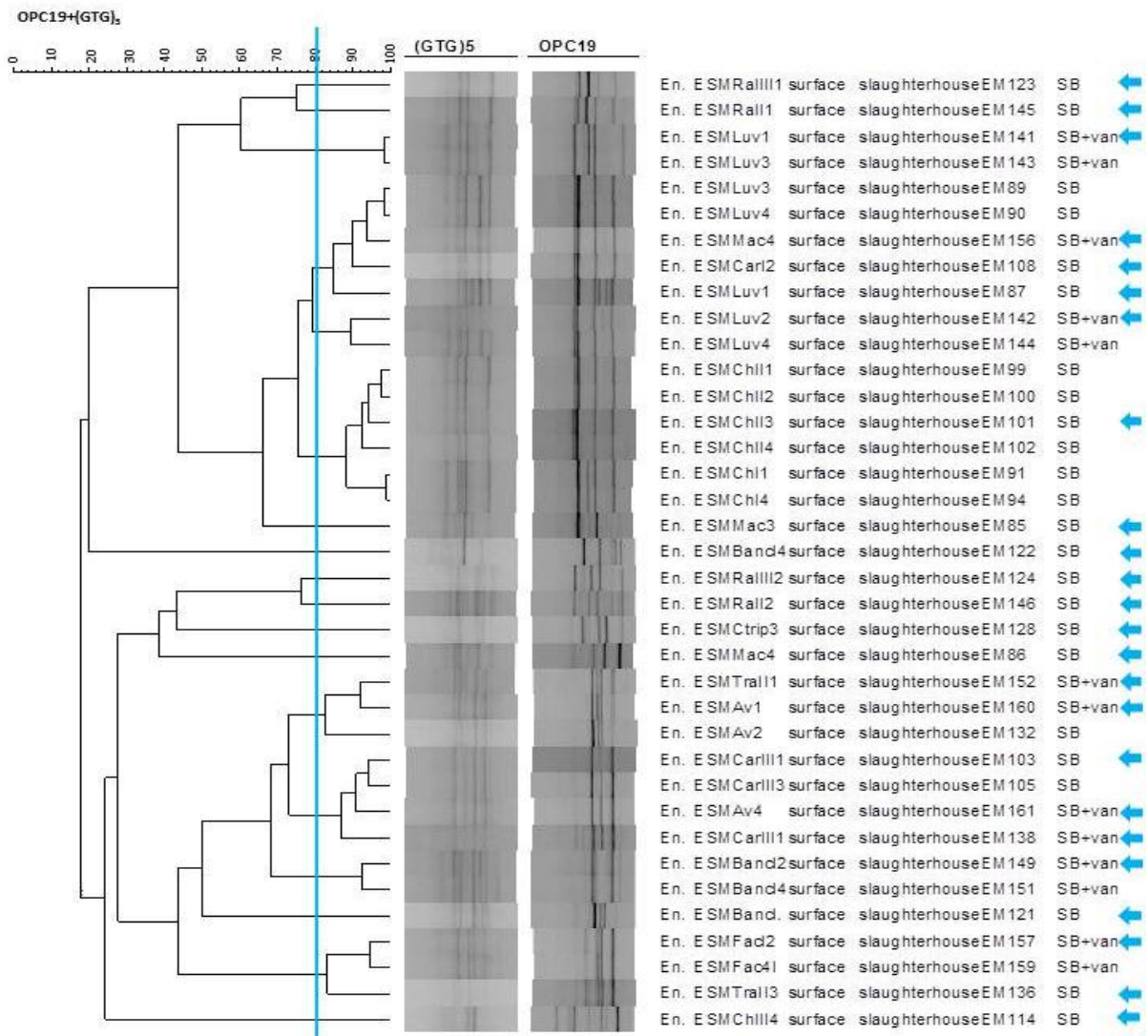


Figura 7- Dendrograma obtido com base nos perfis de PCR-fingerprinting de todos os isolados do matadouro, agrupados através do coeficiente de Pearson e do método de aglomeração pela média aritmética não ponderada (UPGMA). Linha azul corresponde simultaneamente à linha de reprodutibilidade/linha de corte que permitiu o cálculo dos índices de diversidade e a seleção de representantes. As setas correspondem aos isolados originários do matadouro selecionados como representantes desse local de amostragem.

Dos três locais de amostragem, um total de 71 isolados foram selecionados como representantes, 20 da queijaria, 24 do matadouro e 27 do hipermercado.

Tal como a tipificação de estirpes, a identificação ao nível de espécie é importante para a avaliação da diversidade microbiana em vários ambientes (Riboldi *et al.*, 2008). Desta forma, na tentativa de identificar as espécies presentes nas amostras em análise, foi realizada uma reação de PCR espécie-específico, para a identificação de algumas das espécies mais comuns, como *E. faecalis*, *E. faecium* e *E. durans* (Figura 8).

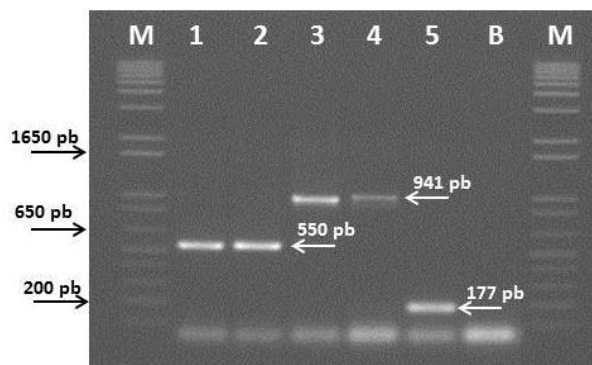


Figura 8- Exemplo de PCR-multiplex espécie-específico. Poços 1, *E. faecium* DSMZ 2146^T; 2, *E. faecium* DSMZ 20477; 3, *E. faecalis* DSMZ 20478^T; 4, *E. faecalis* DSMZ 20376^T; 5, *E. durans* DSMZ 20633^T; B, branco; M, marcador de massa molecular 1 Kb Plus (Invitrogen, Life Technologies).

Dos 71 isolados selecionados, 38 (54%) foram identificados como pertencentes à espécie *E. faecalis*, oito (11%) como pertencentes à espécie *E. faecium*, um (1%) como pertencente à espécie *E. durans* e 24 (34%) como *Enterococcus* sp., visto não pertencerem a nenhuma das espécies testadas.

Tal como o reportado por vários autores (Giraffa, 2003; Trivedi *et al.*, 2011), as espécies predominantes em isolados alimentares de várias origens são *E. faecalis* seguida por *E. faecium*. Os 24 isolados não identificados ao nível de espécie poderão pertencer a espécies como *E. mundtii*, *E. casseliflavus*, *E. hirae* e *E. avium*, visto em estudos anteriores (Macovei e Zurek, 2007; Trivedi *et al.*, 2011), estas estarem associadas a isolados de proveniência alimentar. Não obstante, para confirmar a existência destas espécies teriam de ser realizadas reações de amplificação, recorrendo a outros primers espécie-específicos.

3.3. Suscetibilidade a antibióticos

O uso massivo de antimicrobianos para tratamentos terapêuticos e como promotores de crescimento poderá ser a causa do problemático aumento de resistências em bactérias de origem humana e animal (Lopes *et al.*, 2005; Hwang *et al.*, 2009; Vignaroli *et al.*, 2011). Por conseguinte, a suscetibilidade, dos isolados em estudo, a dezanove agentes antimicrobianos foi avaliada, através da realização de antibiogramas. As resistências observadas nos 71 isolados testados encontram-se esquematizadas na Figura 9.

Nenhum dos isolados mostrou ser resistente aos β -lactâmicos semi-sintéticos (ampicilina e amoxicilina-ác.clavulânico), nitrofuranos (nitrofurantoína) e oxazolidinonas (linezolid), assim como à gentamicina, teicoplanina, levofloxacina e ciprofloxacina. Pelo contrário, 100% (71/71) dos isolados evidenciaram ser resistentes ao trimetoprim-sulfametoxazol. Este resultado era previsível visto que, segundo Franz *et al.* (2003) e Rathnayake *et al.* (2011), os enterococos são intrinsecamente resistentes às sulfonamidas. Relativamente aos restantes antibióticos testados, as percentagens de resistências observadas foram as seguintes: 58% (41/71) para a quinupristina-dalfopristina, 55% (39/71) para a tetraciclina, 54% (38/71) para a bacitracina, 38% (27/71) para a rifampicina, 31%

(22/71) para a eritromicina, 7% (5/71) para a estreptomcina, 6% (4/71) para a penicilina G, 4% (3/71) para o cloranfenicol e 1% (1/71) para a vancomicina e norfloxacina.

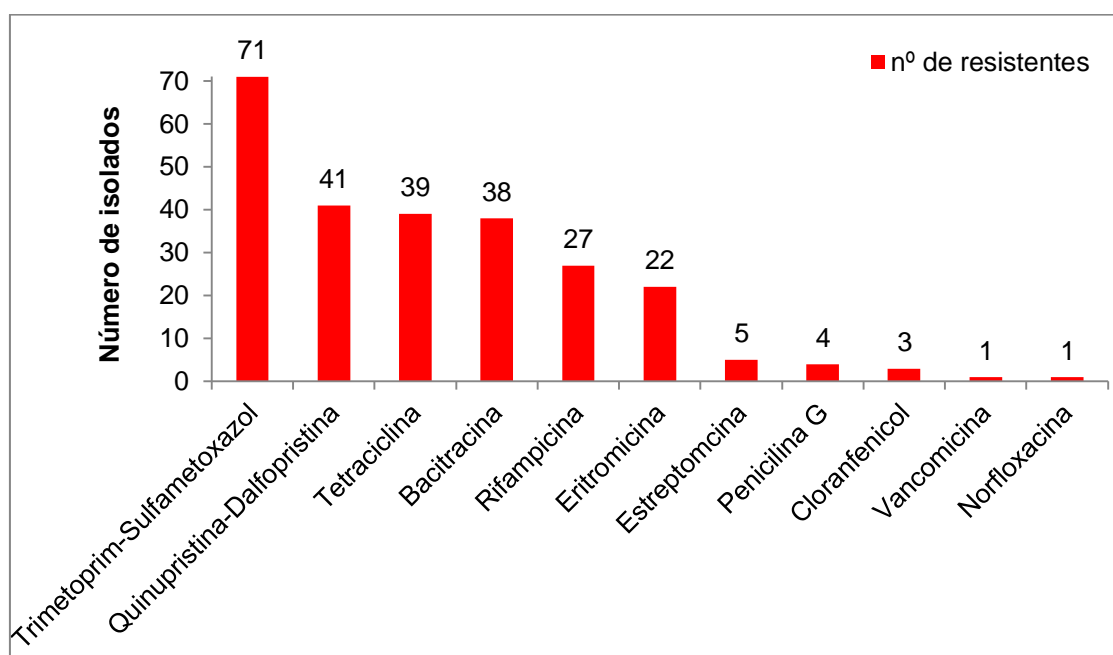


Figura 9- Resistências observadas nos 71 isolados testados, através da realização de antibiogramas.

