

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

**Pesquisa de *Enterococcus* spp. resistentes a antimicrobianos e
formadores de biofilme em queijo de coalho**

MARIA GORETTI VAREJÃO DA SILVA

Recife

2020

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

MARIA GORETTI VAREJÃO DA SILVA

Pesquisa de *Enterococcus* spp. resistentes a antimicrobianos e formadores de biofilme em queijo de coalho

Trabalho de Dissertação apresentado ao Programa de Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Elizabeth Sampaio de Medeiros

Recife

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586p

Silva, Maria Goretti Varejão da

Pesquisa de *Enterococcus* spp. resistentes a antimicrobianos e formadores de biofilme em queijo de coalho / Maria Goretti Varejão da Silva. - 2020.

50 f. : il.

Orientadora: Elizabeth Sampaio de Medeiros.

Inclui referências.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, 2020.

1. Adesão bacteriana. 2. Saúde pública. 3. Segurança de alimentos. 4. Resistência bacteriana. I. Medeiros, Elizabeth Sampaio de, orient. II. Título

CDD 636.089

Maria Goretti Varejão da Silva

Pesquisa de *Enterococcus* spp. resistentes a antimicrobianos e formadores de biofilme em queijo de coalho

Trabalho de Dissertação apresentado ao Programa de Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

Aprovada em: 04/02/2020

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Elizabeth Sampaio de Medeiros

(Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE)

Orientadora

Profa. Dra. Erika Fernanda Torres Samico Fernandes Cavalcanti

(Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE)

Membro Titular

Profa. Dra. Neila Mello dos Santos Cortez

(Departamento de Engenharia de Alimentos da UFPE)

Membro Titular

Dra. Fernanda Maria Lino de Moura

(Médica Veterinária)

Suplente

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à Deus por tudo na minha vida.

Aos meus pais José Camilo (*in memoriam*) e Maria Valdenice por tudo o que fizeram por mim.

Ao meu marido Aginaldo Almeida por tudo que fez e faz por mim.

Ao meu irmão Mário Henrique, cunhada Joelma Silva e sobrinha Juliana Silva por tudo que fizeram e fazem por mim sempre que precisei.

Ao meu primo Ivan Azevedo e sua esposa Rosilda Azevedo pelo apoio e ajuda.

À minha amiga irmã Ana Albertina por toda ajuda que precisei e você sempre com um sorriso no rosto me ajudou.

Às minhas amigas e companheiras de pesquisa Fernanda Moura, Jéssica Andrade e Nataly Melo. Valeu por toda ajuda, força, palavras, que não tenho como agradecer.

À amiga Cleide Lima sempre me ouvindo e me ajudando quando precisei.

Ao amigo Carlos Adriano Leal pela ajuda e conselhos.

Ao amigo Raylson Oliveira pelo incentivo sempre.

A minha orientadora Professora Elizabeth Medeiros pela oportunidade e ajuda nessa jornada.

Às Professoras Andrea Paiva e Maria Betânia do Laboratório de Inspeção de Carne e Leite.

Ao Programa da Biociência Animal pelos novos conhecimentos adquiridos e crescimento pessoal.

A todas as pessoas do Laboratório de Inspeção de Carne e Leite que me ajudaram nesse período de estudos e crescimento, meu muito obrigada.

A todos os Professores do Programa que me emprestaram seus conhecimentos. Grata pela paciência e ajuda.

Gratidão a todos que me estenderam a mão!

RESUMO

Objetivou-se pesquisar *Enterococcus* spp. resistentes a antimicrobianos e formadores de biofilme em queijo de coalho, embalado na indústria, comercializado em hipermercados da cidade de Recife, Pernambuco. A técnica de pesquisa microbiológica empregada foi em conformidade com as normas NP 2079 com pequenas alterações. Verificou-se o crescimento de colônias características de *Enterococcus* spp. em meio ágar Slantz and Bartley em todas as amostras adquiridas. De 36 isolados de *Enterococcus* spp. foram identificadas três espécies bacterianas, sendo 44,4% de *Enterococcus faecalis*, 44,4% de *Enterococcus faecium* e 11,2% de *Enterococcus durans*. No método de disco-difusão para verificação da susceptibilidade aos antimicrobianos observou-se maior percentual de resistência, incluindo também a intermediária, na eritromicina (63,9%), seguido de nitrofurantoína (36,2%), tetraciclina (22,3%), vancomicina (2,7%) e ciprofloxacina (2,7%). Quanto à capacidade formadora de biofilme dos isolados de *Enterococcus* spp., não houve nenhum forte formador de biofilme, mas obteve-se fracos formadores de biofilme em 77,8% e moderados formadores de biofilme em 22,2%, no total das três espécies encontradas, e nenhum isolado estudado foi negativo quanto a capacidade de formar biofilme. A alta contaminação desse tipo de queijo analisado sugere possível falha nas boas práticas, desde a ordenha até a comercialização, onde se tem um produto pronto para consumo, sem desconsiderar a presença de *Enterococcus* spp. como elemento existente na fabricação do mesmo, sendo também relevante o potencial formador de biofilme por esse microrganismo devido à formação do mesmo provocar alterações fenotípicas de células planctônicas, que podem ser descritas como estratégias de sobrevivência dos microrganismos. Mais estudos microbiológicos em queijo de coalho deverão ser realizados devido a sua importância para economia e saúde pública.

Palavras chave: Adesão bacteriana; infecções nosocomiais; microrganismos emergentes; resistência antimicrobiana; saúde pública; segurança de alimentos.

ABSTRACT

The objective was to search for *Enterococcus* spp. resistant to antimicrobials and biofilm-forming in rennet cheese, packaged in the industry, sold in hypermarkets in the city of Recife, Pernambuco. The microbiological research technique employed was in accordance with the NP 2079 standards with minor changes. The growth of colonies characteristic of *Enterococcus* spp. on Slantz and Bartley agar in all acquired samples. From 36 isolates of *Enterococcus* spp. three bacterial species were identified, 44.4% of *Enterococcus faecalis*, 44.4% of *Enterococcus faecium* and 11.2% of *Enterococcus durans*. In the disk-diffusion method to check susceptibility to antimicrobials, a higher percentage of resistance was observed, including also the intermediate, in erythromycin (63.9%), followed by nitrofurantoin (36.2%), tetracycline (22.3%), vancomycin (2.7%) and ciprofloxacin (2.7%). Regarding the biofilm-forming capacity of *Enterococcus* spp. Isolates, there was no strong biofilm-forming agent, but weak biofilm-forming agents were obtained in 77.8% and moderate biofilm-forming agents in 22.2%, in the total of the three species. found, and no isolate studied was negative in terms of the ability to form biofilm. The high contamination of this type of cheese analyzed suggests a possible failure in good practices, from milking to commercialization, where a product is ready for consumption, without disregarding the presence of *Enterococcus* spp. as an existing element in the manufacture of the same, being also relevant the biofilm-forming potential by this microorganism due to its formation causing phenotypic changes in planktonic cells, that can be described as microorganism survival strategies. Further microbiological studies on rennet cheese should be carried out due to its importance for the economy and public health.

Key words: Bacterial adhesion; nosocomial infections; emerging microorganisms; antimicrobial resistance; public health; food safety.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 Importância do leite e queijo no Brasil.....	13
2.2 <i>Enterococcus</i> spp.....	15
2.3 Resistência a antimicrobianos e <i>Enterococcus</i> spp.....	17
2.4 Infecção nosocomial e <i>Enterococcus</i> spp.....	21
2.5 Biofilme – formação.....	22
2.6 Formação de biofilme por <i>Enterococcus</i> spp.....	24
3. OBJETIVOS.....	25
3.1 Geral.....	26
3.2 Específicos.....	26
4. REFERÊNCIAS.....	27
5. ARTIGO CIENTÍFICO.....	35
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADAGRO Agência de Defesa e Fiscalização Agropecuária de Pernambuco

AMR Resistência Antimicrobiana

ATCC® American Type Culture Collection

BAL Bactérias Ácido Lácticas

BPF Boas Práticas de Fabricação

CDC Center for Disease Control and Prevention

CLSI Clinical Laboratory Standards Institute

CO₂ Gás Carbônico

DNA Ácido Desoxirribonucleico

DO Densidade Óptica

DO_{CN} Densidade Óptica do Controle Negativo

DO_{IS} Densidade Óptica do isolado

EPS Exopolissacarídeos

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IHs Infecções Hospitalares

mL Mililitro

MAPA Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MRSA *Staphylococcus aureus* Resistentes a Meticilina

MS Ministério da Saúde

nm Nanômetro

NP Normas Portuguesas

pH Potencial Hidrogeniônico

QS Quorum Sensing

TSA Teste de Susceptibilidade antimicrobiana

TSB Caldo Triptona Soja

UFC Unidade Formadora de Colônia

vanA Gene de Resistência à Vancomicina

VRE *Enterococcus* Resistentes à Vancomicina

µg Micrograma

µL Microlitro

> Maior

< Menor

≥ Maior ou Igual

≤ Menor ou Igual

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Susceptibilidade antimicrobiana de amostras de <i>Enterococcus</i> spp. isoladas de queijo de coalho	44
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Formação de biofilme	24
Figura 2 Localização dos pontos de coleta.....	39

1. INTRODUÇÃO

O queijo de coalho é um alimento típico do Brasil, presente na Região Nordeste a mais de 150 anos e bastante consumido nessa região, elaborado a partir de leite cru ou pasteurizado. Estados como Pernambuco, Ceará, Rio Grande do Norte e Paraíba são os principais produtores deste tipo de queijo, sendo sua importância na economia considerável e significativa na renda dos fornecedores de leite, principalmente os que não têm acesso a unidades de processamento de leite (SILVA et al., 2012).

Os enterococos, bactérias Gram-positivas isoladas do solo, águas superficiais e água do mar, também em associação com plantas, estão presentes em produtos alimentares fermentados, são bactérias ácido lácticas (BAL), são amplamente utilizadas como culturas iniciadoras na indústria de laticínios para a fabricação de queijo, iogurtes e leites cultivados (GIRAFFA, 2003; GIRAFFA e ROSSETTI, 2004).

Geralmente não ocasionam efeitos adversos em indivíduos saudáveis, no entanto, também podem se apresentar como patógenos oportunistas relacionados às infecções nosocomiais, particularmente em pacientes imunocomprometidos (LOSSOUARN et al., 2019).

As infecções nosocomiais, causadas pela microbiota intra-hospitalar e, às vezes, condicionadas pela microbiota do pessoal de saúde e pelo próprio paciente, são um problema de grande importância clínica e epidemiológica. Por ocasionarem altos índices de morbidade e mortalidade, além de extensão dos dias de hospitalização e desperdício dos recursos econômicos, são consideradas uma situação emergente em todo o planeta (MONTROYA et al., 2015).

Além disso, a resistência intrínseca de *Enterococcus* spp. a diversos antimicrobianos e a aquisição de resistência a outros, como a vancomicina, frequentemente empregada no tratamento de pacientes com infecções graves por bactérias Gram-positivas, levou à emergência de *E. faecalis* como um patógeno nosocomial relevante (ANDRADE, 2018). O gênero *Enterococcus* spp. é de acordo com Hollenbeck e Rice (2012), descrito como causa de pelo menos 10% das infecções hospitalares e as principais espécies associadas a estas infecções, *E. faecalis* (85-90 %) e *E. faecium*, apresentam resistência intrínseca a diversos antimicrobianos, como β -lactâmicos (penicilina e cefalosporinas), aminoglicosídeos

(estreptomicina), lincosamidas (clindamicina, em *E. faecalis*), estreptograminas (a combinação quinupristin-dalfopristin, em *E. faecalis*) e sulfametoxazol-trimetoprima.

A utilização desregrada de fármacos antimicrobianos desencadeou o aumento de cepas resistentes aos tratamentos e este cenário se torna mais preocupante quando os microrganismos se apresentam na forma de biofilme. Estruturas complexas de aglomerados microbianos protegidos por uma camada de exopolissacarídeos (EPS), os biofilmes impedem a penetração dos fármacos e dificultam o tratamento das infecções (COSTERTON et al., 1999; URQUHART et al., 2019).

Apesar do exposto, observa-se ainda uma carência de registros na literatura a respeito de *Enterococcus* spp. resistentes a antimicrobianos e formadores de biofilme isolados de alimentos de origem animal. Desta forma, torna-se relevante a pesquisa desses microrganismos com essas características em alimentos de origem animal.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Importância do leite e queijo no Brasil

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2018), a produção de leite no Brasil gera grande impacto no cenário mundial, sendo o quinto país com a maior produção no mundo, perdendo posição apenas para União Europeia, Estados Unidos, Índia e China.

Os laticínios sob serviço de inspeção sanitária no Brasil captaram 24,45 bilhões de litros de leite em 2018, um acréscimo de 0,5% em relação a 2017 (IBGE, 2019), sendo esse fator muito importante, pois o leite é um produto rico em constituintes nutritivos e energéticos, é um alimento considerado completo, sendo o seu consumo recomendado para pessoas de todas as faixas etárias. Produzido em todo o mundo, o leite é largamente utilizado na alimentação infantil, sendo um alimento de primeira linha no combate à mortalidade infantil nos países em desenvolvimento (LUNA, 2012).