Os enterococos são descritos como sendo intrinsecamente resistentes a β -lactâmicos como amoxicilina, ampicilina, penicilina G, entre outros (Lopes *et al.*, 2005). Contudo, tal fenómeno não se verificou, sendo que nenhum dos isolados mostrou ser resistente à ampicilina, à amoxicilina-ác.clavulânico e no caso da penicilina G a percentagem de resistência foi bastante reduzida. Resultados semelhantes foram reportados por Lopes *et al.* (2005), McGowan-Spicer *et al.* (2008) Barbosa *et al.* (2009) e Trivedi *et al.* (2011). Lopes *et al.* (2005) ao obter semelhante resultado refere que a resistência aos β -lactâmicos poderá estar mais associada a estirpes clínicas, não incluídas no presente estudo.

Dos 38 isolados identificados como pertencentes à espécie *E. faecalis*, apenas 36 foram resistentes à quinupristina-dalfopristina. Este resultado não era esperado visto que esta espécie de enterococos é intrinsecamente resistente a este agente antimicrobiano. No entanto, em estudos anteriores resultados semelhantes foram obtidos (Aarestrup *et al.*, 2000; Valenzuela *et al.*, 2009; Aslam *et al.*, 2012), sendo que estes poderão ser explicados pela existência de mutações no gene *lsa* uma vez que, segundo Hershberger *et al.* (2004), um estudo recente mostrou que isolados clínicos da espécie *E. faecalis* com mutações neste gene, eram suscetíveis à quinupristina-dalfopristina.

No que diz respeito às resistências observadas à tetraciclina, Valenzuela *et al.* (2009) refere que a resistência a este agente antimicrobiano tem sido mencionada com elevada frequência entre isolados de enterococos provenientes de diferentes origens. Em Portugal resistências a este agente antimicrobiano em isolados de origem alimentar também já foram reportados (Poeta *et al.*, 2006b; Barbosa *et al.*, 2009). Esta constatação poderá estar associada ao facto da tetraciclina ter sido usada

durante muitos anos, em rações como promotor de crescimento, apesar do seu uso ter sido banido da União Europeia em 1975 (Barros *et al.*, 2011).

Quanto à bacitracina, a avaliação da suscetibilidade/resistência a este antibiótico, em enterococos, ainda é bastante limitada no entanto, alguns estudos (Maietti *et al.*, 2007; Diarra *et al.*, 2010; Aslam *et al.*, 2012) contemplam a análise deste agente. Tal como o observado no presente estudo, Lopes *et al.* (2005) verificou existirem resistências à bacitracina, acima dos 50%, em isolados de enterococos de origem alimentar. Este resultado poderá estar associado ao facto da bacitracina ser utilizada como promotor de crescimento.

Para os restantes antibióticos testados, e cujas percentagens de resistência observadas foram inferiores a 40%, a sua comparação com outros estudos (Quednau *et al.*, 1998; Macovei e Zurek, 2006; Valenzuela *et al.*, 2008; Jackson *et al.*, 2010) permite verificar que em isolados de origem alimentar, percentagens de resistência semelhantes ou até mesmo superiores já foram reportadas. Esta ampla distribuição da resistência aos antibióticos, por enterococos de origem alimentar, torna-se a cada dia uma crescente preocupação para a saúde pública.

Enfatizando apenas a resistência à vancomicina, o facto de apenas se ter detetado um isolado resistente a este antibiótico e sendo este proveniente do meio SBA, vem reforçar a ideia da possível ineficácia da vancomicina adicionada ao meio, na fase de isolamento. Assim sendo, apesar de estes resultados apontarem alguma tranquilidade no que diz respeito ao uso da vancomicina no tratamento de infeções por enterococos, estes poderão não corresponder efetivamente à verdade, visto que poder-se-á ter perdido diversidade microbiana uma vez que, possíveis enterococos dependentes da vancomicina poderão não ter encontrado condições que possibilitassem o seu crescimento.

O conceito de multirresistência considerado por Magiorakos *et al.* (2011), refere que para que um isolado seja considerado multirresistente deve ser resistente a pelo menos um antibiótico de três classes com alvos diferentes. Adotando este conceito verifica-se que 66% dos isolados testados são multirresistentes. Apesar de este dado parecer alarmante, visto que a existência de estirpes multirresistentes poderá ser um dado indicativo de risco para a saúde pública, nenhuma resistência foi observada para antibióticos como a vancomicina, teicoplanina e gentamicina sendo que, de acordo com Moreno *et al.* (2006) e Werner (2011) estes são considerados os antibióticos mais importantes no tratamento de infeções por estirpes multirresistentes de enterococos.

A capacidade que os enterococos têm em atuar como reservatório de genes de resistência a antibióticos em alimentos, é uma preocupação nos dias de hoje (Valenzuela *et al.*, 2009). Por conseguinte, procedeu-se à pesquisa de genes envolvidos nas resistências observadas à tetraciclina (*tet(M)*), bacitracina (*bcr(B)*), eritromicina (*erm(B)*), cloranfenicol (*cat_{PIP501}*) e vancomicina (*van(A)*, *van(B)* e *van(C)*), através da técnica de amplificação por PCR, recorrendo a primers específicos. Posteriormente, comparou-se o resultado obtido na pesquisa de genes de resistência com as respetivas resistências observadas nos testes de difusão em placa, tal como o evidenciado pela Figura 10.

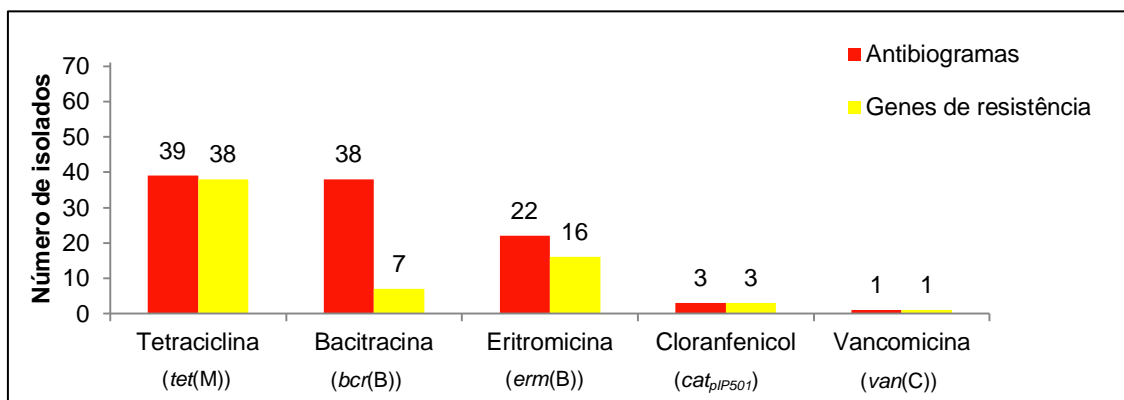


Figura 10 - Comparação entre a pesquisa de genes de resistência e respectivas resistências observadas em placa.

Relativamente à tetraciclina, com a pesquisa do gene *tet(M)*, observou-se que 97% (38/39) dos isolados fenotipicamente resistentes à tetraciclina possuem este gene, indo ao encontro de resultados anteriores que nos mostram que *tet(M)* é dos genes mais frequentemente associado à resistência a este agente (Aarestrup *et al.*, 2000; Maietti *et al.*, 2007; Diarra *et al.*, 2010; Rathnayake *et al.*, 2011). O gene *tet(L)* poderá ser o presente no isolado cuja presença de *tet(M)* não foi detetada visto que, em estudos recentes (Valenzuela *et al.*, 2008; Barros *et al.*, 2011) este é considerado comum na resistência à tetraciclina, em enterococos.

Dos isolados fenotipicamente resistentes à bacitracina, 18% (7/38), evidenciaram positividade para o gene *bcr(B)*, sendo que nos restantes (n=31), este gene mostrou-se ausente. Apesar de, segundo a literatura o gene *bcr(B)* ser um dos responsáveis pela resistência à bacitracina, existem relatos (Matos *et al.*, 2009) de ausência deste gene em isolados fenotipicamente resistentes e este agente antimicrobiano. Na origem desta discrepância de resultados poderá estar a existência de um mecanismo de resistência adicional, visto que não existe completa elucidação dos mecanismos associados à resistência à bacitracina em *Enterococcus*.

O gene *erm(B)* é frequentemente observado em isolados resistentes à eritromicina, já tendo sido descrito como sendo o mais comum na resistência a macrólidos, em enterococos (Barros *et al.*, 2011). No entanto, tal como o demonstrado por Aarestrup *et al.* (2000), não foi detetado o gene *erm(B)* em todos os isolados fenotipicamente resistentes à eritromicina, ou seja, em 27% (6/22) dos isolados este estava ausente, evidenciando um possível envolvimento de outros genes tais como *erm(A)* e *erm(C)*, hipóteses a confirmar.

Para os três isolados fenotipicamente resistentes ao cloranfenicol, a presença do gene *cat_{pIP501}* foi denotada em todos eles. Semelhantes resultados foram observados por Aarestrup *et al.* (2000), sendo que, segundo Trieu-Cuot *et al.* (1993), a prevalência deste gene poderá ser devida à sua presença em plasmídeos como o pIP501, que podem ser transmitidos entre várias estirpes Gram positivas.

Os genes *van(A)*, *van(B)* e *van(C)* foram testados para o único isolado que mostrou ser fenotipicamente resistente à vancomicina, tendo-se detetado a presença do gene *van(C)*. A

resistência à vancomicina (tipo *van(C)*), é uma característica intrínseca de espécies móveis de enterococos nomeadamente, de *E. casseliflavus* e *E. gallinarum* (Dutka-Malen *et al.*, 1995). Este resultado proporcionou um dado curioso visto que, cruzando esta informação com o facto da identificação do isolado em causa não ter sido alcançada na fase de identificação de espécies, poderíamos estar perante uma destas espécies móveis. Na tentativa de obter essa resposta, foi realizado uma reação de PCR recorrendo a um primer específico para a espécie *E. casseliflavus*, tendo-se verificado que o isolado pertencia a esta mesma espécie (dados não mostrados).

3.4. Fatores de virulência

Uma das grandes preocupações associada aos enterococos está relacionada com a presença de fatores de virulência, visto que contribuem para a severidade das infeções. Além disso, sabe-se que muito destes fatores são encontrados em estirpes de origem alimentar, portanto a pesquisa de alguns dos mais comuns foi avaliada no presente estudo.

A análise fenotípica foi protagonizada pela realização de testes em placa para testar a produção de β -hemólise, gelatinase, lipase e DNase e o resultado dos mesmos pode ser observado na Figura 11.

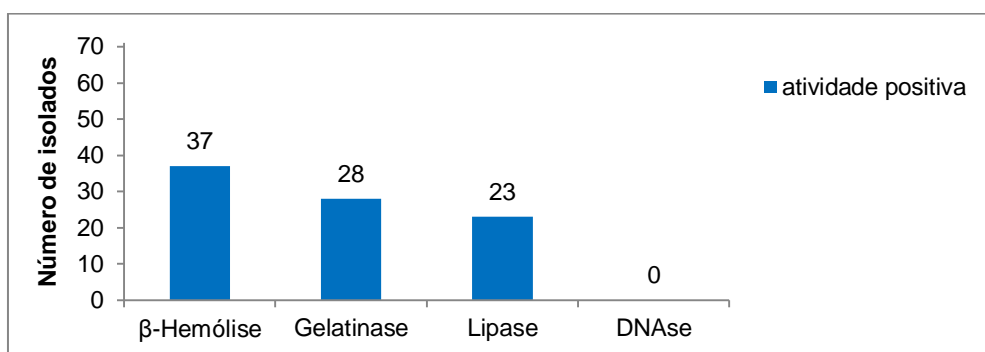


Figura 11 - Análise da atividade fenotípica de fatores virulência.

Recorrendo ao meio de cultura Columbia suplementado com 5% de sangue de cavalo, tornou-se possível a análise da atividade β -hemolítica. A partir desta, 52% (37/71) dos isolados foram considerados β -hemolíticos, visto que foi observada a formação de halos transparentes à volta das colónias. Tendo em conta que a produção de citolisina contribui para a severidade de infeções por enterococos, o resultado obtido pode ser algo preocupante sendo que na maioria dos isolados de proveniência alimentar esta percentagem normalmente é mais baixa. No entanto, Eaton e Gasson (2001) verificaram em isolados alimentares, percentagens próximas das por nós observadas. Tal resultado sugere que a produção de hemolisina não é exclusiva de isolados clínicos e poderá conferir vantagens adaptativas noutros nichos ecológicos.

A formação de halos transparentes à volta das colónias foi também observada no meio Gelatinase Peptone Agar, indicando-nos que 39% (28/71) dos isolados eram gelatinase positivos. Tal como em estudos anteriores (Semedo *et al.*, 2003a; Poeta *et al.*, 2006a; Barbosa *et al.*, 2010; Lindenstrauß *et al.*, 2011), verificou-se que a gelatinase é um fator de virulência frequentemente observado. Além

disso, relacionando os resultados obtidos com a espécie, foi possível verificar que este fator de virulência estava unicamente associado à espécie *E. faecalis*. Visto que, segundo Diarra *et al.* (2010) a degradação pela gelatinase das proteínas da matriz extracelular do hospedeiro é importante na patogenicidade de *E. faecalis*, este resultado sugere o potencial de patogenicidade dos isolados pertencentes a esta mesma espécie.

Recorrendo ao meio Spirit Blue Agar, foi possível verificar a formação de halos transparentes à volta das colônias em 32% (23/71) dos isolados. A detecção de estirpes lipase positivas foi também obtida por Semedo *et al.* (2003a) e Macovei e Zurek (2007), indicando que bactérias que possuem a capacidade de degradar lípidos poderão possuir vantagem adaptativa.

Nenhum dos isolados mostrou positividade para o teste da DNase, uma vez que não se verificou, no meio DNase Test Agar, qualquer formação de halos rosa transparentes à volta das colônias. Resultados semelhantes foram observados por Elsner *et al.* (2000), Omar *et al.* (2004) e Barbosa *et al.* (2010), sugerindo uma reduzida importância da DNase como fator de virulência.

Os enterococos podem possuir no seu genoma vários genes que contribuem diretamente ou indiretamente para a sua virulência e portanto, a análise da presença de alguns destes genes foi desempenhada no presente estudo, através da aplicação da técnica de amplificação por PCR, recorrendo a primers específicos. Os genes testados incluíram várias adesinas como a substância de agregação (*agg*), a proteína de superfície (*esp*) e adesinas da parede celular de *E. faecalis* (*efaA_{fs}*) e *E. faecium* (*efaA_{fm}*), fatores secretados como a gelatinase (*gelE*) e a citolisina (*cylA*) e feromonas sexuais (*ccf*, *cpd*, *cob*). Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 12.

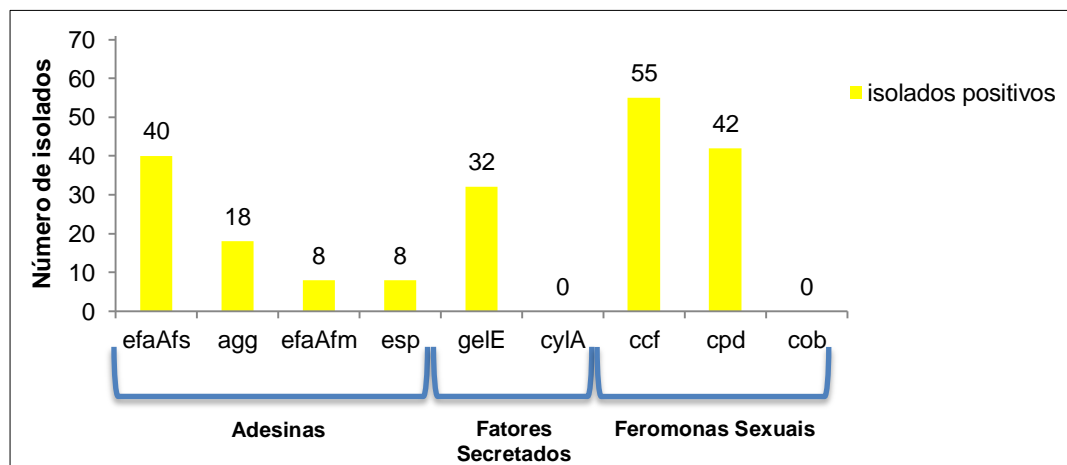


Figura 12- Resultados da análise de genes de virulência.

Das adesinas testadas, verificou-se que 56% (40/71) dos isolados possuem o gene *efaA_{fs}* sendo que 95% (38/40) foram identificados como *E. faecalis* e 5% (2/40) foram identificados como *Enterococcus* sp.. Apesar do gene *efaA_{fs}* codificar uma adesina específica da parede de *E. faecalis*, de igual modo Semedo *et al.* (2003a), observou que o gene *efaA_{fs}* estava presente na maioria das estirpes estudadas, sugerindo a disseminação desta adesina independentemente da origem e da espécie.

O gene *agg* foi detetado em 25% (18/71) dos isolados testados. Este gene codifica para uma proteína de superfície que medeia a ligação das células dadoras às células hospedeiras que não possuem

plasmídeos que respondem a feromonas, contribuindo fortemente para aquisição e/ou disseminação dos elementos genéticos de virulência (Ribeiro *et al.*, 2011). Confrontando este facto com os resultados obtidos, verificou-se que 88% (16/18) dos isolados que possuem o gene *agg*, possuem igualmente genes que codificam feromonas sexuais. Segundo Eaton e Gasson (2001), esta situação corresponde a estirpes recetoras que adquiriram plasmídeos que respondem a feromonas. O facto da expressão deste fator de virulência promover a disseminação de plasmídeos, estar envolvido na colonização e internalização nas células hospedeiras, resultando na invasão dos tecidos e o facto de uma vez no interior do hospedeiro possuir a capacidade de resistir à ação dos macrófagos, facilitando a evasão ao sistema imunitário, torna a presença de tal fator uma grande preocupação.

Relativamente ao gene *efaA_{fm}*, que codifica uma adesina específica da parede de *E. faecium*, a sua presença foi detetada, tal como em estudos anteriores (Diarra *et al.*, 2010; Lindenstrauß *et al.*, 2011), apenas em todos os isolados identificados como *E. faecium*.

Para o gene *esp*, a sua presença foi detetada em 11% (8/71) dos isolados, pertencendo às espécies *E. faecalis* (n=7) e *E. casseliflavus* (n=1). Apesar da proteína de superfície codificada por este gene estar frequentemente associada às espécies *E. faecalis* e *E. faecium*, já existem relatos acerca da existência deste gene em outras espécies como *E. casseliflavus*, *E. mundtii* e *E. durans* (Trivedi *et al.*, 2011). A expressão de *esp* além de promover a adesão a superfícies bióticas e abióticas também está envolvido na evasão ao sistema imunitário, sendo que sua associação a *E. faecalis*, enfatiza novamente o potencial de patogenicidade associado a esta espécie.