O queijo consiste em um produto maturado ou fresco adquirido a partir do isolamento parcial ou total do soro do leite, leite reconstituído ou soro de lácteos, coagulado com auxílio de enzimas, coalho, bactérias ou de ácidos orgânicos isolados ou combinados (BRASIL, 1996).

Devido as suas propriedades sensoriais e nutritivas, o queijo é um derivado lácteo tradicional com grande aceitação no mercado, apresentando-se para consumo com diversas variedades que se diferenciam quanto ao tipo, sabor, cor, forma e aroma, buscando agradar aos múltiplos paladares dos seus consumidores (NOGUEIRA, 2006).

Os queijos são alimentos de alto valor biológico, ricos em proteínas, cálcio, fósforo, zinco, iodo, selênio, vitaminas e oligoelementos, existindo em todo o mundo mais de 1.000 tipos, feitos a partir de diferentes tipos de leites e processos de produção diferenciados (LÁCTEA BRASIL, 2006).

Com o desenvolvimento tecnológico, surgiram em nível nacional muitas variedades, sendo algumas de expressão regional como o queijo de coalho (BORGES et al., 2003). De acordo com Andrade (2006), o seu nome deriva do

processo de coagulação, observado pela primeira vez, conforme aponta a história, devido a ação de enzimas coagulantes existentes no estômago de animais herbívoros.

Um dos produtos típicos da região Nordeste, o queijo de coalho, tem um relevante valor cultural e socioeconômico, faz parte da composição da alimentação diária, sendo comumente consumido como aperitivo, ou ainda como complemento alimentar. O seu fabrico passa de geração em geração, na maioria das vezes de forma artesanal, utilizando o conhecimento prático tradicional transmitido dentro do ambiente familiar (SOUZA et al., 2014).

Quando elaborado de forma artesanal, tem na sua produção, conforme seu fabricante, algum tipo de adaptação de acordo com suas habilidades, estrutura física e econômica. Como resultado, os queijos produzidos apresentam características organolépticas que atribuem a eles uma identidade regional e cultural própria de cada região (MENEZES, 2013).

O queijo de coalho, tanto o artesanal quanto o industrializado, por ser um produto bastante manipulado e muitas vezes elaborado sob condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, pode não apresentar segurança microbiológica e padronização (ANDRADE, 2006), sendo tido como um alimento muito predisposto a contaminação (SANTANA et al., 2008).

Com o intuito de regulamentar a sua produção, encontram-se disponíveis algumas legislações, tais como: o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos, que estabelece os padrões de identidade e os requisitos mínimos de qualidade que o queijo de coalho deve apresentar para ser destinado ao consumo humano (FREITAS FILHO et al., 2009). A lei federal nº 13.860 de 18/07/2019 sancionada pelo Presidente da República do Brasil dispõe sobre a elaboração e a comercialização de queijo artesanal e a correlata produção leiteira, já a Portaria da ADAGRO nº 007 de 04/01/2018 aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do queijo de coalho artesanal em Pernambuco (Imprensa Nacional, 2019; DOE Pernambuco, 2018).

O queijo industrializado (tipo A) segue as normas do MAPA como a Instrução Normativa nº 5 de 14/02/2017 que dispõe sobre os requisitos para avaliação de equivalência ao Sistema Unificado da Atenção à Sanidade Agropecuária relativos à

estrutura física, dependência e equipamentos de estabelecimentos agroindustrial de pequeno porte de produtos de origem animal. E finalizando, a Portaria 368/97 do MAPA trata do Regulamento técnico sobre condições higiênicas sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para estabelecimentos elaboradores/industrializadores de alimentos.

2.2. *Enterococcus* spp.

Bactérias do gênero *Enterococcus* spp. são cocos Gram-positivos, ovalados, formando cadeias curtas, pertencentes à família *Enterococcaceae* e possuem 58 espécies descritas (PARTE, 2014). Por serem facultativos crescem tanto em ambientes com oxigênio, quanto em ambientes com a redução do mesmo. São microrganismos extremamente resilientes a diferentes condições ambientais, suportando temperaturas variantes de 10 e 45°C, em ambientes hipertônicos, até 6,5% de cloreto de sódio, como também em hipotônicos, em pH variante do ácido até básico (pH entre 4 e 9,6) e resistem a 60°C por até 30 minutos (KONEMAN et al., 2014).

O termo *Enterococcus* foi relatado pela primeira vez por Thiercelin em 1899, quando descreveu bactérias comensais com capacidade de se tornarem patogênicas. Devido a sua morfologia e algumas semelhanças bioquímicas, os enterococos foram considerados inicialmente pertencentes ao gênero *Streptococcus* (SOLACHE, 2019).

São cocos anaeróbios facultativos, formam cadeias de vários comprimentos. São comensais habitantes do trato gastrointestinal de seres humanos e outros mamíferos com a capacidade de sobreviver em ambientes como os hospitais (ARIAS e MURRAY, 2012).

Os *Enterococcus* spp. e suas espécies são de origens diversas, como meio ambiente, fonte animal e humana. Esses microrganismos são de grande importância pois fazem parte da microbiota normal de animais e humanos, tendo sua distribuição de forma semelhante nos mesmos (FISCHER e PHILLIPS, 2009), constituem um complexo grupo de bactérias, que desempenham papel dúbio em alimentos pois enquanto algumas linhagens são utilizadas como culturas starter em queijos e alimentos enlatados, conferindo sabor, odor e textura a esses produtos, outras

cepas estão relacionadas com a deterioração de alimentos como potencial reservatório de enterococos que albergam determinantes de virulência e resistência (TERRA et al., 2018).

A partir da contaminação fecal, pele de animais, água, equipamentos de ordenha e tanques de expansão os *Enterococcus* spp. podem contaminar o leite e seus derivados. As bactérias do gênero *Enterococcus* são frequentemente encontradas em leite e derivados, principalmente em queijos, devido a características como resistência à pasteurização, por serem termorresistentes, e à refrigeração, por serem psicotróficas (PORTO et al., 2016).

Os *Enterococcus* spp. fazem parte da microbiota envolvida em vários processos fermentativos em alimentos, tais como aqueles que envolvem leite, carne e vegetais, são componentes naturais dos alimentos, representando papel importante no amadurecimento e realce do sabor de queijo, esses microrganismos possuem uma ampla adaptabilidade para suportar condições adversas como temperatura, pH, hiperosmolaridade e dessecação prolongada (ALI et al., 2014).

Sua presença nos alimentos tem sido motivo de preocupação para os órgãos de saúde pública principalmente por possuir característica ambígua (MORAES et al., 2012). No aspecto positivo tem o desenvolvimento de propriedades sensoriais, através de reações bioquímicas durante a maturação: proteólise, lipólise, utilização do citrato e produção de compostos aromáticos voláteis (HUGAS et al., 2003; JAMET et al., 2012), por outro lado, têm se tornado importantes patógenos humanos entre pacientes hospitalizados, (LECLERQ, 2009; ROSENTHAL et al., 2015; SIEVERT et al., 2013), também idosos com doenças graves subjacentes (ARCHAMBAUD et al., 2019), nos últimos anos está associado à bacteremia, à sepsis e à endocardite bacteriana (HEIDARI et al., 2017), essas infecções podem originar-se da microbiota normal, podem também ser transferidos de paciente para paciente ou adquiridos através do consumo de água ou alimentos contaminados (MURRAY et al., 2004).

Os *Enterococcus* spp. foram inicialmente classificados como *Streptococcus* do grupo D devido suas espécies possuírem, associados a sua membrana citoplasmática, o antígeno da parede celular do grupo D (TEIXEIRA e MERQUIOR, 2013).

Dentre as mais de 50 espécies do gênero *Enterococcus* spp., *E. faecalis* e *faecium* são mais frequentemente isoladas de humanos, animais e amostras de alimentos. De 80 a 90% dos *Enterococcus* spp. isolados de amostras clínicas no homem são da espécie *E. faecalis*, 5 a 15 %, *E. faecium*, mas outras espécies também podem ocasionalmente serem identificadas nesses isolados como *E. hirae*, *E. durans*, *E. gallinarum* ou *E. casseliflavus* (SILVA et al., 2012), dentre esses, o *Enterococcus durans*, é comumente encontrado em produtos lácteos e no trato intestinal de animais domésticos, associado com encefalomalácia e diarreia em animais. Porém ao contrário de *E. faecalis* ou *E. faecium*, *E. durans* não é um patógeno comum em humanos (BYUNG et al., 2019).

2.3. Resistência a antimicrobianos e *Enterococcus* spp.

O surgimento de resistência aos antimicrobianos por enterococos e sua difusão em alimentos sugerem uma situação de risco para a saúde pública, e também deve ser considerada uma possível correlação entre cepas presentes nos hospitais com aquelas isoladas de alimentos (RIBOLDI et al., 2009).

O aparecimento da multirresistência bacteriana no ambiente hospitalar tem sido crescente nas últimas décadas, aumentando a morbimortalidade, período de internação, conseqüentemente os custos com os cuidados de saúde, desafiando a saúde pública e elevando cada vez mais as prescrições de antibióticos (LÍRIO et al., 2019).

Entre os principais patógenos bacterianos hospitalares que são resistentes a antibióticos disponíveis encontra-se o gênero *Enterococcus*, cujas infecções representam dificuldades terapêuticas reais (BLANCO et al., 2016).

A resistência antimicrobiana (AMR) cresce mundialmente e ameaça a prevenção e a cura de infecções. Em 2016, a resistência aos antimicrobianos foi responsável por 70.000 mortes e estima-se que em 2050 esta causará até 10 milhões de mortes anuais. Essa estimativa baseia-se na realidade encontrada hoje de uso excessivo de antibióticos, tratamentos incompletos, descuido no controle de infecção, saneamento precário em países em desenvolvimento e a globalização que permite a distribuição dos microrganismos facilmente pelo mundo. Esses fatores contribuem para a AMR,

que unida aos poucos antibióticos em desenvolvimento, resultam em infecções desprovidas de tratamento (BELLO e DINGLE, 2018).

Sabe-se que os *Enterococcus* spp. tendem a sofrer seleção a cada aplicação de antimicrobiano, levando à formação de um reservatório animal de *Enterococcus* spp. resistentes, que podem infectar os seres humanos tanto por contato direto com animais como através da ingestão de alimentos de origem animal (KASZANYITZKY et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2010; VIGNAROLI et al., 2011).

A resistência genética a substâncias danosas é um processo natural de proteção de algumas espécies bacterianas que, em alguns casos, foram predeterminados há milhões de anos (BARLOW e HALL, 2002; LEBRETON et al., 2017). Contudo, o uso excessivo e indiscriminado dos antibióticos tanto no tratamento de infecções humanas como na pecuária resultou no aumento exponencial da taxa de resistência. Atualmente, a resistência bacteriana é considerada um dos maiores problemas relacionados à saúde pública associados à morbidade e à letalidade (OLIVEIRA, 2019).

Sugere-se que o uso de antimicrobianos na alimentação animal como promotores de crescimento, criou grandes reservatórios de genes de resistência a antibióticos transferíveis em vários ecossistemas e, conseqüentemente, uma possível rota de transmissão de *Enterococcus* spp. resistentes via cadeia alimentar (SHEPARD e GILMORE, 2002).

O gênero *Enterococcus* spp. tem sua relevância clínica baseada não somente na sua crescente prevalência nas últimas décadas, mas também no elevado índice de linhagens resistentes aos antibióticos (MEDEIROS, 2011). Riboldi et al. (2009) ao analisarem alimentos “in natura” e produtos lácteos obtidos em Porto Alegre-RS, Brasil, observaram uma alta frequência de resistência a antimicrobianos usados na agricultura, também foi encontrada incidência de resistência a nitrofurantoína, antimicrobiano usado no tratamento de infecções genitourinárias, em isolados de queijo e repolho.

Apesar de revolucionarem as práticas médicas, estando entre os maiores avanços do século passado, os agentes antimicrobianos possuem período limitado na utilidade clínica devido ao surgimento do aspecto de resistência (LUO et al., 2019).

O aumento da resistência aos antimicrobianos é um problema crescente, não somente no ambiente hospitalar, mas também para pacientes não-hospitalizados (PÓVOA et al., 2019), pois atinge de forma intensa a prevenção e o tratamento satisfatório de um número significativo de infecções causadas por bactérias, parasitas, vírus e fungos (CAMACHO et al., 2018).

O uso inadequado dos antimicrobianos pode agravar uma infecção e levar ao desenvolvimento de resistência bacteriana no tratamento da mesma (OLIVEIRA e OLIVEIRA, 2014). Tendo uma reflexão mais profunda do assunto, sabe-se que existe a resistência natural, que é importante, porém a atitude humana de se usar de forma racional os antimicrobianos pode resultar em uma reversão nesse aspecto de resistência, ganhando com isso, principalmente, a saúde pública (CAMACHO et al., 2018).