Foi ainda possível observar que todos os isolados que se mostraram positivos para a atividade da gelatinase, possuíam o gene *gelE*, que está diretamente associado a esta característica. Além disso, observou-se que 13% (4/32) dos isolados *gelE*⁺ são negativos para atividade da gelatinase sendo que, segundo Semedo-Lemsaddek e Mato (2011), este fenómeno pode ser atribuído a uma deleção cromossomal contendo parte do *loci fsr*. A presença deste fator de virulência em isolados de origem alimentar, recolhidos em Portugal, já foi detetada por Semedo *et al.* (2003) e Ribeiro *et al.* (2010).

Apesar de 52% dos isolados terem demonstrado ser β-hemolíticos, não se observou a presença do gene *cylA*. Semedo *et al.* (2003b) ao revelar associações significativas entre a β-hemólise e o operão *cyl*, sugeriu que todas as estirpes β-hemolíticas devem possuir todo o conjunto de genes *cyl*. Não obstante, existem relatos de isolados β-hemolíticos não possuírem o gene *cylA*, sugerindo ou a existência de um elemento genético desconhecido responsável pela hemólise (Macovei e Zurek, 2007; Diarra *et al.*, 2010) ou variabilidade génica do gene em causa (Semedo *et al.*, 2003b). Assim, para a avaliação da capacidade hemolítica de enterococos, torna-se bastante importante a realização do *screening* de todos os genes *cyl* em conjunto com a atividade β-hemolítica (Semedo *et al.*, 2003b; Teresa-Lemsaddek e Mato, 2011) de maneira a tentar diminuir erros associados.

Quanto aos genes que codificam feromonas sexuais pesquisados ou seja, *ccf*, *cpd* e *cob*, verificou-se a sua presença em 77% (55/71), 59% (42/71) e 0% (0/71) dos isolados respetivamente. Esta disparidade de resultados foi também observada por McGowan-Spicer *et al.* (2008), que da mesma forma detetou uma maior percentagem do gene *ccf*, seguido por *cpd* e por último o *cob*. Estes resultados podem ser importantes pois a presença destes genes poderá ser um indicador do

potencial de patogenicidade dos isolados visto que, estirpes que possuem genes que codificam feromonas sexuais têm uma maior apetência para a aquisição de plasmídeos que respondem a feromonas e consequentemente, de fatores de virulência e resistência associados a estes plasmídeos.

3.5. Potencial de Patogenicidade

A presença de genes de virulência e de resistência a antibióticos em isolados alimentares é atualmente um tema preocupante, uma vez que os enterococos podem estar envolvidos na transmissão de características de virulência e de resistência através da cadeia alimentar (Trivedi *et al.*, 2011).

Com o propósito de confrontar os resultados obtidos pela pesquisa de resistências e de fatores de virulência, foi construído um dendrograma para os 71 isolados selecionados como representantes, sendo que este pode ser consultado no Anexo C. Como primeiro impacto da visualização deste dendrograma ressalta a espécie *E. faecalis* (quadrados verdes), que além de ser dominante encontra-se agrupada separadamente das restantes. Verifica-se ainda que este grupo apresenta um maior número de resultados positivos para a análise da resistência e virulência (quadrados pretos). Com o intuito de perceber se as diferenças de resistência e virulência observadas entre a espécie *E. faecalis* e as espécies não-*E. faecalis* eram estatisticamente significativas, procedeu-se à análise estatística, pela realização do teste Qui-Quadrado. Este mede a probabilidade de as diferenças encontradas entre os dois grupos da nossa amostra (*E. faecalis* e não-*E. faecalis*) serem devidas ao acaso. A aplicação do χ^2 permitiu-nos verificar que há de facto uma relação estatisticamente significativa (p -value <0,05) entre o grupo *E. faecalis* e a resistência à tetraciclina e à bacitracina, a atividade da gelatinase e os genes *agg*, *cpd*, *efaA_{fs}*, *esp* e *gelE*. Para o grupo não-*E. faecalis* foi possível observar uma relação estatisticamente significativa (p -value <0,05) entre este e a resistência à penicilina G, à atividade da β -Hemólise e ao gene *efaA_{fm}*. O facto da associação entre o grupo *E. faecalis* e os fatores de resistência/virulência ser superior à observada entre o grupo não-*E. faecalis*, reforça mais uma vez, a potencial patogenicidade desta espécie.

A análise deste dendrograma também nos permitiu confirmar, que os enterococos estão amplamente disseminados por todo o ambiente, visto que não se observou a formação de grupos envolvendo apenas isolados da queijaria ou do matadouro ou do hipermercado. Esta afirmação pode ser confirmada pela análise dos isolados assinalados pelos retângulos azuis do Anexo C, em que se observam relações de semelhança acima dos 84% entre isolados originários de diferentes locais de amostragem. Adicionalmente verificou-se que, apesar de determinadas estirpes só crescerem na presença de vancomicina, a maioria dos isolados provenientes do meio SBA+van possui graus de semelhança bastante elevados com isolados provenientes do meio SBA (retângulos verdes no Anexo C). Este facto leva, uma vez mais, a crer que o antibiótico adicionado ao meio SBA durante a fase de isolamento não estaria nas melhores condições, podendo ter ocorrido a sua deterioração durante o armazenamento.

Numa análise minuciosa do dendrograma, no que diz respeito às relações de semelhança entre os vários isolados, foi-nos possível observar relações de semelhança entre isolados, bastante sugestivas (retângulo rosa no Anexo C). Os três isolados assinalados são provenientes do hipermercado e mais especificamente da zona da gastronomia. A análise de dados permitiu verificar que o isolado originário da tesoura de corte (código: ESJGTC4) obtido antes da higienização do local, possui um grau de semelhança acima dos 84% com os restantes dois

isolados que são originários da mesma tesoura de corte (código: ESJGTCN4) e do ralo do lava-loiça (código: ESJGRIN21), mas obtidos após higienização. Esta associação leva-nos a crer que as normas de higienização deste local não estão a ser cumpridas ou que os desinfetantes utilizados não estão a ser totalmente eficientes na eliminação de enterococos. A ineficiência dos processos de higienização proporciona a persistência e conseqüentemente a incidência de enterococos em vários alimentos, diminuindo a segurança para os consumidores.

Comparando os resultados das antibiorresistências com a presença de genes de virulência foi possível constatar que em 11 isolados foi detetada a presença simultânea dos genes *ccf*, *agg* e *tet(M)*. Esta associação vem enfatizar a possibilidade da presença do plasmídeo pCF10, que segundo Coque *et al.* (2011), responde à feromona *ccf* e confere resistência à tetraciclina pela presença do gene *tet(M)*. No entanto, esta associação carece de confirmação.

A ampla disseminação pelos diversos ambientes em estudo assim como a presença simultânea de resistência a antibióticos e fatores de virulência na maioria dos isolados, principalmente os pertencentes à espécie *E. faecalis* é evidente. Este é um dado preocupante, visto que face à plasticidade metabólica inerente a estas bactérias, tais elementos podem ser transferidos para outros microrganismos, facilitando conseqüentemente a sua disseminação. Além disso, num possível contacto com o hospedeiro, a presença de resistências a antibióticos e fatores de virulência facilita o seu processo de evasão ao sistema imunitário do hospedeiro, assim como a sua persistência neste.

4. Conclusões

O potencial risco de disseminação de enterococos virulentos e resistentes, através da cadeia alimentar é nos dias de hoje uma grande preocupação.

No presente estudo, o objetivo foi avaliar a disseminação e a diversidade destas bactérias em ambientes alimentares e posteriormente avaliar o seu potencial de patogenicidade, pela pesquisa de resistências a agentes antimicrobianos e de fatores de virulência.

A partir das 89 amostras recolhidas, foi observada a presença de enterococos, através de métodos fenotípicos e moleculares, em mais de 50% destas, permitindo-nos verificar que estas bactérias se encontram amplamente distribuídas pelos ambientes em estudo.

A avaliação das relações de semelhanças, entre os 149 isolados identificados como *Enterococcus* spp. e o cálculo de índices de diversidade evidenciaram que a amostragem permitiu isolar indivíduos distintos e permitiu verificar ainda que estes agruparam de forma independente da sua origem, não existindo grupos específicos de cada local de amostragem. Além disso, com a identificação ao nível

de espécie, o facto de vários isolados terem ficado por identificar, destaca uma vez mais a diversidade dos isolados obtidos, visto que espécies menos comuns poderão estar presentes.

A resistência a diversos antibióticos testados, assim como a presença de fatores de virulência como adesinas, fatores secretados e feromonas sexuais, evidenciaram o potencial de patogenicidade associado a estes isolados. Isto porque, num eventual contacto com o hospedeiro, estes possuem a “maquinaria” necessária para aderirem e evadirem, para resistirem à presença de vários antibióticos e para persistirem no interior do mesmo. O potencial risco de patogenicidade está principalmente associado a isolados identificados como pertencentes à espécie dominante no presente estudo (*E. faecalis*), visto que foi possível detetar simultaneamente, um maior número de resistências a antibióticos e presença de fatores de virulência.

A presença de 66% de isolados multirresistentes é também um dado preocupante, tornando limitante a ação de antibióticos com diferentes alvos e indo ao encontro do problema associado à crescente limitação das opções terapêuticas, em caso de infeção.

Além disso, a persistência de isolados em locais cuja higienização não é cumprida ou cujos desinfetantes não permitem a sua eliminação, pode evoluir para níveis superiores e o que é facto é que essa persistência foi observada.

Apesar de toda a problemática associada aos isolados supracitada, não deve ser esquecido que a maioria dos enterococos detetados foi proveniente de amostras enriquecidas, o que indica números reduzidos de contaminação. Também não deve ser esquecido que relativamente às resistências observadas, estas não contemplaram antibióticos importantes no tratamento de infeções causadas por estirpes de enterococos multirresistentes, aumentando assim a probabilidade de os mesmos serem eliminados por antibioterapia.