Um dos maiores problemas de saúde pública que é a resistência aos antimicrobianos, tem alta relevância clínica pois dificulta o controle de doenças infecciosas quando diminui a eficácia terapêutica, levando ao aumento da taxa de morbimortalidade, sem contar que traz elevados custos nos cuidados de saúde, ainda podendo promover a transmissão de infecções a outros indivíduos (MONTEMAYOR et al., 2014). Nos serviços hospitalares, especialmente, dos países em desenvolvimento, tem-se um grave problema de saúde que é o surgimento da resistência bacteriana aos antibióticos (PEREIRA et al., 2013).

No âmbito da saúde, desde 1944, onde houve a identificação dos primeiros casos de resistência bacteriana, foi possível observar a rápida evolução desse episódio. Após 38 anos da criação da vancomicina para uso clínico, em 1988 na Europa, detectou-se enterococos resistentes a esse antimicrobiano. Nos Estados Unidos, em 2002, os *Staphylococcus aureus* apresentavam o mesmo perfil de resistência dos enterococos, tendo um agravante que era o uso da vancomicina, como antibiótico de escolha para o tratamento do *Staphylococcus aureus* na maioria das infecções provocadas por este microrganismo (DERDE et al., 2012). No Brasil, o panorama da resistência bacteriana é preocupante, e o crescente surgimento de novas cepas de bactérias multirresistentes nos hospitais vêm causando preocupação entre os profissionais de saúde (COSTA, 2013).

Os mecanismos de resistência de muitos microrganismos frente aos antibióticos são variáveis, tendo aspectos fisiopatológicos diversos, como os das enzimas como

as β -lactamases que destroem as penicilinas e algumas cefalosporinas, outras enzimas modificadoras inativam o cloranfenicol e os aminoglicosídeos, como a estreptomicina e a gentamicina. Outro mecanismo de resistência é direcionado para a forma de transporte de antibiótico como a resistência a tetraciclina, cloranfenicol e fluoroquinolonas. Um terceiro tipo de mecanismo altera a droga intracelularmente, por exemplo, o ribossomo, enzimas metabólicas ou proteínas envolvidas no DNA, replicação ou síntese da parede celular, fazendo com que o antibiótico não iniba uma função vital na célula microbiana. Mais de um tipo de mecanismo pode fornecer resistência ao mesmo antibiótico (NIKAIDO, 1996; LEVY e MARSHALL, 2004).

O crescimento dos *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina (VRE) em ambientes hospitalares é de grande preocupação, pois o VRE tem a capacidade de transmitir essa sua resistência a outros microrganismos, até mesmo o *Staphylococcus* spp. resistente à meticilina (MRSA), motivo esse responsável pelo seu rastreamento e investigação intensa nas unidades hospitalares (FARON et al., 2016).

Segundo Terra et al. (2018), em *Enterococcus* spp. a resistência antimicrobiana ocorre principalmente por meio de alterações no sítio-alvo dos antimicrobianos e pode ocorrer por diferentes mecanismos: alteração na parede celular, alteração na membrana celular, alteração da síntese protéica, alteração da inibição da síntese de DNA, inibição competitiva da síntese de ácido fólico e inibição da síntese de RNA.

Segundo o Center for Disease Control and Prevention CDC (2019), por muitos anos, a única opção terapêutica para tratar infecções por *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina foi a vancomicina. O gene de resistência à vancomicina mediado por plasmídeo, *vanA*, é regularmente encontrado em isolados de resistência à vancomicina associados a cuidados médicos para enterococos. Portanto, há uma grande oportunidade para a transferência de genes enterocócicos resistentes à vancomicina para *S. aureus* em pacientes ou locais onde os organismos coexistem. Nos últimos 15 anos, novos medicamentos como daptomicina, linezolida e oritavancina chegaram para o tratamento de resistência a infecções Gram-positivas. Embora a resistência a estes tenha sido confirmada em alguns casos, eles têm uma atividade consideravelmente alta contra o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e têm o potencial para tratar *S. aureus* resistente à vancomicina.

Sistemas padronizados para monitorar o uso de antibióticos é um requisito essencial como parte de uma estratégia de controle de resistência a antibióticos. O uso de antibióticos pode ser quantificado em ambiente hospitalar para conhecer os custos, sensibilidade e susceptibilidade a antibióticos de rotina em cada serviço de saúde (TERÁN et al., 2018). Três aspectos importantes para o sucesso no combate a resistência aos antimicrobianos, seriam de acordo com a literatura, otimizar a administração de agentes antimicrobianos existentes, prevenir a transmissão de organismos resistentes a drogas através do controle de infecção e diminuir a contaminação ambiental (DAVEY et al., 2017).

2.4. Infecção nosocomial e *Enterococcus* spp.

De acordo com a Portaria MS nº 2616/1998 (BRASIL, 1998), infecção nosocomial é aquela adquirida após a admissão do paciente e que se manifesta durante a internação ou após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares. Para Monteiro (1993), esta infecção pode ser definida como toda infecção relacionada com o internamento em estabelecimentos de saúde, o paciente não estando com a patologia em incubação quando da sua entrada no hospital, a não ser que tenha havido prévia hospitalização relacionada a mesma.

As Infecções Hospitalares (IHs) constituem-se em um problema de saúde pública tanto pela morbimortalidade que podem ocasionar, quanto pelos custos sociais e econômicos associados, podem ser definidas enquanto doenças que atingem o paciente durante a internação ou após a sua alta hospitalar. O Center for Disease Control and Prevention (CDC) ressalta que a infecção não deve estar presente em período de incubação durante a internação ou relacionada com hospitalizações anteriores (COSTA et al., 2019).

A presença de determinantes genéticos que codificam mecanismos de resistência a antimicrobianos empregados na clínica médica é a base para a capacidade de colonização e persistência em ambientes hospitalares (TERRA et al., 2017).

Mesmo sendo parte do trato gastrointestinal, os *Enterococcus* spp. são considerados agentes oportunistas que frequentemente causam infecções hospitalares. Dentre as espécies que mais causam patogêneses está *Enterococcus*

faecalis com um índice de 90% e *Enterococcus faecium* com 10% (KRAHN e FACHINETTO, 2019). Os enterococos são considerados agentes patogênicos oportunistas que frequentemente causam infecções em pacientes hospitalizados por um longo período de tempo e / ou são tratados com diversos antibióticos (REIS et al., 2001), e podendo essas infecções serem no trato gastrointestinal, trato urinário, lesões de pele, coração e sangue (KAO e KLINE, 2019).

As espécies de *Enterococcus* spp. têm a capacidade de se adaptar vastamente, facilitando a sua colonização em ambientes hospitalares, podendo levar a contaminação de pacientes (LEBRETON et al., 2014). Por ser um microrganismo oportunista é preocupante que nos últimos anos estudos tenham comprovado um aumento gradativo na detecção de fatores de virulência no gênero *Enterococcus* spp. de isolados de origem clínica, fazendo também com que a detecção desses genes de virulência sejam observados em cepas isoladas de amostras alimentares (WHO, 2017).

Segundo Teixeira (2019) a formação de biofilme em dispositivos hospitalares, consequência da capacidade de adesão dos microrganismos a superfícies, tem levado a um crescente desenvolvimento de infecções nosocomiais que representa um problema de saúde pública. Também segundo Fleming et al. (2016) e Omar et al. (2017), a resistência aos antimicrobianos possivelmente pode aumentar nos biofilmes como resultado da disseminação de genes de resistência entre células por transferência de genes horizontais que é facilitado pela proximidade de células do biofilme entre si.

2.5. Biofilme – formação

Biofilme é uma estrutura composta por um agregado de microrganismos envolvidos por uma matriz extracelular de exopolissacarídeos poliméricos que aderem a uma superfície sólida (SHIRTLIFF et al., 2002; COSTERTON et al., 1999).

O nome biofilme surgiu para descrever a forma de vida microbiana séssil, definida pela adesão de microrganismos a superfícies sólidas, com consequente produção de substâncias poliméricas extracelulares, formando uma rede gelatinosa que imobiliza e protege as células. A formação de biofilmes provoca alterações fenotípicas das células planctônicas, que podem ser descritas como estratégias de

sobrevivência dos microrganismos em ambientes com condições adversas (COSTERTON et al., 1999).

Microrganismos em ambientes naturais que existem na forma de biofilmes entre 95% a 99% são capazes de serem detectados na grande maioria de substratos que tenham umidade suficiente para suportar seu crescimento. No que diz respeito à composição, observa-se que água é a fração mais significativa, podendo chegar a 97% da matriz do biofilme (OLIVEIRA et al., 2010).

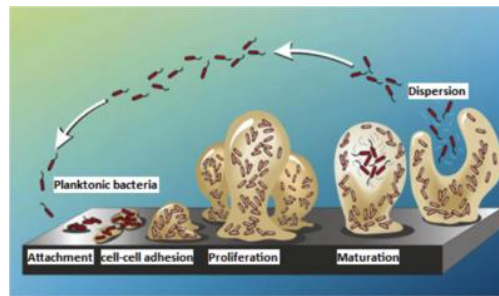
São intensamente estudados não apenas por seus efeitos sobre a saúde e o meio ambiente, mas também porque têm um enorme potencial como ferramentas para processos biotecnológicos (HANSEN et al., 2019).

A habilidade em formar biofilme é uma importante característica de virulência das bactérias (DONELLI e GUAGLIANONE, 2004). Deste modo, a detecção de cepas produtoras de biofilme é de grande importância para o estabelecimento de políticas de controle, uma vez que falhas no processo de higienização permitem que resíduos aderidos aos equipamentos e superfícies transformem-se em potencial fonte de contaminação na indústria de alimentos e nos ambientes hospitalares (CASSENEGO et al., 2013).

A formação do biofilme bacteriano pode ser dividida em quatro etapas. Em primeiro lugar, ocorre a ligação inicial das células bacterianas, depois a agregação e formação de múltiplas camadas de células, seguida da maturação do biofilme e finalmente a separação das células do biofilme para iniciar um novo ciclo de formação de biofilme em outros locais (Figura 1). As interações iniciais que ocorrem entre as bactérias e a superfície são inespecíficas e conduzidas por diferentes forças: forças hidrofóbicas, eletrostáticas e Lifshitz-Van Der Waals, entre outras (GUTIÉRREZ et al., 2012; SÁNCHEZ et al., 2014).

Com o início da maturação celular, as células começam a dividir-se e a formar pequenos agregados celulares caracterizados pela ocorrência do Quorum Sensing (QS) (FONSECA, 2011), que é um mecanismo de comunicação entre bactérias, através da produção e difusão de pequenas moléculas químicas ou sinalizadoras. O QS permite a coordenação do comportamento bacteriano em relação ao meio ambiente, regulando a expressão de genes especializados, em resposta à densidade populacional (LAZAR, 2011; PINTO e FONSECA, 2018).

Figura 1. Formação de biofilme



Fonte: Primalbrasil.com.br

Segundo Costa et al. (2018), indústria de alimentos de processamento de produtos lácteos tem como grande problema a formação de biofilmes, que geralmente estão associados a graves problemas de higiene podendo causar deterioração e recontaminação do produto. Por outro lado, segundo Bosman et al. (2014), uma das principais preocupações da medicina moderna é a infecção associada ao biofilme dentro do ambiente hospitalar, pois o mesmo aumentou sua incidência devido o aumento do uso de dispositivos médicos intravitalis, e estes, contribuíram diretamente para altos índices de morbidade e mortalidade em indivíduos hospitalizados.

2.6. Formação de biofilme por *Enterococcus* spp.

Enterococcus spp. associados a surtos de origem alimentar, possuem fatores de virulência, tais como a capacidade de formar biofilmes, aparentemente a agregação microbiana por esta espécie bacteriana é influenciada por diversos aspectos, como temperatura, exposição a nutrientes e sanitizantes, e características da superfície (COSTA et al., 2018).

Enterococos isolados de alimentos que evidenciam habilidade de formar biofilmes são alarmantes, uma vez que essa capacidade contribui para a sobrevivência, persistência e propagação de enterococos resistentes e / ou genes de resistência em diversas condições ambientais (MEDEIROS et al., 2014).

Segundo Estrela et al. (2009) as fases de organização estrutural do biofilme, a composição e as atividades dos microrganismos colonizadores em vários ambientes, podem ser diferentes, embora o estabelecimento de uma micro-comunidade em uma

superfície pareça seguir essencialmente a mesma série de estágios de desenvolvimento.

Segundo Medeiros (2011), estudos observaram que diferentes fatores podem influenciar a formação de biofilme em *Enterococcus* spp., além das condições que afetam de maneira geral a formação de biofilme entre uma diversidade de microrganismos, como pH, concentração de CO₂, temperatura, entre outros. Ainda não existe consenso sobre a influência da concentração de glicose na formação de biofilme por *Enterococcus* spp., porém alguns pesquisadores acreditam que a glicose aumenta a produção de biofilme por *Enterococcus* spp.

Dentre as espécies desse gênero, o *Enterococcus faecalis* é um patógeno oportunista que causa a maioria das infecções enterocócicas com capacidade de aderir a superfícies bióticas e abióticas, promovendo a formação de um biofilme que permite crescer e sobreviver em ambientes agressivos (CÂNDIDO et al., 2010).