Além disso, o maior número de amostras positivas foi referente ao matadouro de suínos. Tendo em conta que os alimentos provenientes deste local serão posteriormente cozinhados, a eliminação destas bactérias poderá ser alcançada.

Assim sendo, apesar de os resultados obtidos não serem alarmantes, é bastante importante o controlo destas bactérias em alimentos e superfícies de contacto com os mesmos, uma vez que a sua contínua persistência e evolução podem originar resultados problemáticos para a humanidade.

5. Referências

- Aarestrup F. M., Agerso Y., Gerner-Smidt P., Madsen M., Jensen L.B. (2000) Comparison of antimicrobial resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagnostic Microbiology and Infection Disease*, 37(2):127-137
- Aarestrup F. M., Butaye P., Witte W. (2002) Nonhuman Reservoirs of Enterococci. In: Gilmore M.S. (Ed) *The enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance*, Washington DC, ASM Press.
- Agerso Y., Pedersen A. G., Aarestrup F.M. (2006) Identification of Tn5397-like and Tn916-like transposons and diversity of the tetracycline resistance gene *tet(M)* in enterococci from humans, pigs and poultry. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57:832-839.
- Alekshun M. N., Levy S. B. (2007) Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell*, 128(6):1037-1050.
- Aminov R. I., Garrigues-Jeanjean, Mackie R. I. (2001) Molecular Ecology of Tetracycline Resistance: Development and Validation of Primers for Detection of Tetracycline Resistance Genes Encoding Ribosomal Protection Proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1): 22-32.
- Anónimo (1989) Microbiologia alimentar-regras gerais para análise microbiológica – NP 2079.
- Anónimo (2000) Qualité de l'eau. Recherche et dénombrement des entérocoques intestinaux – Partie 2: Méthode par filtration sur membrane - NF EN ISO 7899-2.
- Anónimo (2004) Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates swabs - ISO 18593:2004(E).
- Arias C. A., Robredo B., Singh K. V., Torres C., Panesso D., Murray B. E. (2006) Rapid Identification of *Enterococcus hirae* and *Enterococcus durans* by PCR and Detection of a Homologue of the *E. hirae* *mur-2* Gene in *E. durans*. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(4): 1567–1570.
- Aslam M., Diarra M. S., Checkley S., Bohaychuk V., Masson L. (2012) Characterization of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus* spp. Isolated from retail meats in Alberta, Canada. *International Journal of Food Microbiology*, 156(3):222-230.
- Barbosa J., Ferreira V., Teixeira P. (2009) Antibiotic susceptibility of enterococci isolated from traditional fermented meat products. *Food Microbiology*, 26(5):527-532.
- Barbosa J., Gibbs P.A., Teixeira P. (2010) Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in North of Portugal. *Food Control*, 21:651-656.
- Barros J., Igrejas G., Andrade M., Radhouani H., López M., Torres C., Poeta P. (2011) Gilthead seabream (*Sparus aurata*) carrying antibiotic resistance enterococci. A potential of marine contamination? *Marine Pollution Bulletin*, 62(6):1245-1248.
- Brandão A., Almeida T., Muñoz-Atienza E., Torres C., Igrejas G., Hernández P. E., Cintas L.M. Poeta P., Herranz C. (2010) Antimicrobial activity and occurrence of bacteriocins structural genes in *Enterococcus* spp. of human and animal origin isolated from Portugal. *Archives of Microbiology*, 192(11):927-936.
- Brinkmann V., Zychlinsky A. (2007) Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nature Reviews Microbiology*, 5:577-582.
- Butaye P., Devriese L. A., Haesebrouck F. (2003) Antimicrobial Growth Promoters Used in Animal Feed: Effects of Less Well Known Antibiotics on Gram-Positive Bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(2): 175–188.
- Carlos A. R., Semedo-Lemsaddek T., Barreto-Crespo M. T., Tenreiro R. (2010) Transcriptional analysis of virulence-related genes in enterococci from distinct origins. *Journal of Applied Microbiology*, 108(5):1563-1575.
- Clewell D. B., Weaver K. E. (1989) Sex Pheromones and Plasmid Transfer in *Enterococcus faecalis*. *Plasmid*, 21(3):175-184.
- Coburn P. S., Gilmore M. S. (2003) The *Enterococcus faecalis* cytolysin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. *Cellular Microbiology*, 5(10):661-669.
- Coque T. M., Freitas A. R., Novais C., Peixe L., Baquero F. (2011) Mobile Genetic Elements and Lateral Genetic Transfer in Enterococci. In: Semedo-Lemsaddek T., Barreto-Crespo M. T., Tenreiro R. (Ed.) *Enterococcus and Safety*, Nova Science Publisher, New York.
- Cotta M. A., Whitehead T. R., Falsen E., Moore E., Lawson P. A. (2012) Two novel species *Enterococcus lemanni* sp. nov. and *Enterococcus eurekaensis* sp. nov., isolated from a swine-manure storage pit. *Antoine Van Leeuwenhoek*.

- Crespo M. T. B., Alves P. I. (2011) Enterococci in Food. In: Semedo-Lemsaddek T., Barreto-Crespo M. T., Tenreiro R. (Ed.) *Enterococcus and Safety*, Nova Science Publisher, New York.
- Davis B. D., Chen L., Tai P.C. (1986) Misread protein creates membrane channels: An essential step in the bactericidal action of aminoglycosides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(16):6164-6168.
- Diarra M. S., Rempel H., Champagne J., Masson L., Pritchard J., Topp E. (2010) Distribution of Antimicrobial Resistance and Virulence Genes in *Enterococcus* spp: Characterization of Isolates from Broiler Chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(24):8033-8043.
- Delgado S., Fracchetti F., Mayo B., Torriani S. (2011) Development and validation of a multiplex PCR-based DNA microarray hybridization method for detecting bacterial antibiotic resistance genes in cheese. *International Dairy Journal*, 21:149-157.
- Drlica K., Malik M., Kerns R. J., Zhao X. (2008) Quinolone-Mediated Bacterial Death. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(2):385-392.
- Dunny G. M., Leonard B. A. B., Hedberg P. J. (1995) Pheromone-Inducible Conjugation in *Enterococcus faecalis*: Interbacterial and Host-Parasite Chemical Communication. *Journal of Bacteriology*, 177(4):871-876.
- Dutka-Malen S., Evers S., Courvalin P. (1995) Detection of Glycopeptide Resistance Genotypes and Identification to the Species Level of Clinically Relevant Enterococci by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(1):24-27.
- Eaton T. J., Gasson M. J. (2001) Molecular Screening of *Enterococcus* Virulence Determinants and Potential for Genetic Exchange between Food and Medical Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4):1628-1635.
- Eliopoulos G. M. (2008) Antimicrobial Resistance in the *Enterococcus*. In: Wax R. G., Lewis K., Salyers A., Taber H. (Ed.) *Bacterial Resistance Antimicrobials*, New York, CRC Press.
- Elsayed S., Hamilton N. (2001) Improved Primer Design for Multiplex PCR Analysis of Vancomycin-Resistant *Enterococcus* spp.. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(6): 2367–2368.
- Elsner H. A., Sobottka I., Mack D., Claussen M., Laufs R., Wirth R. (2000) Virulence factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* blood culture isolates. *European Journal of Clinical Microbiology and Infections*, 19(1):39-42.
- Emaneini M., Aligholi M., Aminshahi M. (2008) Characterization of Glycopeptides, Aminoglycosides and Macrolide Resistance among *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Isolates from Hospital in Tehran. *Polish Journal of Microbiology*, 57(2):173-178.
- Enne V. I., Delsol A. A., Roe J. M., Bennet P. M. (2004) Rifampicin resistance and its fitness cost in *Enterococcus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53:203-207
- Floss H. G., Yu TW. (2005) Rifamycin-Mode of Action, Resistance, and Biosynthesis. *Chemical Reviews*, 105(2):621-32.
- Franz C. M. A. P., Holzapfel W. H., Stiles M. (1999) Enterococci at the crossroads of food safety? *International Journal of Food Microbiology*, 47:1-24.
- Franz C. M. A. P., Huch M., Abriouel H., Holzapfel W., Gálvez A. (2011) Enterococci as probiotic and their implications in food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 151:125-140.
- Franz C. M. A. P., Stiles M. E., Schleifer K. H., Holzapfel W. H. (2003) Enterococci in foods-a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 88:105-122.
- Franz C. M. P., Muscholl-Silberhorn A. B., Yousif N. M. K., Vancanneyt M., Swings J., Holzapfel W. H. (2001) Incidence of Virulence Factors and Antibiotic Resistance among Enterococci Isolated from Food. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9):4385-4389.
- Furumura M. T., Figueiredo P. M. S., Carbonell G. V., Darini A. L. C., Yano T. (2006) Virulence-associated characteristics of *Enterococcus Faecalis* strains isolated from clinical sources. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37:230-236.
- Giraffa G. (2002) Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews*, 26:163-171.
- Giraffa G. (2003) Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 88(2-3):215-222.
- Graham J.P., Price L. B., Evans S. L., Graczyk T. K., Silbergeld E. (2009) Antibiotic resistant enterococci and staphylococci isolated from flies collected near confined poultry feeding operations. *Science of total environment*, 407(8):2701-2710.
- Hershberger E., Donabedian S., Konstantinou K., Zervos M. J. (2004) Quinupristin-Dalfopristin Resistance in Gram-Positive Bacteria: Mechanism of Resistance and Epidemiology. *Clinical Infectious Diseases*, 38(1):92-98.

- Huovinen P. (2001) Resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole. *Clinical Infectious Diseases*, 32(11):1608-1614.
- Hunter P. R., Gaston M. A. (1988) Numerical index of the discriminatory ability of typing schemes: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(11): 2465-2466.
- Hwang Y., Ku H. O., Lim S. K., Park C. K., Jung G. J., Jung S. C., Nam H. M. (2009) Species distribution and resistance patterns to growth-promoting antimicrobials of enterococci isolated from pigs and chickens in Korea. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 21(6):858-862.
- Jackson C. R., Fedorka-Cray P. J, Barrett J. B. (2004) Use of a Genus- and Species-Specific Multiplex PCR for Identification of Enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(8): 3558–3565.
- Jackson C. R., Lombard J. E., Dargatz D. A., Fedorka-Cray P. J. (2010) Prevalence, species distribution and antimicrobial resistance of enterococci isolated from US dairy cattle. *Letters in Applied Microbiology*, 52:41-48.
- Jurkovič D., Križková L., Dušinský R., Belicová A., Sojka M., Krajčovič J., Ebringer L. (2006) Identification and characterization of enterococci from bryndza cheese. *Letters in Applied Microbiology*. ISSN 0266-8254.
- Kalina A. P. (1970) The Taxonomy and Nomenclature of Enterococci. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 20(2):185-189.
- Ke D., Picard F. J., Martineau F., Ménard C., Roy P. H., Oullette M., Bergeron M. G. (1999) Development of a PCR Assay for Rapid Detection of Enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(11): 3497–3503.
- Kohanski M. A., Dwyer D. J., Collins J. J. (2010) How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*, 8:423-435.
- Koneman E. W., Allen S. D., Janda W. M. (2007) Cocos Gram-Positivos: Parte II. In: Diagnóstico Microbiológico. Texto e Atlas Colorido.
- Lemsaddek A., Tenreiro R. (2011) Diversity and Ecological Niches. In: Semedo-Lemsaddek T., Barreto-Crespo M. T., Tenreiro R. (Eds.) *Enterococcus and Safety*, Nova Science Publisher, New York.
- Lindenstrauß A. G., Pavlovic M., Bringmann A., Behr J., Ehrmann M. A., Vogel R. F. (2011) Comparison of genotypic and phenotypic cluster analysis of virulence determinants and possible role of CRISPR elements towards their incidence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Systematic and Applied Microbiology*, 34:553-560.
- Lopes M. F. S., Ribeiro T., Abrantes M., Marques J. J. F., Tenreiro R., Crespo M. T. B. (2005) Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci. *International Journal of Food Microbiology*, 103:191-198.
- Low Y. L., Jakubovics N. S., Flatman J. C., Jenkinson H. F., Smith A. W. (2003) Manganese-dependent regulation of the endocarditis-associated virulence factor EfaA of *Enterococcus faecalis*. *Journal of Medical Microbiology*, 52:113-119.
- Lowe A. M., Lambert P. A., Smith A. W. (1995) Cloning of an *Enterococcus faecalis* Endocarditis Antigen: Homology with Adhesins from Some Oral Streptococci. *Infection and Immunity*, 63(2):703-706.
- Ludwin W., Schleifer K.H., Whitman B. (2009) Family IV. Enterococcaceae fam. nov. In: Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwing W., Rainey F.A. (Eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer Dordrecht Heidelberg London New York.
- Macovei L., Zurek L. (2006) Ecology of Antibiotic Resistance Genes: Characterization of Enterococci from Houseflies Collected in Food Settings. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6):4028-4035.
- Macovei L., Zurek L. (2007) Influx of enterococci and associated antibiotic resistance and virulence genes from ready-to-eat food to the human digestive tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(21):6740-6747.
- Magiorakos A. P., Srinivasan A., Carey R. B., Carmeli Y., Falagas M. E., Giske C. G., Harbarth S., Hindler J. F., Kahlmeter G., Olsson-Liljequist B., Paterson D. L., Rice L. B., Stelling J., Struelens M. J., Vatopoulos A., Weber J. T., Monnet D. L. (2011) Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3):268-81.
- Maietti L., Bonvini B., Huys G., Giraffa G. (2007) Incidence of antibiotic resistance and virulence determinants among *Enterococcus italicus* isolates from dairy products. *Systematic and Applied Microbiology*, 30:509-517.
- Manero A., Blanch A. (1999) Identification of *Enterococcus* spp. with a Biochemical Key. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10):4425-4430.
- Mannu L., Paba A., Daga E., Comunian R., Zanetti S., Duprè I., Sechi L. A. (2003) 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*, 88:291-304.

- Manson J. M., Keis S., Smith J. M.B., Cook G. M. (2004) Acquired Bacitracin Resistance in *Enterococcus faecalis* Is Mediated by an ABC Transported and a Novel Regulatory Protein, BcrR. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(10): 3743-3748.
- Massol-Deya A.A., Odelson D. A., Hickey R. F. Tiedje J.M. (1995) Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). In: Akkermans A. D. L. Van Elsas J. D., Bruijn F. J. (Eds) *Molecular Microbial Ecology Manual*. Dordrecht (The Netherlands): Kluwer Academic.
- Matos R., Pinto V. V., Ruivo M., Lopes M. F. S. (2009) Study on the dissemination of the *bcrABDR* cluster in *Enterococcus* spp. reveals that the BcrAB transporter is sufficient to confer high-level bacitracin resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 34:142-147.
- McGowan-Spicer, Lori L, Fedorka-Cray, Paula J., Frye, Jonathan G., Meinersmann, Richard J., Barrett, John B., Jackson, Charlene R. (2008) Antimicrobial resistance and virulence of *Enterococcus faecalis* isolated from retail food, *Journal of Food Protection* 71(4):760-769.
- McOsker C. C., Fitzpatrick P. M. (1994) Nitrofurantoin: Mechanism of action and implications for resistance development in common uropathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 33 (supplement A):23-30.
- Morandi S., Cremonesi P., Povolo M., Brasca M. (2012) *Enterococcus lactis* sp. nov., from Italian raw milk cheeses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62: 1992-1996.
- Moreno M. R. F., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E., Vuyst L. De. (2006) The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 106:1-24.
- Murray B. E. (1994) β -lactamase-producing enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36(11):2355-2359.
- Niemi R. M., Ollinkangas T., Paulin L., Svec P., Vandamme P., Karkman A., Kosina M., Lindström K. (2012) *Enterococcus rivorum* sp. nov., from water of pristine brooks. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62:2169-2173.
- Omar N. B., Castro A., Lucas R., Abriouel H., Yousif N. M. K., Franz C. M. A. P., Holzapfel W. H., Pérez-Pulido R., Martínez-Cañamero M., Gálvez A.(2004) Functional and safety aspects of enterococci isolated from different Spanish foods. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(1):118-130.
- Pérez-Pulido R., Abriouel H., Omar N. B., Martínez-Cañamero M., Gálvez A. Safety and potential risks of enterococci isolated from traditional fermented capers. *Food and Chemical Toxicology*, 44:2070-2077.
- Perreten V., Vorlet-Fawer L., Slickers P., Ehricht R., Kuhnert P., Frey J. (2005) Microarray-based detection of 90 Antibiotic Resistance genes of Gram-Positive Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(5):2291-2302.
- Poeta P., Costa D., Klibi N., Rodrigues J., Torres C. (2006a) Phenotypic and genotypic of gelatinase and β -Haemolysis activities in faecal enterococci of poultry in Portugal. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*, 53(5):203-208.
- Poeta P., Costa D., Rodrigues J., Torres C. (2006b) Antimicrobial resistance and the mechanisms implicated in faecal enterococci from healthy humans, poultry and pets in Portugal. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27:131-137.
- Quednau M., Ahrné S., Petersson A. C., Molin G. (1998) Antibiotic-resistant strains of *Enterococcus* isolated from Swedish and Danish retailed chicken and pork. *Journal of Applied Microbiology*, 84(6):1163-1170.
- Qin X., Singh K V., Weinstock G. M., Murray B. E. (2000) Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* Genes on Production of Gelatinase and a Serine Protease and Virulence. *Infection and Immunity*, 68(5):2579-2586
- Radhouani H., Igrejas G., Pinto L., Gonçalves A., Coelho C., Rodrigues J., Poeta P. (2011) Molecular characterization of antibiotic resistance in enterococci recovered from seagulls (*Larus cachinnans*) representing an environmental health problem. *Journal of Environmental Monitoring*, 13:2227-2233.
- Rahkila R., Johansson P., Säde E., Björkroth J. (2011) Identification of enterococci from broiler products and a broiler processing plant and description of *Enterococcus viikkiensis* sp. nov. *Applied and environmental microbiology*, 77(4):1196-1203.
- Rasooly A., Harold K. E. (2008) Food microbial pathogen detection and analysis using DNA microarray technologies. *Foodborne Pathogens and Disease*, 5(4):531–550.
- Rathnayake I., Hargreaves M., Huygens F. (2011) SNP diversity of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* en a South East Queensland Waterway, Australia, and associated antibiotic resistance gene profiles. *BMC Microbiology*, 11(1):201-233.
- Ribeiro T., Oliveira M., Fraqueza M. J., Lauková A., Elias M., Tenreiro R., Barreto A. S., Semedo-Lemsaddek T. (2011) Antibiotic Resistance and Virulence Factors among Enterococci Isolated from "Chouriço", a Traditional Portuguese Dry Fermented Sausage. *Journal of Food Protection*, 74(3):465-469.