Entre os diferentes fatores implicados na patogênese desses organismos, a formação de biofilme e a resistência a antibióticos são os mais importantes. A capacidade de formação de biofilme tem sido atribuída à presença de alguns genes de virulência (SAFFARI et al., 2017), sendo assim observa-se também outros mecanismos para o controle de infecções que seria a prevenção da formação de biofilme por *Enterococcus* spp. ou a inibição da ação de outros fatores de virulência, podendo fornecer um método alternativo de terapia, especialmente considerando que o tratamento antimicrobiano é um desafio para esse gênero (COMERLATO et al., 2013). A robusta formação de biofilme e a inerente resistência a múltiplos fármacos nos enterococos o tornaram em um patógeno nosocomial desafiador (SURYALETHA et al., 2019).

3.OBJETIVOS

3.1 Geral

Pesquisar a presença de *Enterococcus* spp. em queijo de coalho, embalado na indústria, comercializado em hipermercados da cidade de Recife, Pernambuco.

3.2 Específicos

- Isolar e identificar cepas de *Enterococcus* spp.
- Avaliar “in vitro” a susceptibilidade de *Enterococcus* spp. a antimicrobianos;
- Avaliar “in vitro” a capacidade de *Enterococcus* spp. formar biofilme.

4.REFERÊNCIAS

- ALI, S. A.; HASAN, K. A.; ASIF, B. H.; ABBASI, A. Environmental enterococci: Prevalence of virulence, antibiotic resistance and species distribution in poultry and its related environment in Karachi, Pakistan. **Letters in Applied Microbiology**. v. 58, n. 5, p. 423-432, 2014.
- ANDRADE, A. A.; Estudo do perfil sensorial, físico-químico e aceitação do queijo de coalho produzido no estado do Ceará. *Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos)* – Centro de Ciências Agrárias. **Universidade Federal do Ceará**. Fortaleza, 2006.
- ANDRADE, S. D. E.; Caracterização fenotípica e genotípica de amostras clínicas e indígenas de *Enterococcus* isoladas de seres humanos: diversidade, virulência e resistência a drogas antimicrobianas. Instituto de Ciências Biológicas. **Universidade Federal de Minas Gerais**. 2018.
- ARCHAMBAUD, C.; BOBILLOT, A. D.; LAPAQUE, N.; GOIS, L. R.; SERRON, P. Intestinal translocation of enterococci requires a threshold level of enterococcal overgrowth in the lumen. **Scientific Reports**. v. 9, n. 8926, 2019.
- ARIAS, C. A.; MURRAY, B. E. The rise of the *Enterococcus*: Beyond vancomycin resistance. **Nature Reviews Microbiology**. v. 10, n. 4, p. 266-278, 2012.
- BARLOW, M.; HALL, B. G. Phylogenetic Analysis Shows That the OXA b-Lactamase Genes Have Been on Plasmids for Millions of Years. **Journal of Molecular Evolution**. v. 55, n. 3, p. 314-321, 2002.
- BELLO, A.; DINGLE, T. C. What's That Resistance Mechanism? Understanding Genetic Determinants of Gram-Negative Bacterial. **Clinical Microbiology Newsletter**. Canadá, 2018.
- BLANCO, A. L.; FREITAS, L. M.; FONTANA, C. R. ACT. Avaliação de resistência à Terapia Fotodinâmica em *Enterococcus faecalis*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 17, n. 1, 2016.
- BYUNG, H.; RYU, J.; HONG, J.; JUNG, M. J.; KIM, H.; SUNG, M.; KIM, Y. H.; WOO, S.; LEE, Y. Clinical characteristics and treatment outcomes of *Enterococcus durans* bacteremia: a 20-year experience in a tertiary care hospital. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. 2019.
- BORGES, M. F.; FEITOSA, T.; NASSU, R. T.; MUNIZ, C. R.; AZEVEDO, E. H. F.; FIGUEIREDO, E. A. T. Microrganismos patogênicos e indicadores em queijo de coalho produzido no Estado do Ceará, Brasil. **Boletim do CEPPA**. v. 21, n. 1, p. 31-40, 2003.
- BOSMAN, W. M. P. F.; BURG, B. V.; SCHUTTEVAER, H. M.; THOMA, S.; JOOSTEN, P. P. H. Infections of Intravascular Bare Metal Stents: A 55 Case Report and Review of Literature. **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**. v. 47, n. 1, p. 87-99, 2014.
- BRASIL, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Agricultura e pecuária em 2017. Disponível em <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-leite.html?=&t=notas-tecnicas>. Acesso em 22/06/2019.
- BRASIL, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Agricultura e pecuária em 2018. Disponível em [sidra.ibge.gov.br](https://www.ibge.gov.br). Acesso em 09/02/2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária** – ANVISA. Portaria n. 2616 de 12 de maio de 1998. Brasília. Disponível em http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/1998/prt2616_12_05_1998. Acesso em 19/07/2019.

BRASIL. Portaria n. 146 de 7 de março de 1996. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade dos derivados de leite. **Diário Oficial da União**, Brasília, 11 de março de 1996.

CAMACHO, J. O. I.; LEZAMA, E. S.; WEBER, F. L. R.; GREENE, E. D. Prescripción racional de antibióticos: una conducta urgente. **Medicina Interna de México**. v. 34, n. 5, p. 762-770, 2018.

CÂNDIDO, C. S.; PORTELLA, C. S. A.; LARANJEIRA, B. J.; SILA, S. S.; ARRIAGA, A. M. C.; SANTIAGO, G. M. P.; GOMES, G. A.; ALMEIDA, P. C.; CARVALHO, C. B. M. Effects of *Myrcia ovata* Cambess. Essential oil on planktonic growth of gastrointestinal microorganisms and biofilm formation of *Enterococcus faecalis*. **Jornal Brasileiro de Microbiologia**. v. 41, n. 3, 2010.

CASSENEGO, A. P. V.; ELLWANGER, J.; PEDRO, A.; AZEVEDO, A.; RIBEIRO, M. L.; FRAZZON, A. P. G. Virulência e formação de biofilme microbiano por *Enterococcus faecalis* isolados de swabs cloacais de frangos de corte.org/infectados com *Eimeria* spp. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 33, n. 12, 2013.

Centers for disease control and prevention, **C.D.C.** (online). Disponível em <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2003>. Acesso em 22/07/2019.

COMERLATO, C. B.; RESENDE, M. C. C.; CAIERÃO, J.; AZEVEDO, P. A. PRESENCE OF VIRULENCE FACTORS IN *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* susceptible and resistant to vancomycin. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 108, n. 5, 2013.

COSTA, F. T. Síntese, caracterização e o estudo do efeito de nano-partículas de CoFe₂O₄-YFe₂O₃ em bactérias patogênicas. *Dissertação (Mestrado)* – **Universidade de Brasília**. P. 53, 2013.

COSTA, G. A.; ROSSALTO, R. C. P.; MEDEIROS, A. W.; CORREIA, A. P. F.; BRANDELLI, A.; FRAZZON, A. P. G.; MOTTA, A. S. Evaluation antibacterial and antibiofilm activity of the antimicrobial peptide P34 against *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. **Anais Academia Brasileira de Ciências**. v. 90, n. 1, 2018.

COSTA, M. C. P.; LIMA, K. M.; DELLACQUA, M. N.; SANTOS, V. E. F. A. Microrganismos isolados a partir de espécimes clínicos de centro cirúrgico. **Revista Saúde e Desenvolvimento**. v. 13, n. 14, 2019.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**. v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.

DAVEY, P.; MARWICK, C. A.; SCOTT, C. L.; CHARANI, E.; MCNEIL, H.; BROWN, E.; RAMSAY, C. R.; MICHIE, S. Interventions to improve antibiotic prescribing practices for hospital inpatients. **Cochrane database of systematic reviews**. v. 2, n. 3543, 2017.

- DERDE, L. P.; DAUTZENBERG, M. J.; BONTEN, M. J. Chlorhexidine body washing to control antimicrobial-resistant bacteria in intensive care units: a systematic review. **Intensive Care Medicine**. v. 38, n. 6, p. 931-939, 2012.
- DONELLI, G.; GUAGLIANONE, E. Emerging role of *Enterococcus* spp. In catheter related infections: biofilm formation and novel mechanisms of antibiotic resistance. **The Journal of Vascular**. v. 5, p. 3-9, 2004.
- ESTRELA, C. R. A.; SYDNEY, G. B.; FIGUEIREDO, J. A. P.; ESTRELA, C. R. A. A model system to study antimicrobial strategies in endodontic biofilms. **Journal of Applied Oral Science**. v. 17, n. 2, 2009.
- FARON, M. L.; LEDEBOER, N. A.; BUCHAN, B. W. Resistance mechanisms, epidemiology, and approaches to screening for vancomycin-resistant *Enterococcus* in the health care setting. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 54, n. 10, p. 2436-2447, 2016.
- FISHER, K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**. v. 155, n. 6, p. 1749-1757, 2009.
- FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J.; SZEWZYK, U.; STEINBERG, P.; RICE, S. A.; KJELLEBERG, S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**. v. 14, n. 9, p. 563-575, 2016.
- FONSECA, A. P. Biofilms in wounds: An unsolved problem? **EWMA Journal**. V. 11, n. 2, p. 10-23, 2011.
- FREITAS FILHO, J. R.; SOUZA FILHO, J. S.; OLIVEIRA, H. B.; ANGELO, J. H. B.; BEZERRA, J. D. C. Avaliação da qualidade do queijo "coalho" artesanal fabricado em Jucati-PE. **Extensio: Revista Eletrônica de Extensão**. v. 6, n. 8, p. 35-49, 2009.
- GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**. v. 88, n. 2/3, p. 215-222, 2003.
- GIRAFFA, G; ROSSETTI, L. Monitoring of the bacterial composition of dairy starter cultures by RAPD-PCR. **FEMS Microbiology Letters**. v. 237, n. 1, p. 133-138, 2004.
- GUTIÉRREZ, D.; DELGADO, S.; VÁZQUEZ, S. D.; MARTÍNEZ, B.; CABO, M. L.; RODRIGUEZ, A.; HERRERA, J. J.; GARCÍA, P. Incidence of *Staphylococcus aureus* and analysis of associated bacterial communities on food industry surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 78, n. 24, p. 8547-8554, 2012.
- HANSEN, S. H.; KABBECK, T.; RADTKE, P.; KRAUSE, S.; KROLITZKI, E.; PESCHKE, T.; GASMI, J.; RABE, K. S.; WAGNER, M.; HORN, H.; GESCHER, J.; NIEMEYER, C. M. Machine-assisted cultivation and analysis of biofilms. **Scientific Reports**. v. 9, n. 8933, 2019.
- HEIDARI, H.; HASANPOUR, S.; SARAIE, H. S. E.; MOTAMEDIFAR, M. High Incidence of Virulence Factors among Clinical *Enterococcus faecalis* Isolates In Southwestern Iran. **Infect Chemother**. v. 49, n. 1, p. 51-56, 2017.
- HOLLENBECK, B. L.; RICE, L. B. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in *Enterococcus*. **Virulence**. v. 3, n. 5, p. 421-433, 2012.
- HUGAS, M.; GARRIGA, M. M.; AYMERICH, M. T.; Functionalty of enterococci im meat products. **International Journal of Food Microbiology**. v. 88, n. 2, p. 223-233, 2003.

- JAMET, E.; AKARY, E.; POISSON, M. A.; CHAMBA, J. F.; BERTRAND, X.; SERROR, P. Prevalence and characterization of antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* in French cheeses. **Food Microbiology**. v. 31, n. 2, p.191-198, 2012.
- KAO, P. H. N.; KLINE, K. A. How *Enterococcus faecalis* Subverts the Host Immune Response to Cause Infection. **Journal of Molecular Biology**. v. 431, n. 16, p. 2932-2945, 2019.
- KASZANYITZKY, E. J.; TENK, M.; GHIDÁN, A.; FEHÉVÁRI, G. Y.; PAPP, M. Antimicrobial susceptibility of enterococci strains isolated from slaughter animals on the data of Hungarian resistance monitoring system from 2001 to 2004. **International Journal of food microbiology**. v.115, n. 1, p. 119-123, 2007.
- KONEMAN, E. W. et al. Enterococcus. In: KONEMAN, Elmer W. (Ed.). **Diagnóstico microbiológico**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 589-659, 2014.
- KRAHN, C. O.; FACHINETTO, J. M. Enterococcus spp.: Características gerais e considerações médicas, uma revisão. **6º Congresso Internacional em Saúde**. 2019.
- LÁCTEA BRASIL**. Queijo: Alimento nobre e saudável. 2006. Disponível em: <http://www.lacteabrasil.org.br/>. Acesso em 30/07/2019.
- LAZAR, V. Quorum sensing in biofilms – how to destroy the bacterial citadels or their cohesion/power? **Anaerobe**. v.17, n. 6, p. 280-285, 2011.
- LEBRETON, F.; MANSON, A. L.; SAAVEDRA, J. T.; STRAUB, T. J.; EARL, A. M.; GILMORE, M. S. Tracing the Enterococci from Paleozoic Origins to the Hospital. **Cell**. v. 169, n. 5, p. 849-861, 2017.
- LEBRETON, F.; WILLEMS, R. J. L.; GILMORE, M. S.; CLEWELL, Y.; SHANKAR, N.; *Enterococcus* diversity, origins in nature, and gut colonization / Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection . **Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary**. p.1-59, 2014.
- LECLERCQ, R. Epidemiological and resistance issues in multidrug-resistant staphylococci and enterococci. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 15, n. 3, p. 224-231, 2009.
- LEVY, S.; MARSHALL, B. Antimicrobial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature medicine supplement**. v. 10, n. 12, p. 122-129, 2004.
- LÍRIO, M.; ANDRADE, T.; MENDES, A. V.; BARBERINO, M. G. Avaliação da colonização por bactérias multirresistentes em pacientes admitidos via central de regulação do estado em um hospital filantrópico em Salvador, Bahia. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**. v. 9, n. 1, 2019.
- LOSSOUARN, J.; BRIET, A.; MONCAUT, E.; FURLAN, S.; BOUTEAU, A.; SON, O.; LEROY, M.; DUBOW, M. S.; LECOINTE, F.; SERROR, P.; PETIT, M. A. *Enterococcus faecalis* Counter measures Defeat a Virulent Picovirinae Bacteriophage. **Journal viruses**. v. 11, n. 1, p. 48, 2019.
- LUNA, R. O. Identificação, perfil de resistência a antimicrobianos e caracterização molecular de *Aeromonas* spp. isoladas de queijos coalho tipo A, comercializados na cidade de Recife PE. *Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária)*. **UFRPE**, 2012.