- Riboldi G. P., Mattos E. P., Frazzon A. P.G., Alves d'Azevedo P., Frazzon F. (2008) Phenotypic and genotypic heterogeneity of *Enterococcus* species from food in Southern Brazil. *Journal of Basic Microbiology*, 48:31-37.
- Rossolini G. M., Mantengoli E., Montagnani F., Pollini S. (2010) Epidemiology and clinical relevance of antimicrobial resistance determinants versus anti-Gram-positive agents. *Current Opinion in Microbiology*, 13(5):582-588.
- Sarantinopoulos P., Andrighetto C., Georgalaki M. D., Rea M. C., Lombardi A., Cogan T. M., Kalantzopoulos G., Tsakalidou E. (2001) Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *International Dairy Journal*, 11:621-647.
- Schleifer K. H., Kilpper-Bälz R. (1984) Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34(1):31-34.
- Semedo T., Santos M. A., Lopes M. F. S., Marques J. J. F., Crespo M. T. B., Tenreiro R. (2003a) Virulence Factors in Food, Clinical and Reference Enterococci: A Common Trait in the Genus? *Systematic and Applied Microbiology*, 26:13-22.
- Semedo T., Santos M. A., Martins P., Lopes M. F. S., Marques J. J. F., Tenreiro R., Crespo M. T. B. (2003b) Comparative Study Using Type Strains and Clinical and Food Isolates to Examine Hemolytic Activity and Occurrence of the *cyl* Operon in Enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(6):2569-2576.
- Semedo-Lemsaddek T., Mato R. (2011) Pathogenesis and Virulence. In: Semedo-Lemsaddek T., Barreto-Crespo M. T., Tenreiro R. (Eds.) *Enterococcus and Safety*, Nova Science Publisher, New York.
- Semedo-Lemsaddek T., Tenreiro R., Alves P. L., Barreto-Crespo M. T. (2009) *Enterococcus* 157-179. In: Liu D. (Eds) *Molecular Detection of Foodborn Pathogens*. CRC Press.
- Serio A., Chavez-López C., Paparella A., Suzzi G. (2010) Evaluation of metabolic activities of enterococci isolated from Pecorino Abruzzese cheese. *International Dairy Journal*, 20:459-464.
- Shankar V., Baghdayan A. S., Huycke M. M., Lindahl G., Gilmore M. (1999) Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infection and Immunity*, 67(1):193-200.
- Sistek V., Maheux A. F., Boissinot M., Bernard K. A., Cantin P., Cleenwerck I., De Vos P., Bergeron M. G. (2012) *Enterococcus ureasticus* sp. nov. and *Enterococcus quebecensis* sp. nov., isolated from water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62:1314-1320.
- Soltani M., Beighton D., Philpott-Howard J., Woodford N. (2000) Mechanisms of Resistance to Quinupristin-Dalfopristin among Isolates of *Enterococcus faecium* from Animals, Raw Meat, and Hospital Patients in Western Europe. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(2):433-436.
- Suzzi G., Caruso M., Gardini F., Lombardi A., Vannini L., Guerzoni M. E., Andrighetto C., Lanorte M. T. (2000) A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino). *Journal of Applied Microbiology*, 89:267-274.
- Švec P., Vancanneyt, Seman M., Snauwaert C., Lefebvre K., Sedláček I., Swings J. (2005) Evaluation of (GTG)₅-PCR for identification of *Enterococcus* spp.. *FEMS Microbiology Letters*, 247:59-63.
- Švec P., Vandamme P., Bryndová H., Holochová P., Kosina M., Maslanová I., Sedláček I. (2012) *Enterococcus plantarum* sp. nov., isolated from plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62:1499-1505.
- Tramer, E.J. (1969) Bird species diversity: components of Shannon's formula. *Ecology*, 50: 927-929.
- Top, J., Willems, R. e Bonten, M. (2008). Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 52: 297-308.
- Trieu-Cuot P., Cespédès G., Bentorcha F., Delbos F., Gaspar E., Horaud T. (1993) Study of Heterogeneity of Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT) Genes in Streptococci and Enterococci by Polymerase Chain Reaction: Characterization of a New CAT Determinant. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(12):2593-2598.
- Trivedi K., Cupakova S., Karpiskova R. (2011) Virulence factors and antibiotic resistance in enterococci isolated from food-stuffs. *Veterinarni Medicina*, 56(7):352-357
- Valenzuela A. S., Omar N. B., Abriouel H., López R. L., Ortega E., Cañamero M.M., Gálvez A. (2008) Risk factors in enterococci isolated from foods in Morocco: Determination of antimicrobial resistance and incidence of virulence traits. *Food and Chemical Toxicology*, 46:2648-2652.
- Valenzuela A. S., Omar N. B., Abriouel H., López R. L., Veljovic K., Cañamero M. M., Topisirovic M. K. L., Gálvez A. (2009) Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in enterococci from artisan foods of animal origin. *Food Control*, 20:381-385.

Vignaroli C., Zandri G., Aquilanti L., Pasquaroli S., Biavasco F. (2011) Multidrug-Resistant Enterococci in Animal Meat and Faeces and Co-transfer of Resistance from an *Enterococcus durans* to a Human *Enterococcus faecium*. *Current Microbiology*, 62:1438-1447.

Werner G. (2011) Surveillance of Antimicrobial Resistance among *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* Isolated from Human (Clinical/Commensal), Food Animal, Meat and Environmental Samples. In: Semedo-Lemsaddek T., Barreto-Crespo M. T., Tenreiro R. (Ed.) *Enterococcus and Safety*, Nova Science Publisher, New York.

Wirth R. (1994) The sex pheromone system of *Enterococcus faecalis*. More than just a plasmid-collection mechanism? *European Journal of Biochemistry*, 222(2):235-246.

Wisell K. T., Kahlmeter G., Giske C. G. (2008) Trimethoprim and enterococci in urinary tract infections: new perspective on an old issue. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62:35-40.

Yasufuku T., Shigemura K., Shirakawa T., Matsumoto M., Nakano Y., Tanaka K., Arakawa S., Kawabata M., Fujisawa M. (2011) Mechanisms of and Risk Factors for Fluoroquinolone Resistance in Clinical *Enterococcus faecalis* Isolates from Patients with Urinary Tract Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(11):3912-3916.

Yean C. Y., Yin L. S., Lalitha P., Ravichandran M. (2007) A nanoplex PCR assay for the rapid detection of vancomycin and bifunctional aminoglycoside resistance genes in *Enterococcus* species. *BMC Microbiology*, 7(112):1-8.

Zou L-K., Wang H-N., Zeng B., Li J-N., Li X-T., Zhang A-Y., Zhou Y-S., Yang X., Xu C-W., Xia Q-Q. (2011) Erythromycin resistance and virulence genes in *Enterococcus faecalis* from swine in China. *New Microbiologica*, 34:73-80.

Anexo A

	Primer	Tamanho do Produto (pb)	Gene/Locus	Estirpes Controlo	Alvo	Sequência	Referência
Identificação Género	Ent1 Ent2	112	Gene <i>Tuf</i> (fator de alongação EF-Tu)	<i>E. faecium</i> 2146 ^T , <i>E. faecalis</i> 20478 ^T , <i>E. durans</i> 20633 ^T , <i>E. hirae</i> 20160 ^T , <i>E. casseliflavus</i> 20680 ^T	<i>Enterococcus</i> spp.	5'-TACTGACAAACCATTTCATGATG-3' 5'-AACTTCGTACCAACGCGAAC-3'	Ke <i>et al.</i> (1999).
Fingerprinting	OPC19]200-3000[Sequência repetida aleatoriamente no genoma	<i>E. faecium</i> 2146 ^T , <i>E. faecalis</i> 20478 ^T , <i>E. durans</i> 20633 ^T , <i>E. hirae</i> 20160 ^T , <i>E. casseliflavus</i> 20680 ^T	n.a	5'-GTTGCCAGCC-3'	<i>unpublished</i>
	(GTG) ₅]200-3000[Micro-satélite		n.a	5'GTGGTGGTGGTGGTG-3'	Švec <i>et al.</i> (2005)
Identificação Espécies	ddlE1 ddlE2	941	ddl _{Ent.faecalis} (gene D-alanina-D-alanina ligase)	<i>E. faecalis</i> 20478 ^T e 20376	<i>E. faecalis</i>	5'-ATCAAGTACAGTTAGTCTT-3' 5'-ACGATTCAAAGCTAACTG-3'	Jurkovic <i>et al.</i> (2006)
	ddlF1 ddlF2	550	ddl _{Ent.faecium} (gene D-alanina-D-alanina ligase)	<i>E. faecium</i> 2146 ^T e 20477 ^T	<i>E. faecium</i>	5'-GCAAGGCTTCTTAGAGA-3' 5'-CATCGTGTAAAGCTAACTTC-3'	Jurkovic <i>et al.</i> (2006)
	mur2edF mur2edR	177	<i>mur-2ed</i> (gene muramidase)	<i>E. durans</i> 20633 ^T	<i>E. durans</i>	5'- AACAGCTTACTTGACTGGACGC-3' 5'-GTATTGGCGCTACTACCCGTATC-3'	Arias <i>et al.</i> (2006)
	CA1 CA2	288	<i>sodA</i> (gene superóxido dismutase)	<i>E. casseliflavus</i> 20680 ^T	<i>E. casseliflavus</i>	5'- TCCTGAATTAGGTGAAAAAAC-3' 5'- GCTAGTTTACCGTCTTTAACG-3'	Jackson <i>et al.</i> (2004)
Resistência Antibióticos	<i>brc</i> (B)	491	Gene de resistência à bacitracina	<i>E. faecalis</i> AR01/DG	<i>Enterococcus</i> spp.	5'-AAAGAAACCGACTGCTGATA-3' 5'-GCTTACTTGTATAGCAGAGA-3'	Maietti <i>et al.</i> (2007)

Resistência a Antibióticos	<i>erm</i> (B)	639	Gene de resistência à eritromicina	<i>E. faecalis</i> V583 e AR01/DG	<i>Enterococcus</i> spp.	5'-GAAAAGGTA CTCAACCAAATA-3' 5'-AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC-3'	Macovei e Zurek (2006)
	<i>tet</i> (M)	171	Gene de resistência à tetraciclina	<i>E. faecalis</i> AR01/DG	<i>Enterococcus</i> spp.	5'-ACAGAAAGCTTATTATATAAC-3' 5'-TGCGGTGTCTATGATGTTTAC-3'	Aminov <i>et al.</i> (2001)
	<i>van</i> (A)	931	Gene de resistência à vancomicina	<i>E. faecalis</i> AR01/DG	<i>Enterococcus</i> spp.	5'-TTGGGGGTTGCTCAGAGGAG-3' 5'-CTTCGTT CAGTACAATGCCG-3'	Yean <i>et al.</i> (2007)
	<i>van</i> (B)	536		<i>E. faecalis</i> V583	<i>Enterococcus</i> spp.	5'-AAGCTATGCAAGAAGCCATG-3' 5'-CCGACAATCAAATCATCTC-3'	Elsayed <i>et al.</i> (2001)
	<i>van</i> (C)	339		<i>E. faecalis</i> V583	<i>Enterococcus</i> spp.	5'-GCAGGTTCTGCCTATGTATGAA-3' 5'-ATGAAATGGCGTCAAGCA-3'	Yean <i>et al.</i> (2007)
	<i>cat</i> _{plP501}	1162	Gene de resistência ao cloranfenicol	<i>E. faecalis</i> RE25	<i>Enterococcus</i> spp.	5'-CCTGCGTGGGCTACTTTA-3' 5'-CAAACCACAAGCAACCA-3'	Maietti <i>et al.</i> (2007)
Fatores de Virulência	<i>agg</i>	1553	Substância de agregação	<i>E. faecalis</i> MMH594 e P36	<i>Enterococcus</i> spp.	5'- AAGAAAAAGAAGTAGACCAAC-3' 5'- AAACGGCAAGACAAGTAAATA-3'	Eaton e Gasson (2001)
	<i>cylA</i>	1282	Citolisina	<i>E. faecalis</i> MMH594 e P36	<i>Enterococcus</i> spp.	5'-TAGCGAGTTATATCGTTCACTGTA-3' 5'-CTCACCTCTTTGTATTTAAGCATG-3'	Semedo <i>et al.</i> (2003)
	<i>efaA_{fs}</i>	705	Adesina da parede celular da espécie <i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i> MMH594 e P36	<i>Enterococcus</i> spp.	5'-GACAGACCTCACGAATA-3' 5'-AGTTCATCATGCTGTAGTA-3'	Eaton e Gasson (2001)
	<i>esp</i>	933	Proteína de superfície de enterococos	<i>E. faecalis</i> MMH594 e P36	<i>Enterococcus</i> spp.	5'-TTGCTAATGCTAGTCCACGACC-3' 5'-GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA-3'	Eaton e Gasson (2001)
	<i>efaA_{fm}</i>	735	Adesina da parede celular da espécie <i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i> F10	<i>Enterococcus</i> spp.	5'-AACAGATCCGCATGAATA-3' 5'-CATTTTCATCATCTGATAGTA-3'	Eaton e Gasson (2001)
	<i>gelE</i>	419	Gelatinase	<i>E. faecalis</i> P36	<i>Enterococcus</i> spp.	5'- ACCCCGTATCATTGGTTT-3' 5'- ACGCATTGCTTTCCATC-3'	Eaton e Gasson (2001)
	<i>ccf</i>	543	Feromonas Sexuais	<i>E. faecalis</i> MMH594 e P36	<i>Enterococcus</i> spp.	5'-GGGAATTGAGTAGTGAAGAAG-3' 5'-AGCCGCTAAATCGGTAAAAT-3'	Eaton e Gasson (2001)
	<i>cob</i>	1405		<i>E. faecalis</i> MMH594 e P36	<i>Enterococcus</i> spp.	5'-AACATTAGCAAAACAAAGC-3' 5'-TTGTATAAAGAGTGGTCAT-3'	Eaton e Gasson (2001)
	<i>cpd</i>	782		<i>E. faecalis</i> MMH594 e P36	<i>Enterococcus</i> spp.	5'-TGGTGGGTTATTTTCAATTC-3' 5'-TACGGCTCTGGCTTACTA-3'	Eaton e Gasson (2001)
Controlo Interno da Reação	pA 907r	907	rRNA16S	n.a	<i>Enterococcus</i> spp.	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3'	Massol-Deya <i>et al.</i> , 1995

n.a, não aplicável

Anexo B

Tipo de Amostra	Local de Amostragem	Amostra	Código	Meio de Cultura	Tipo de Inóculo
Superfície	Queijaria	Avental dos trabalhadores (zona de embalamento)	ESAv-I	SBA	E
		Avental dos trabalhadores (zona de maturação)	ESAv-II	SBA	E
		Ralo (zona de preparação do queijo fresco)	ESRa-I	SBA	E
		Ralo (zona de maturação)	ESRa-II	SBA	E
		Moldes antes da higienização (sala suja)	ESMo	SBA	E
		Carrinhos (zona de preparação do queijo fresco)	ESCa-I	SBA	E
		Carrinhos (zona de maturação)	ESCa-II	-	-
		Cuba de corte do leite coagulado	ESCu	-	-
		Rampa (zona de maturação)	ESRam	SBA	E
		Puxador da porta I (zona de preparação do queijo fresco)	ESPu-I	-	-
		Puxador da porta (zona de maturação)	ESPu-II	-	-
		Pá de corte do coágulo (zona de corte)	ESPa-I	-	-
		Pá de corte do coágulo (zona da pega)	ESPa-II	-	-
		Luvas dos trabalhadores (zona de maturação)	ESLu-II	SBA	E
		Luvas dos trabalhadores (zona de embalamento)	ESLu-I	-	-
		Grelhas (zona de maturação)	ESGr	-	-
		Parede (zona de maturação)	ESPd	-	-
		Corrimão de apoio (zona de maturação)	ESCo	-	-
		Balde do Colorau	EACo	SBA	E
		Matadouro	Ralo zona de corte	ESMRal-I	SBA
	Ralo salsicharia		ESMRal-II	-	-
	Ralo zona picagem		ESMRal-III	SBA	B
				SBA+van	B
	Carcaça zona da cabeça		ESMCar-I	SBA	E
	Carcaça zona da coxa		ESMCar-II	-	-
	Carcaça rejeitada		ESMCar-III	SBA	E
				SBA+van	E
	Chão da zona de corte		ESMCh-I	SBA	E
	Chão do túnel de refrigeração		ESMCh-II	SBA	E
	Chão da triparia		ESMCh-III	SBA	E
	Caixote onde se colocam as tripas		ESMCTrip	SBA	B
	Caixa de transporte limpa		ESMCtra-I	SBA	E
	Caixa de transporte suja			SBA	B
			ESMCtra-II	SBA+van	E
				SBA	E
	Faca com manipulação		ESMFac-I	SBA+van	E
				-	-
	Faca com manipulação		ESMFac-II	-	-
	Maçaneta da porta da zona de corte		ESMMac	SBA	B
		SBA+van		B	
	Luvas com manipulação	ESMLuv	SBA	B	
			SBA+van	B	
Avental com manipulação	ESMAv	SBA	E		
		SBA+van	E		
Bancada da zona de corte	ESMBanc-I	SBA	B		
Bancada da zona da salsicharia	ESMBanc-II	-	-		

Alimentar	Hipermercado (antes da higienização)	Gancho	ESMGang	-	-
		Charcutaria avental	ESJCAv	-	-
		Charcutaria mão	ESJCM	SBA	E
		Charcutaria ralo lava loiça	ESJCRI	-	-
		Charcutaria máquina fatiar queijo	ESJCMQ	-	-
		Charcutaria máquina fatiar fiambre	ESJCMF	-	-
		Talho luva	ESJTLuv	SBA	E
		Talho avental	ESJTAv	SBA	E
		Talho faca	ESJTFac	-	-
		Talho bancada	ESJTBanc	SBA	B
		Talho ralo lava loiça	ESJTRI	SBA	E
		Talho ralo	ESJTRal	-	-
		Peixaria faca	ESJPFac	SBA	E
		Peixaria luva	ESJPLuv	-	-
		Peixaria balança	ESJPBal	SBA	E
		Peixaria avental	ESJPAv	SBA	E
		Peixaria ralo	ESJPRal	-	-
		Gastronomia ralo lava loiça	ESJGRI	SBA	E
		Gastronomia máquina fatiar leitão	ESJGML	-	-
		Gastronomia tesoura carne	ESJGTC	SBA	E
	Gastronomia mão	ESJGM	SBA	E	
	Gastronomia tabuleiro	ESJGTab	-	-	
	Hipermercado (após higienização)	Charcutaria ralo lava loiça	ESJCRIN	-	-
		Charcutaria máquina fatiar queijo	ESJCMQN	-	-
		Charcutaria máquina fatiar fiambre	ESJCMFN	-	-
		Talho faca	ESJTFacN	-	-
		Talho bancada	ESJTBancN	-	-
		Talho ralo	ESJTRalN	-	-
		Peixaria faca	ESJPFacN	-	-
		Peixaria balança	ESJPBalN	-	-
		Peixaria ralo	ESJPRalN	-	-
		Gastronomia ralo lava loiça	ESJPRIN	-	-
		Gastronomia máquina fatiar leitão	ESJGMLN	-	-
		Gastronomia tesoura carne	ESJGTCN	SBA	E
Gastronomia tabuleiro		ESJGTabN	SBA	E	
Gastronomia ralo lava loiça		ESJGRLN	SBA	E	
Alimentar	Queijaria	Queijo de cabra curado	EAQcc	SBA	E
		Queijo de vaca e ovelha curado apimentado	EAQca	SBA	E
		Queijo fresco de ovelha	EAQf	SBA	E
		Leite pasteurizado	EALp	SBA	E
		Leite cru	EALc	SBA	E
		Soro de leite	EASI	SBA	B
		Salmoura	EASal	SBA	E
	Hipermercado	Carapau Portugal	EAJCP	-	-
		Carne	EAJCar	SBA	B
		Sandes pão integral	EAJSan	SBA	E
		Lombo assado	EAJLom	SBA	B
		Sandes Americana	EASan	SBA	E
		Chouriço	EACHo	SBA	B
	Água	Queijaria	Água não tratada	H ₂ Otrat.	SBA
Água tratada			H ₂ Otrat	-	-

SBA, Slanetz and Bartley; **SBA+van**, Slanetz and Bartley suplementado com vancomicina (10µg/mL); E, inóculo enriquecido; **B**, inóculo não enriquecido; -, não aplicável

Anexo C

TODAS

(GTG)5

OPC19

Antibiograms

Virulence factors

Virulence factors - PCR an