LUO, X.; QIAN, L.; XIAO, Y.; TANG, Y.; ZHAO, Y.; WANG, X.; GU, L.; LEI, Z.; BAO, J.; WU, J.; HE, T.; HU, F.; ZHENG, J.; LI, H.; ZHU, W.; SHAO, L.; DONG, X.; CHEN, D.; QIAN, X.; YANG, Y. A diversity-oriented rhodamine library for wide-spectrum bactericidal agents with low inducible against resistant pathogens. **Nature Communications**. v. 10, n. 258, 2019.

MEDEIROS, A. W. Avaliação dos fatores de virulência e a capacidade de formação de biofilme in vitro em isolados alimentares e clínicos de *Enterococcus* spp. e utilização de PCR-RFLP para a identificação de *Enterococcus casseliflavus* e *Enterococcus gallinarum*. *Dissertação (Mestrado)*. **Universidade Feevale**. 2011.

MEDEIROS, A. W.; PEREIRA, R. I.; OLIVEIRA, D. V.; MARTINA, P. D.; AZEVEDO, P. A.; VAN DER SAND, S.; FRAZZON, J.; FRAZZON, A. P. G. Molecular detection of virulence factors among food and clinical *Enterococcus faecalis* strains in South Brazil; **Brazilian Journal of Microbiology**. vol. 45, n.1, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822014005000031>. Acesso em 22/07/2019.

MENEZES, S. S. M. “Queijo de coalho-rei do balcão”: Expansão da produção alicerçada pela demanda dos migrantes sertanejos. **Habitus**. v. 11, n. 2, p. 143-158, 2013.

MONTEIRO, J. A. INFECÇÕES NOSOCOMIAIS. Alguns Aspectos. **ACTA Médica Portuguesa**. v. 6, p. 135-140, 1993.

MONTEMAYOR, J. C. G.; BOFARULL, A. M.; MOCHALES, F. B. Impacto de los movimientos migratorios em la resistencia bacteriana a los antibióticos. **Revista Española de Salud Pública**. v. 88, n. 6, 2014.

MONTOYA, R. R.; OLIVA, V. S.; PAREDES, J. C.; ANGULO, N. C.; RAMOS, G. C.; MONTOYA, M. R. Variables asociadas a costos em cuidados intensivos. **Revista de la Asociación Mexicana de Medicina Crítica y Terapia Intensiva**. v. 29, n. 3, p. 138-144, 2015.

MORAES, P. M.; PERIN, L. M.; TODOROV, S. D.; SILVA JÚNIOR, A.; FRANCO, B. D. G. M.; NERO, L. A. Bacteriocinogenic and virulence potential of *Enterococcus* isolates obtained from raw milk and cheese. **Journal of Applied Microbiology**. v. 113, p. 318-328, 2012.

MURRAY, P. et al. Microbiologia Médica. 4 ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p. 220-223, 2004.

NIKAIDO, H. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. **Journal of bacteriology**. v. 178, n. 20, p. 5853-5859, 1996.

NOGUEIRA, J. G. a EMBALAGEM COMO FATOR DE AGREGAÇÃO DE VALOR AO PRODUTO: Um estudo do segmento de queijos em Juiz de Fora. *Dissertação (Mestrado Profissional em Sistemas de Gestão)* – Centro Tecnológico, **Universidade Federal Fluminense**, Niterói, 2006.

OLIVEIRA, A. F.; OLIVEIRA FILHO, H. Perfil microbiológico e de resistência antimicrobiana no pé diabético infectado. **Jornal Vascular Brasileiro**. v. 13, n. 4, p. 289-293, 2014.

OLIVEIRA, E. S. Emergência de *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina na cidade do Natal – RN. *Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)*, **Universidade Federal do Rio Grande do Norte**. Natal, 2019.

- OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNETA, D. F.; PICCOLI, R. H. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v. 69, n. 3, 2010.
- OLIVEIRA, M.; SANTOS, V.; FERNANDES, A.; BERNARDO, F.; VILELA, C. L. Antimicrobial resistance and in vitro biofilm-forming ability of enterococci from intensive and extensive farming broilers. **Poultry Science**. v. 89, n. 5, p. 1065-1069, 2010.
- OMAR, A.; WRIGHT, J. B.; SCHULTZ.; BURRELL, R.; NADWORNYY, P. Microbial Biofilms and Chronic Wounds. **Journal Microorganisms**. v. 5, n. 1, 2017.
- PARTE, A. C. LPSN-list of prokaryotic names with standing in nomenclature. **Nucleic Acids Research**. v. 42, n. 1, p. 613-616, 2014.
- PEREIRA, F. G. F.; SOUZA, N. L.; SILVA, E. M. M.; SILVA, J. B.; SARAIVA, E. M.; RANGEL, C. T. Characterization of infections related to health care in a neonatal intensive care unit. **Enfermagem UERJ**. v. 21, n. 1, 2013.
- PINTO, G.; FONSECA, A. F. Biofilmes e Feridas Crônicas: Um potencial algoritmo. **Journal of tissue regeneration & healing**. 2018.
- PORTO, B. C.; FUJIMOTO, G.; BORGES, M. F.; BRUNO, L. M.; CARVALHO, J. D. G. Determinantes de virulência em *Enterococcus* endógenos de queijo artesanal. **Revista Ciência Agronômica**. v. 47, n. 1, p. 69-76, 2016.
- PÓVOA, A. C.; SILVA, R. C.; SANTOS, K. C.; SOUZA, A. C. S.; PEREIRA, M. S.; CARMO FILHO, J. R. Evolução da resistência bacteriana em infecção comunitária do trato urinário em idosos. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**. v. 9, n. 1, p. 08-14, 2019.
- REIS, A. O.; CORDEIRO, J. C. R.; MACHADO, A. M. O.; SADER, H. S. In vitro antimicrobial activity of linezolid tested against vancomycin-resistant enterococci isolated in Brazilian hospitals. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 5, n. 5, 2001.
- RIBOLDI, G. P.; FRAZZON, J.; AZEVEDO, P. A.; Antimicrobial resistance profile of *Enterococcus* spp. isolated from food in Southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 40, p. 125-128, 2009.
- ROSENTHAL, V. D.; MAKI, D. G.; MEHTA, Y.; LEBLEBICIOGLU, H.; MEMISH, Z. A.; AL-MOUSA, H. H. International nosocomial infection control consortium (INICC) report, data summary of 43 countries for 2007-2012. Device-associated module. **American Journal of Infection Control**. v. 43, n. 7, p. 779-781, 2015.
- SAFFARI, F.; DALFARDI, M. F.; MANSOURI, S.; AHMADRAJABI, R. Survey for Correlation between Biofilm Formation and Virulence Determinants in a Collection of Pathogenic and Fecal *Enterococcus faecalis* Isolates. **Infection & chemotherapy**. v. 49, n. 3, p. 176-183, 2017.
- SÁNCHEZ, D. V.; CABO, M. L.; IBUSQUIZA, P. S.; HERRERA, J. J. R. Biofilm-forming ability and resistance to industrial disinfectants of *Staphylococcus aureus* isolated from fishery products. **Food Control**. v. 39, n. 1, p. 8-16, 2014.
- SANTANA, R. F.; SANTOS, D. M.; MARTINEZ, A. C. C.; LIMA, A. S. Qualidade microbiológica de queijo coalho comercializado na cidade de Aracaju, SE. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 60, n. 6, p. 1517-1522, 2008.

- SHEPARD, B. D.; GILMORE, M. S. Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. **Microbes and Infection**. v. 4, n. 2, p. 215-224, 2002.
- SHIRTLIFF, M. E.; MADER, J. T.; CAMPER, A. K. Molecular interactions in Biofilms. **Chemistry & biology**. v. 9, n. 8, p. 859-871, 2002.
- SIEVERT, D. M.; RICKS, P.; EDWARDS, J. R.; SCHNEIDER, A.; PATEL, J.; SRINIVASAN, A. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated with Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. **Infection Control and Hospital Epidemiology**. v. 34, n. 1, p. 1-14, 2013.
- SILVA, A. S.; FURTADO, S. C.; VARGAS, B. L. Avaliação microbiológica do queijo coalho produzido com leite pasteurizado sob refrigeração. **Revista Nanbiquara**. v. 6, n. 1, p. 118-133, 2017.
- SILVA, N.; IGREJAS, G.; GONÇALVES, A.; POETA, P. Commensal gut bacteria: distribution of *Enterococcus* species and prevalence of *Escherichia coli* phylogenetic groups in animals and humans in Portugal. **Annals of Microbiology**. v. 62, n. 449, 2012.
- SILVA, R. A.; LIMA, M. S. F.; VIANA, J. B. M.; BEZERRA, V. S.; PIMENTEL, M. C. B.; PORTO, A. L. F.; CAVALCANTI, M. T. H.; LIMA FILHO, J. L. Can artisanal “coalho” cheese from Northeastern Brazil be used as a functional food? **Food Chemistry**. v. 135, p. 1533-1538, 2012.
- SOLACHE, M. G.; RICE, L. B. The *Enterococcus*: a model of Adaptability to Its Environment. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 32, n. 2, 2019.
- SOUZA, A. Z. B.; ABRANTES, M. R.; SAKAMOTO, S. M.; SILVA, J. B.; LIMA, P. O.; LIMA, R. N.; ROCHA, M. O. C.; PASSOS, Y. D. B. Aspectos físico-químicos e microbiológicos do queijo tipo coalho comercializado em estados do nordeste do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 81, n. 1, p. 30-35, 2014.
- SURYALETHA, K.; NARENDRAKUMAR, L.; JOHN, J.; RADHAKRISHNAN, M. P.; GERORGE, S.; THOMAS, S. Decoding the proteomic changes involved in the biofilm formation of *Enterococcus faecalis* SK460 to elucidate potential biofilm determinants. **BMC Microbiology**. v. 19, n. 146, 2019.
- TEIXEIRA, I. M. S. Biofilmes e infecções associadas a dispositivos médicos. *Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)*. **Universidade Fernando Pessoa**. 2019.
- TEIXEIRA, L.; MERQUIOR, V. L. Molecular typing in bacterial infections. **Humana Press**. v. 1, n. 12, p. 17-27, 2013.
- TERÁN, C. G.; RODRÍGUEZ, V. R.; RANGEL, A. C. Analysis of antibiotic uses and resistance in an ICU from Monteria, Colombia. **Revista médica Risaralda**. v. 24 n. 2, 2018.
- TERRA, M. R.; FURLANETO, M. C.; MAIA, L. F. *Enterococcus* multirresistente a antimicrobianos: um importante patógeno nosocomial. **Revista Uningá Review**. v. 29, n. 3, p. 94-102, 2017.
- TERRA, M. R.; FURLANETO, M. C.; MAIA, L. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**. v. 22, n. 1, p. 86-93, 2018.

URQUHART, C.; CASAGRANDE, C.; FREITAS, L. S.; ZARZICKI, F.; ALVES, C. F. S.; SANTOS, R. C. V. Atividade antibiofilme da cumarina frente à *Pseudomonas aeruginosa*. Anais do 10º Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, **Universidade Federal do Pampa**, 2019.

VALLEJO, M.; PARADA, R. B.; MARGUET, E. R. Aislamiento de cepas de *Enterococcus hirae* productoras de enterocinas a partir del contenido intestinal de mejillón patagónico (*Mytilus edulis platensis*). **Revista Argentina de Microbiología**. 2019.

VIGNAROLI, C.; ZANDRI, G.; AQUILANTI, L.; PASQUAROLI, S.; BIAVASCO, F. Multidrug-resistant Enterococci in meat and faeces and co-transfer of resistance from an *Enterococcus durans* to a human *Enterococcus faecium*. **Current Microbiology**. v. 62, n. 5, p. 1438-1447, 2011.

WHO, 2017, **WHO** | Zoonoses and the Human-Animal-Ecosystems Interface. Disponível em <http://www.who.int/zoonoses/en/>. Acesso em 29/07/2019.

5. ARTIGO CIENTÍFICO

**Susceptibilidade antimicrobiana e formação de biofilme de *Enterococcus* spp.
isolados de queijo de coalho**

Periódico a ser submetido: Food Science and Technology International (FSTI)

Resumo: Bactérias do gênero *Enterococcus* possuem como principal reservatório o trato gastrointestinal de homem e animais, podendo ser encontradas em solo e água. Embora estas bactérias contribuam para o desenvolvimento de características sensoriais e para biopreservação em queijos, devido à sua elevada resistência a antimicrobianos e produção de fatores de virulência, sua presença em alimentos tem despertado preocupação. Assim, objetivou-se analisar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana e a capacidade de formar biofilme de *Enterococcus* spp. isolados de queijo de coalho embalados na indústria. Foram analisadas 36 amostras de queijo de coalho comercializados em hipermercados da cidade do Recife-PE. Após isolamento e identificação, observou-se 36 isolados de *Enterococcus* spp., sendo estes 44,4% (16/36) *Enterococcus faecalis*, 44,4% (16/36) *Enterococcus faecium* e 11,2% (4/36) *Enterococcus durans*. Destes, 22,2% (8/36) apresentaram resistência à eritromicina, 25% (9/36) à nitrofurantoína, 22,2% (8/36) à tetraciclina e 2,7% (1/36) à vancomicina. Observou-se também que 22,2% (8/36) foram classificados como moderados formadores de biofilme e 77,8% (28/36) como fracos formadores. A ocorrência de cepas de *Enterococcus* spp. resistentes a antimicrobianos e formadoras de biofilme nas amostras de queijo de coalho avaliadas podem representar um risco à saúde pública, já que estes microrganismos são considerados emergentes e estão cada vez mais relacionados a casos de infecção hospitalar. Além disso, o monitoramento da susceptibilidade à vancomicina mostra-se importante no controle de cepas de *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina (VRE), que representam um dos maiores problemas de saúde pública mundial.

Palavras-chave: adesão bacteriana; lácteos; microrganismos emergentes; infecção hospitalar; saúde pública.

Introdução

O queijo de coalho, típico da região Nordeste do Brasil, produzido principalmente em Pernambuco, Ceará, Paraíba e Rio Grande do Norte, é um produto elaborado a partir de leite cru ou pasteurizado, complementado ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas, tendo considerável importância na renda dos fornecedores de leite (NASSU et al., 2003; ANDRADE, 2006).

Por ser um produto bastante manipulado e muitas vezes elaborado sob condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, não apresenta segurança microbiológica e padronização (FEITOSA et al., 2003).

Enterococcus spp., constituem um complexo grupo de bactérias, que desempenham papel ambíguo em alimentos, enquanto algumas linhagens são utilizadas em queijos e alimentos enlatados, conferindo sabor, odor e textura a esses produtos e também como culturas iniciadoras na indústria de laticínios para a fabricação de iogurtes e leites cultivados, ressaltando-se aqui que são Bactérias ácido-lácticas (BAL), outras cepas estão relacionadas com a deterioração de alimentos (TERRA et al., 2018).

As espécies de *Enterococcus* spp. são de origens diversas como meio ambiente, fonte animal e humana. Esses microrganismos são de grande importância pois fazem parte da microbiota normal de animais e humanos, podem causar doenças em humanos, tendo sua distribuição de forma semelhante nos mesmos (FISCHER e PHILLIPS, 2009).

A partir da matéria fecal, pele de animais, água, equipamentos de ordenha e tanques de expansão os *Enterococcus* spp. podem contaminar o leite na cadeia de produção e seus derivados na indústria. As bactérias do gênero *Enterococcus* são frequentemente encontradas em leite e derivados, principalmente em queijos (PORTO et al., 2016).

A presença destes microrganismos em queijos produzidos com leite pasteurizado é associada à sua capacidade de crescimento em uma ampla faixa de temperatura, de 10 a 45°C, sendo a temperatura ótima de crescimento 35°C. Apresenta grande resistência a altas temperaturas, tendo espécies que podem sobreviver a 60°C por 30 minutos, sendo consideradas termorresistentes (KONEMAN et al., 2014).

A contaminação de *Enterococcus* spp. em alguns queijos industrializados a partir de leite pasteurizado, geralmente resulta de falhas nas Boas Práticas de Fabricação durante a elaboração dos mesmos (ANDRADE et al., 2006).

O queijo de coalho possui uma microbiota natural diversificada, com predominância de bactérias do gênero *Enterococcus*, sendo *E. faecalis* e *E. faecium* as espécies de maior ocorrência (EATON e GASSON, 2001; SANTOS et al., 2014).

Embora as bactérias ácido-lácticas contribuam para o desenvolvimento de características sensoriais e para a biopreservação em queijos, a presença de *Enterococcus* spp. em alimentos tem despertado preocupação, pois são patógenos oportunistas que surgiram como uma das principais fontes de infecções

nosocomiais, particularmente em pacientes imunocomprometidos (LOSSOUARN et al., 2019) e devido a sua elevada resistência a antimicrobianos e fatores de virulência, estes microrganismos passaram a ser considerados patógenos emergentes.

As infecções nosocomiais são de grande importância clínica e epidemiológica, pois geram altos índices de morbidade e mortalidade, extensão dos dias de hospitalização e desperdício dos recursos econômicos, sendo ou representando uma situação emergente em todo o planeta (MONTROYA et al., 2015). Dentre os principais patógenos bacterianos hospitalares que são resistentes aos antibióticos disponíveis encontra-se a bactéria Gram-positiva *Enterococcus faecalis*, cujas infecções representam dificuldades terapêuticas reais (BLANCO e FREITAS, 2016).

Nos serviços hospitalares, especialmente, dos países em desenvolvimento, tem-se um grave problema de saúde que é o surgimento da resistência bacteriana aos antibióticos (PEREIRA et al., 2016). Também a utilização indiscriminada de fármacos antimicrobianos desencadeou o aumento de cepas resistentes aos tratamentos. Este cenário se torna mais preocupante quando os microrganismos se apresentam na forma de biofilme (URQUHART et al., 2019)

Os biofilmes são estruturas complexas de aglomerados microbianos, protegidos por uma camada de exopolissacarídeos (EPS) que impede a penetração dos fármacos, dificultando ainda mais o tratamento das infecções (SHIRTLIFF et al., 2002; COSTERTON et al., 1999).

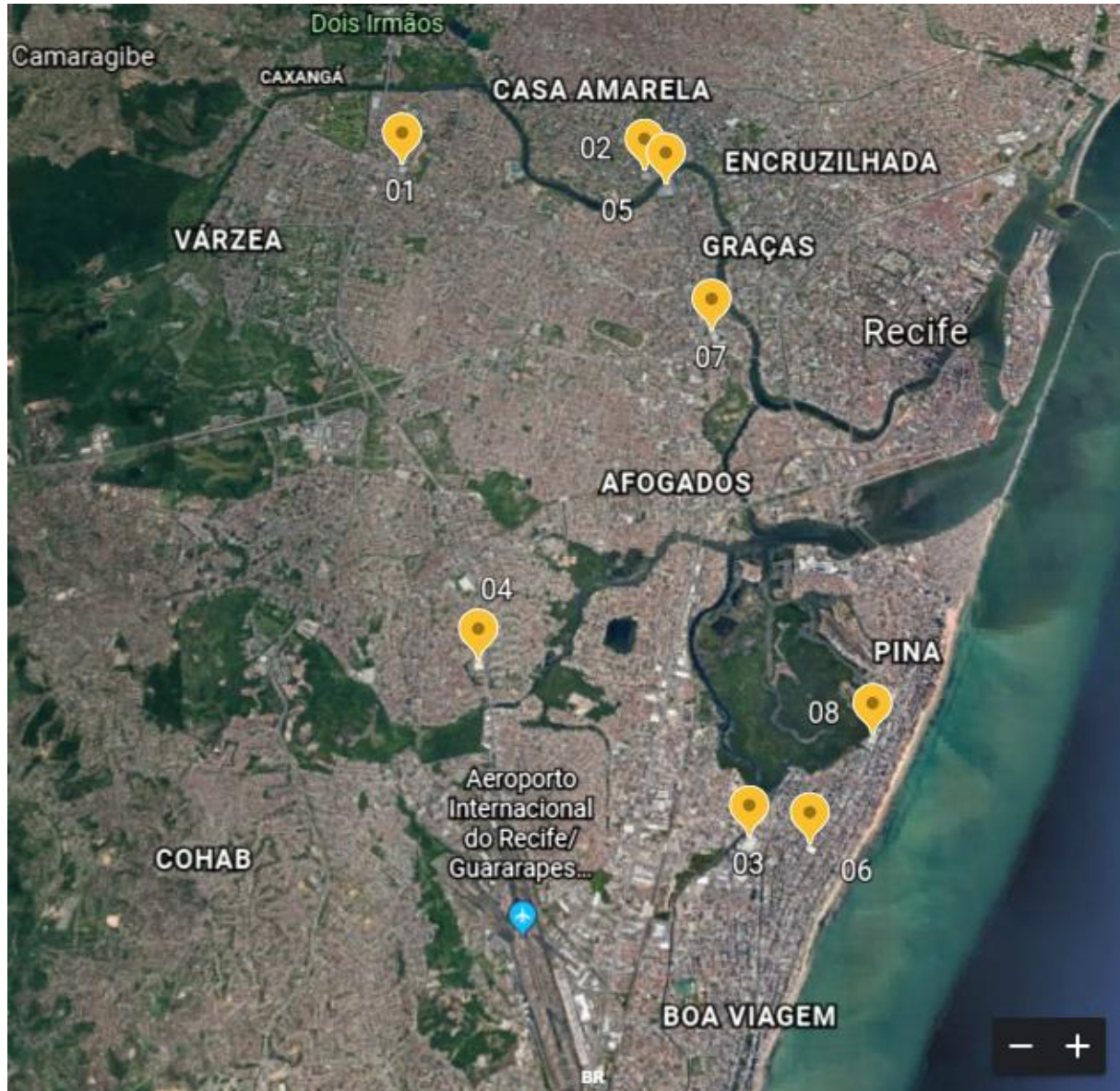
O surgimento de resistência aos antimicrobianos por enterococos e sua difusão em alimentos sugerem uma situação de risco para a saúde pública, e também deve ser considerada uma possível correlação entre cepas presentes nos hospitais com aquelas isoladas de alimentos (RIBOLDI et al., 2009).

Poucos estudos foram realizados analisando a susceptibilidade antimicrobiana de *Enterococcus* spp. isolados de alimentos de origem animal e a capacidade destes microrganismos de formarem biofilme, diante disso, o presente artigo objetivou avaliar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana e a capacidade de formar biofilmes de *Enterococcus* spp. isolados de queijo de coalho.

Material e métodos

Foram analisadas 36 amostras de queijo de coalho comercializadas nos oito hipermercados da cidade do Recife-PE (Figura 2).

Figura 2. Localização dos pontos de coleta.



Fonte: Google Earth

Foi adquirida uma amostra de cada marca disponível no estabelecimento no momento da visita, mantendo-se a embalagem original, lacradas e não fracionadas. As amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável com temperatura menor que 10°C e levadas imediatamente ao laboratório em que foram realizadas as análises, onde foram conservadas em refrigeração com temperatura menor que 6°C por 24 horas. Em seguida, foram pesados 25g de cada amostra e colocados em 225mL de água peptonada tamponada 1%, e seguiu-se

com a homogeneização durante 60 segundos em Stomacher®. A partir desta diluição (10^{-1}), foram feitas subseqüentes diluições até se obter a diluição 10^{-4} . Em seguida 0,1mL de cada diluição foi semeado em placas de Petri com meio Slantz and Bartley com alça de Drigalski e incubadas a 40°C por um período de 24 a 48 horas (ANÓNIMO, 1998). As colônias sugestivas de *Enterococcus* spp. foram identificadas através de suas características morfo-tintoriais (coloração de Gram) (STINGHEN et al., 2002) e bioquímicas (Bile esculina, NaCl a 6,5% e catalase), sendo as espécies identificadas utilizando-se o equipamento automatizado de identificação VITEK 2® compact (BIOMERIEUX, 2017), além dos testes bioquímicos Sacarose, dManitol e Arabinose para a confirmação definitiva.

Para o teste de susceptibilidade antimicrobiana (TSA), foram testados onze agentes antimicrobianos comumente utilizados na medicina humana: Penicilina 10 unidades; Ampicilina 10µg; Eritromicina 15µg; Tetraciclina 30µg; Nitrofurantoína 300µg; Ciprofloxacina 5µg; Levofloxacina 5µg; Norfloxacina 10µg; Teicoplanina 30µg; Vancomicina 30µg e Linezolida 30µg, através do método de disco-difusão em ágar descrito por Kirby Bauer (MACHADO e GALES, 2008). Foi utilizada uma suspensão bacteriana-padrão de *Enterococcus* spp. equivalente a 0,5 da escala de McFarland que corresponde a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL e que foi obtida pelo método da suspensão direta em NaCl 0,85% (LIMA, 2016). Com auxílio de um swab estéril, a suspensão foi semeada em meio ágar Müeller Hinton® e posteriormente os discos impregnados com os antibióticos foram distribuídos na superfície do meio. A leitura dos halos de inibição e a posterior interpretação dos resultados, foram realizadas após a incubação das placas por 16-18 horas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, sendo com a vancomicina por 24 horas. Os diâmetros dos halos de inibição foram interpretados de acordo com Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2019).

Para a avaliação da produção de biofilme, foi utilizada a metodologia segundo Rodrigues et al. (2010), com adaptações, onde colônias isoladas de *Enterococcus* spp. foram inoculadas em tubos contendo 3mL de Caldo Triptona Soja (TSB) até turvação 0.5 da escala de McFarland e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. Após esta etapa, 100µL da solução foram inoculados em placas de microdiluição de 96 poços e seguiu-se a incubação a 37°C por 24 horas. Após este período, o conteúdo de cada poço foi aspirado, cuidadosamente, e estes foram lavados três vezes com água destilada estéril. As placas foram deixadas em

temperatura ambiente até a secagem, e as células aderidas foram coradas com 200µL violeta de genciana a 0,25%. Após 5 minutos da aplicação do corante, os poços foram submetidos à lavagem e secagem, como descrito anteriormente. Em seguida, foram adicionados 200µL de álcool: acetona na proporção 80:20. Em cada placa foi utilizado um poço contendo somente caldo TSB como branco, uma cepa de *Escherichia coli* ATCC® como controle negativo e os testes foram realizados em triplicata. A leitura da densidade óptica (DO) dos poços foi realizada por espectrofotometria a 620nm.

Para classificar os isolados quanto à produção de biofilme, foi medida a densidade óptica média (DO) do controle negativo (DO_{CN}) e comparada com a DO média dos isolados (DO_{IS}), sendo estes classificados como: não produtor de biofilme ($DO_{IS} \leq DO_{CN}$); fraco produtor de biofilme ($DO_{CN} < DO_{IS} \leq 2 \cdot DO_{CN}$); moderado produtor de biofilme ($2 \cdot DO_{CN} < DO_{IS} \leq 4 \cdot DO_{CN}$); forte produtor de biofilme ($4 \cdot DO_{CN} < DO_{IS}$) (STEPANOVIC et al., 2007).

Resultados e discussão

Na análise microbiológica observou-se o crescimento de colônias características de *Enterococcus* spp. em todas as amostras. Após a identificação, observou-se 44,4% (16/36) de *Enterococcus faecalis*, 44,4% (16/36) de *Enterococcus faecium* e 11,2% (4/36) de *Enterococcus durans*.

A presença do gênero *Enterococcus* spp., em todas as amostras analisadas como sendo preocupante, devido isolados deste microrganismo estarem associados frequentemente a infecções clínicas, representando um perigo para a saúde pública.

De acordo com a presença desse microrganismo em queijos produzidos com leite pasteurizado se deve pela sua capacidade de crescimento em uma ampla faixa de temperatura (10°C a 45°C) e sua resistência a altas temperaturas, como por exemplo 60°C por 30 minutos.

Em um estudo realizado por Dias et al. (2019) com amostras de queijo de coalho provenientes da região Agreste do estado de Pernambuco, das bactérias ácido lácticas encontradas o maior número foi de *Enterococcus* spp., sendo 37,1% (29/78). Em um outro estudo, com queijos de coalho do Ceará, observou-se a presença de 47,4% (63/133) de isolados característicos de BAL como sendo *Enterococcus* spp.

(SANTOS e BRUNO, 2016). Na pesquisa realizada por Cabral et al. (2016), onde observou-se 61,9% (123/200) de *Enterococcus* spp. O gênero *Enterococcus* spp. também foi predominante entre as bactérias ácido lácticas (BAL) isoladas de queijo de coalho produzido no estado do Ceará e Rio Grande do Norte (CARVALHO, 2007; BRUNO et al., 2007), corroborando com o atual estudo.

No estudo da susceptibilidade antimicrobiana observou-se que 25% (9/36) dos isolados apresentaram-se sensíveis a todos os antimicrobianos testados. Uma maioria dos isolados apresentou sensibilidade aos antimicrobianos descritos a seguir: 100% (36/36) à ampicilina, norfloxacin, linezolida, penicilina, levofloxacin e teicoplanina; 63,9% (23/36) à nitrofurantoína; 97,2% (35/36) à ciprofloxacina e vancomicina; 36,1% (13/36) à eritromicina; 77,8% (28/36) à tetraciclina.

Ainda no que diz respeito a susceptibilidade aos antimicrobianos testados vale ressaltar que 55,5% (20/36) das cepas isoladas apresentaram resistência a pelo menos um dos antibióticos preconizados para tratamento das infecções causadas por esse microrganismo.

Nos resultados do estudo da resistência observou-se que 22,2% (8/36) foram resistentes à eritromicina e à tetraciclina; 2,7% (1/36) à vancomicina; 36,1% (13/36) à nitrofurantoína, demonstrando que antibióticos usados para o tratamento de processos infecciosos pelo agente *Enterococcus* spp. foram resistentes a essas drogas em isolados do mesmo em queijo de coalho, trazendo a preocupação do uso na clínica desses medicamentos e possível não resposta no combate do processo de uma possível infecção no Homem.

Entre as três diferentes espécies de *Enterococcus* isoladas a partir do queijo de coalho, observou-se 100% de sensibilidade frente a vários antimicrobianos conforme indicado a seguir: *E. faecalis* (Ampicilina-AM, Linezolida-LN, Levofloxacin-LE, Nitrofurantoína-NI, Norfloxacin-NO, Penicilina-PE, Teicoplanina-TE); *E. faecium* (Ampicilina-AM, Ciprofloxacina-CI, Linezolida-LN, Levofloxacin-LE, Norfloxacin-NO, Penicilina-PE, Teicoplanina-TE, Vancomicina-VA); *E. durans* (Ampicilina-AM, Ciprofloxacina-CI, Linezolida-LN, Levofloxacin-LE, Norfloxacin-NO, Penicilina-PE, Teicoplanina-TE, Vancomicina-VA) (Tabela 1), porém é importante ressaltar que a presença da resistência antimicrobiana presente no estudo é preocupante e pode se dar pelo uso de antimicrobianos na medicina humana, na medicina veterinária, e também na produção animal, podendo esses fatores levar a propagação de

multirresistência. Elmali e Can (2018) estudando fatores de resistência de *Enterococcus* spp. isolados de amostras de queijo, verificou que 57% das amostras estudadas apresentaram contaminação por este microrganismo e relatou que 34,4% das amostras isoladas de *E. faecalis*, *E. faecium* e *E. durans* eram resistentes à vancomicina pelo método da difusão em disco, sendo este fato extremamente sério devido a seu uso para controlar Gram-positivos em ambiente hospitalar.

Porto et al. (2016) relataram que 75,48% (40/53) isolados de *Enterococcus* spp. provenientes de amostras de queijo, apresentaram resistência a pelo menos um dos antimicrobianos testados em sua pesquisa, sendo 60,38% (32/53) à eritromicina, 16,98% (9/53) à norfloxacin, 11,33% (6/53) à vancomicina, 9,44% (5/53) à teicoplanina e 7,54% (4/53) à tetraciclina. Santos et al. (2015) observaram resultados em alguns aspectos semelhante a esse trabalho, onde nenhum isolado foi resistente à ampicilina, ciprofloxacina, levofloxacina, linezolida, nitrofurantoína e teicoplanina, nos demais agentes antimicrobianos verificou-se resistência de 55% à tetraciclina, 31% à eritromicina, 6% à penicilina, 1% à norfloxacin e vancomicina. Rocha et al. (2018) observaram resultados de resistência de 19,0% à eritromicina, 15,0% à tetraciclina, 3,0% à vancomicina e 27,0% dos isolados da sua pesquisa apresentaram resistência a pelo menos um dos antimicrobianos testados.

Sugere-se que o uso de antimicrobianos na alimentação animal como promotores de crescimento, pode criar grandes reservatórios de genes de resistência a antibióticos transferíveis em vários ecossistemas e, conseqüentemente, uma possível rota de transmissão de *Enterococcus* spp. resistentes via cadeia alimentar poderia ser sugerido (SHEPARD e GILMORE, 2002). Sabe-se que os *Enterococcus* spp. tendem a sofrer seleção a cada aplicação de antimicrobiano, levando à formação de um reservatório animal de *Enterococcus* spp. resistentes, que podem infectar os seres humanos tanto por contato direto com animais como através da ingestão de alimentos de origem animal (KASZANYITZKY et al., 2007, OLIVEIRA et al., 2010, VIGNAROLI et al., 2011).

No Brasil, o panorama da resistência bacteriana é uma realidade inquietante e o crescente surgimento de novas cepas de bactérias multirresistentes nos hospitais brasileiros vêm causando preocupação entre os profissionais de saúde (COSTA, 2013).

Tabela 1. Susceptibilidade aos antimicrobianos de amostras de *Enterococcus* spp. isoladas de queijo de coalho comercializados em hipermercados da cidade de Recife, PE.

		Agentes antimicrobianos ¹ - número(%)										
Espécies	Perfis de Susceptibilidade ²	AM	CI	ER	LN	LE	NI	NO	PE	TE	TT	VA
(Nº isolados)												
<i>Enterococcus faecalis</i>	S	16(100)	15(93,7)	6(37,5)	16(100)	16(100)	16(100)	16(100)	16(100)	16(100)	10(62,5)	15(93,7)
	I	-	1(6,2)	8(50,0)	-	-	-	-	-	-	-	-
(16)	R	-	-	2(12,5)	-	-	-	-	-	-	6(37,5)	1(6,2)
<i>Enterococcus faecium</i>	S	16(100)	16(100)	4(25,0)	16(100)	16(100)	5(31,2)	16(100)	16(100)	16(100)	15(93,7)	16(100)
	I	-	-	7(43,7)	-	-	3(18,7)	-	-	-	-	-
(16)	R	-	-	5(31,2)	-	-	8(50,0)	-	-	-	1(6,2)	-
<i>Enterococcus durans</i>	S	4(100)	4(100)	3(75,0)	4(100)	4(100)	2(50,0)	4(100)	4(100)	4(100)	3(75,0)	4(100)
	I	-	-	-	-	-	1(25,0)	-	-	-	-	-
(4)	R	-	-	1(25,0)	-	-	1(25,0)	-	-	-	1(25,0)	-
	S	36(100)	35(97,2)	13(36,1)	36(100)	36(100)	23(63,8)	36(100)	36(100)	36(100)	28(77,7)	35(97,2)
Total=36	I	-	1(2,7)	15(41,6)	-	-	4(11,1)	-	-	-	-	-
	R	-	-	8(22,2)	-	-	9(25,0)	-	-	-	8(22,2)	1(2,7)

¹ agentes antimicrobianos: AM, ampicilina; CI, ciprofloxacina; ER, eritromicina; LN, linezolida; LE, levofloxacina; NI, nitrofurantoína; NO, norfloxacina. PE, penicilina; TE, teicoplanina; TT, tetraciclina e VA, vancomicina.

² perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos: S, sensível; I, intermediária e R, resistente.

Na avaliação da capacidade de produção de biofilme todos foram positivos para a formação de biofilme, sendo 77,7% (28/36) isolados classificados como fracos formadores de biofilme e 22,2% (8/36) isolados como moderados formadores de biofilme e não houve nenhum forte formador de biofilme. Observou-se que 100% (4/4) dos isolados de *E. durans* foram fracos formadores de biofilme, 100% (16/16) de isolados de *E. faecium* foram fracos formadores de biofilme, 50% (8/16) de *E. faecalis* foram fracos formadores de biofilme e 50% (8/16) foram moderados formadores de biofilme. Rocha et al. (2018) obtiveram no seu estudo 22,0% dos isolados como fracos formadores de biofilme, não apresentando moderados e fortes formadores de biofilme, diferentemente do estudo.

Pereira et al. (2013) em 79 isolados de *Enterococcus* spp. de amostras de leite bubalino observaram na espécie *E. faecium* 75,9% (22/29) de não formadores de biofilme, 10% (3/29) de moderados formadores de biofilme e 13,8% (4/29) de fortes formadores de biofilme e nenhum fraco formador de biofilme. Já na espécie *E. faecalis* observou 10% (5/50) não formadores de biofilme, 6% (3/50) moderados formadores de biofilme e 20% (10/50) fortes formadores de biofilme, discordante em parte do nosso estudo, onde não obtivemos nenhum forte formador de biofilme.

No estudo de cepas de três linhagens de *E. faecalis* probióticos de amostra de queijo ricota, Baccouri et al. (2019) verificou a habilidade de formação de biofilme em superfícies abióticas como fracos e moderados formadores de biofilme. A adesão em superfícies abióticas não é estudada rotineiramente em cepas probióticas (BUJINAKOVA et al., 2014), mesmo sabendo-se que diversos fatores encontrados na indústria de laticínios podem favorecer a contaminação do leite e seus derivados por biofilme e sendo a principal fonte dessa contaminação a má higienização dos equipamentos usados na sua produção (SREY et al., 2013), ainda estuda-se pouco a formação de biofilme em queijo de coalho e as infecções nosocomiais provocadas por este fator de virulência presente em equipamentos hospitalares.

Conclusão

A presença de *Enterococcus* spp. em queijo de coalho representa um risco à saúde pública no que diz respeito às doenças de transmissão alimentar e às infecções nosocomiais, já que esses microrganismos podem comprometer tratamentos de pacientes em condição hospitalar. A ocorrência de cepas resistentes a antimicrobianos e formadoras de biofilme pode comprometer as opções de

tratamento de doenças bacterianas, sendo estes dados um alerta para as autoridades de saúde pública, já que os antibióticos representam a última escolha terapêutica no tratamento de infecções hospitalares causadas por *Enterococcus* spp. e os biofilmes promovem a permanência de microrganismos nos ambientes e dificultam o processo de tratamento de doenças. Além disso, o monitoramento da susceptibilidade à vancomicina torna-se importante no controle de cepas de *Enterococcus* spp. resistentes (ERV), que representam um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. Diante disso, mais estudos sobre o microrganismo são bastante relevantes, tendo em vista elucidar os demais danos causados pelo patógeno. Assim como posteriores pesquisas avaliando resistência antimicrobiana e o potencial bacteriogênico dessas cepas são necessárias.

Referências

- ANDRADE, A. A.; Estudo do perfil sensorial, físico-químico e aceitação do queijo de coalho produzido no estado do Ceará. *Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias*, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
- ANÓNIMO. Validation of Analytical Methods for Food Control. Report of Joint FAO/IAEA Expert Consultation. **FAO Food and Nutrition**. FAO, Roma, 1998.
- BACCOURI, O.; BOUKERB, A. M.; FARHAT, L. B.; ZÉBRÉ, A.; ZIMMERMANN, K.; DOMANN, E.; CAMBRONEL, M.; BARREAU, M.; MAILLOT, O.; RINCÉ, I.; MULLER, C.; MARZOUKI, M. N.; FEUILLOLEY, M.; ABIDI, F.; CORNNIL, N. Probiotic Potential and Safety Evaluation of *Enterococcus faecalis* OB14 and OB15, isolated from Traditional Testouri Cheese and Rigouta, Using Physiological and Genomic Analysis. **Frontiers in Microbiology**. v. 10, n. 881, p. 1-15, 2019.
- BIOMERIEUX. Vitek® 2 Compact System, 2017. Disponível em: <http://www.Biomerieux-diagnostics.com/vitek-2-gp-id-card>>. Acesso em 22/07/2019.
- BLANCO, A. L.; FREITAS, L. M.; C. R. Avaliação de resistência à Terapia Fotodinâmica em *Enterococcus faecalis*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 17, n. 1, 2016.
- BRUNO, L. M.; CARVALHO, J. D. G.; CARVALHO, A. K. F.; ANDRADE, A. P. C.; QUEIROZ, A. A. M. Caracterização de microbiota láctica isolada de queijos de coalho comercializados no Rio Grande do Norte. Encontro Nacional de Analistas de Alimentos. Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos. Fortaleza. **Anais** n. 15, 2007.
- BUJINAKOVA, D.; STRAKOVA, E.; KMET, V. In vitro evaluation of the safety and probiotic properties of *Lactobacilli* isolated from chicken and calves. **Anaerobe**. v. 29, p. 118-127, 2014.
- CABRAL, M.; LIMA, M.; FERNANDES, G.; COSTA, E.; PORTO, A.; CAVALCANTI, M. Queijos artesanais: fonte de bactérias ácido lácticas selvagens para formulação de

fermentos tradicionais. **Journal of Bioenergy and Food Science**. v. 3, n. 4, p. 207-215, 2016.

CARVALHO, J. D. G. Caracterização da microbiota láctica isolada de queijo de coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas. *Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos)* Departamento de Tecnologia de Alimentos, **Universidade Estadual de Campinas**, Campinas. 154 f, 2007.

CLSI. Normas de desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana: 28º Suplemento Informativo. **CLSI** (Clinical and Laboratory Standards Institute), 2019.

COSTA, F. T. Síntese, caracterização e o estudo do efeito de nano-partículas de $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-YFe}_2\text{O}_3$ em bactérias patogênicas. *Dissertação (Mestrado)* – **Universidade de Brasília**. P. 53, 2013.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**. v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.

DIAS, G. M. P.; SILVA, A. B.; GRANJA, N. M. C.; SILVA, T. N.; LIMA, G. V. M.; CAVALCANTI, M. T. H.; PORTO, A. L. F. Can Coalho cheese lactic microbiota be used in dairy fermentation to reduce foodborne pathogens? **Scientia Plena**. v. 15, n. 2, 2019.

EATON, T. J.; GASSON, M. J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and environmental microbiology*. v. 67, n. 4, p. 1628-1635, 2001.

ELMALI, M.; CAN, H. Y. The prevalence, vancomycin resistance and virulence gene profiles of *Enterococcus* species recovered from different foods of animal origin. **Veterinar ski Arhiv**. v. 88, n. 1, p. 111-124, 2018.

FEITOSA, T.; BORGES, M. F.; NASSU, R. T. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia Alimentar**. v. 23, p. 162-165, 2003.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**. v. 155, n. 6, p. 1749-1757, 2009.

KASZANYITZKY, E. J.; TENK, M.; GHIDÁN, A.; FEHÉVÁRI, G. Y.; PAPP, M. Antimicrobial susceptibility of enterococci strains isolated from slaughter animals on the data of Hungarian resistance monitoring system from 2001 to 2004. **International Journal of food microbiology**. v.115, n. 1, p. 119-123, 2007.

KONEMAN, E. W. et al. *Enterococcus*. In: KONEMAN, Elmer W. (Ed.). **Diagnóstico microbiológico**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 589-659, 2014.

LIMA, Z. N. Antibiograma pela técnica de Kirby Bauer. **Universidade Estadual da Paraíba**, 2016.

LOSSOUARN, J.; BRIET, A.; MONCAUT, E.; FURLAN, S.; BOUTEAU, A.; SON, O.; LEROY, M.; DUBOW, M. S.; LECOINTE, F.; SERROR, P.; PETIT, M. A. *Enterococcus faecalis* Counter measures Defeat a Virulent Picovirinae Bacteriophage; **Journal viruses**. v. 11, n. 1, p. 48. 2019.

MACHADO, A. M. O; GALES, A. C. Interpretação de dados microbiológicos. **ATM racional**.2008,<http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rederm/cursos/atmracional/modulo2/metodos5.htm>, Acesso em 28/08/2019.

MONTOYA, R. R.; OLIVA, V. S.; PAREDES, J. C.; ANGULO, N. C.; RAMOS, G. C.; MONTOYA, M. R. Variables associadas a custos em cuidados intensivos. **Revista de la Asociación Mexicana de Medicina Crítica y Terapia Intensiva**. v. 29, n. 3, p. 138-144, 2015.

NASSU, R. T.; ARAÚJO, R. S.; GUEDES, C. G. M.; ROCHA, R. G. A. Diagnóstico das condições de processamento e caracterização físico-química de queijos regionais e manteiga do Rio Grande do Norte. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento**. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, p.24, 2003.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNETA, D. F.; PICCOLI, R. H. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v. 69, n. 3, 2010.

PEREIRA, F. G. F.; SOUZA, N. L.; SILVA, E. M. M.; SILVA, J. B.; SARAIVA, E. M.; RANGEL, C. T. Characterization of infections related to health care in a neonatal intensive care unit. **Vigil. Sanit. Debate**. v. 4, n. 1, p. 70-77, 2016.

PEREIRA, R. I.; PRICHULA, J.; SANTESTEVAN, N. A.; D'AZEVEDO, P. A. Identificação genotípica, fatores de virulência e capacidade de formação de biofilme in vitro de *Enterococcus* spp. isolados de leite bubalino no sul do Brasil. **Instituto Brasileiro de Informação em Ciência e Tecnologia**. 2013.

PORTO, B. C.; FUJIMOTO, G.; BORGES, M. F.; BRUNO, L. M.; C, J. D. G. Determinantes de virulência em *Enterococcus* endógenos de queijo artesanal. **Revista Ciência Agronômica**. v. 47, n. 1, p. 69-76, 2016.

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

ROCHA, K. R.; TERRA, M. R.; FURLANETO, M. C.; MAIA, L. F. Análise genotípica e fenotípica de *Enterococcus* spp. provenientes de amostras clínicas e de alimento. **Brazilian Journal of Sugery and Clinical Research**. v.23, n. 1, p. 53-59, 2018.

RODRIGUES, L. B. et al. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, p1082-1085, 2010.

SANTOS, K. M.; VIEIRA, A. D. S.; ROCHA, C. R. C.; NASCIMENTO, J. C. F.; LOPES, A. C. S.; BRUNO, L. M.; CARVALHO, J. D. G.; FRANCO, B. D. G. M.; TODOROV, S. D. Brazilian artisanal cheeses as a source of beneficial *Enterococcus faecium* strains: characterization of the bacteriocinogenic potential. **Annals of Microbiology**. v. 64, n. 4, p. 1463-1471, 2014.

SANTOS, J. G.; BRUNO, L. M. DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS DE QUEIJO DE COALHO ARTESANAL DA REGIÃO DO JAGUARIBE, CE. **25º Congresso Brasileiro de Tecnologia dos Alimentos**. FAURGS. Gramado, RS, 2016.

- SANTOS, V. S.; BARRETO, A. S.; LEMSADDEK, T. S. Characterization of Enterococci from food and Food- Related Settings. **Journal of Food Protection**. v. 78, n. 7, p. 1320-1326, 2015.
- SILVA, R. A.; LIMA, M. S. F.; VIANA, J. B. M.; BEZERRA, V. S.; PIMENTEL, M. C. B.; PORTO, A. L. F.; CAVALCANTI, M. T. H.; LIMA FILHO, J. L. Can artesanal “coalho” cheese from Northeastern Brazil be used as a functional food? **Food Chemistry**. v. 135, p. 1533-1538, 2012.
- SHEPARD, B. D.; GILMORE, M. S. Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. **Microbes and Infection**. v. 4, n. 2, p. 215-224, 2002.
- SHIRTLIFF, M. E.; MADER, J. T.; CAMPER, A. K. Molecular interactions in Biofilms. **Chemistry & biology**. v. 9, n. 8, p. 859-871, 2002.
- SREY, S; JAHID, I. K.; HA, S. Biofilm formation in food industries: a food safety concern. **Food Control**. v. 31, n. 2, p. 572-585, 2013.
- STEPANOVIC, S; VUKOVIC, D; HOLA, V; BONAVENTURA, G; DJUKIC, S; CIRKOVIC, I; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Journal Compilation**. v. 115, p. 891-899, 2007
- STINGHEN, A.E.M.; ALBINI, C.A.; SOUZA, H.A.P.H. Coloração de Gram, como fazer, interpretar e padronizar. **Microscience**, 2002. 70p.
- TERRA, M. R.; FURLANETO, M. C.; MAIA, L. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**. v. 22, n. 1, p. 86-93, 2018.
- URQUHART, C.; CASAGRANDE, C.; FREITAS, L. S.; ZARZICKI, F.; ALVES, C. F. S.; SANTOS, R. C. V. Atividade antibiofilme da cumarina frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Anais do 10º Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, **Universidade Federal do Pampa**, 2019.
- VIGNAROLI, C.; ZANDRI, G.; AQUILANTI, L.; PASQUAROLI, S.; BIAVASCO, F. Multidrug-resistant Enterococci in meat and faeces and co-transfer of resistance from an *Enterococcus durans* to a human *Enterococcus faecium*. **Current Microbiology**. v. 62, n. 5, p. 1438-1447, 2011.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo foi importante pois evidenciou a presença de contaminação no queijo de coalho industrializado por *Enterococcus* spp., e com possíveis riscos, futuras complicações, como infecções por este microrganismo resistente a antimicrobianos usados como de escolha para combater patologias decorrentes dos mesmos, principalmente em indivíduos hospitalizados e imunocomprometidos. Este microrganismo é considerado emergente devido a esse envolvimento em infecções hospitalares e essa presença passa a ser muito preocupante. Verificou-se também a capacidade dos *Enterococcus* spp. formarem biofilme “in vitro”, tendo também como um ponto que sirva de alerta para a saúde pública, pois os biofilmes favorecem à persistência da bactéria no ambiente. Entretanto mais estudos devem ser realizados sobre a qualidade microbiológica desse tipo de queijo, seus fatores de virulência e resistência pois é muito consumido e de grande importância para a economia do Nordeste. Essa pesquisa também servirá de alerta aos laticínios, produtores de queijo de coalho e autoridades de saúde.