

## IDENTIFICAÇÃO DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* EM QUEIJO COLONIAL EM COMUNIDADE RURAL DO MEIO OESTE CATARINENSE

Rafaela Ansiliero\*

Nathalia Turkot Candiago\*

Jane Mary Lafayette Neves Gelinski\*\*

### Resumo

O *Enterococcus faecalis* é um patógeno que vem apresentando resistência a vários antimicrobianos de uso clínico, além de estar presente em alimentos pela falta de higiene durante a produção. Assim, buscou-se avaliar metodologias de identificação de *E. faecalis* e sua prevalência em queijos coloniais. Utilizou-se linhagem padrão de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 realizando testes básicos de identificação: reação de Gram, prova de catalase, crescimento em alta concentração de sais, telurito, hemólise e perfil de sensibilidade antibioticos pelo método Kirby-Bauer. A análise em alimentos foi feita a partir de duas amostras de queijos coloniais, coletadas no interior do meio oeste catarinense. Analisou-se a presença de *E. faecalis*, coliformes totais e fecais e *Salmonella* sp. Constatou-se que o *E. faecalis* é uma bactéria Gram-positiva, catalase negativa, anaeróbio facultativo, halofílico, gama hemólise e telurito positivo, sensível a maioria dos antibióticos testados. Foi detectado presença de *E. faecalis* em uma das amostras de queijo, coliformes totais e *E. coli*; ambas não apresentaram *Salmonella* sp. As metodologias utilizadas para identificação de *E. faecalis* foram eficientes. Portanto, o mesmo pode ser encontrado em queijos, constituindo-se um risco para os consumidores em geral.

Palavras-chave: Queijos. Antibiograma. Kirby-Bauer.

## 1 INTRODUÇÃO

Um organismo liofilizado, segundo Black (2002, p.150). é aquele mantido em estado inativo. Existem culturas liofilizadas em bancos de linhagens nacionais e internacionais de diversos microrganismos, dentre quais o *Enterococcus faecalis*. Segundo Barros (2014, p.5) é um microrganismo Gram-positivo, anaeróbico facultativo e, considerado um patógeno oportunista, sendo a segunda e terceira causa de infecções hospitalares no mundo.

Os *Enterococcus* são bactérias que estão presentes no trato intestinal de humanos e animais, mas também em alimentos como culturas iniciais para fabricação de queijo e enchidos fermentados. E, além disso, são contaminantes fecais de carne crua, leite e produtos lácteos (BIAVASCO *et al.*, 2007).

Conforme evidenciam Mucinhato e outros (2015), linhagens de *E. faecalis* vêm demonstrando resistência a diversos antimicrobianos de uso clínico. A resistência a antimicrobianos é considerada um grande problema, pois também é causada pelo processo de evolução das bactérias, ou seja, por mudança espontânea e alteração de genes os quais, resultam em variabilidade genética (ANDRADE, 2008 *apud* KOHL, 2016).

Medina e outros (2000) citam em seu artigo que os *Enterococcus* encontrados em queijos artesanais produzidos com leite cru são resultado da falta de higiene durante a ordenha ou fabricação.

Os *Enterococcus sp.* (GIRAFFA, 2003) contaminam alimentos através de fezes ou do ambiente. Multiplicam-se até sob condições de refrigeração do leite, podendo sobreviver ao processo de pasteurização, constituindo assim em risco à saúde dos consumidores.

Produtos artesanais tem o apelo de ser mais natural e saudável, pois não contém conservantes ou aditivos que reduzem ou eliminam contaminação microbiológica. No entanto, por isso mesmo é mais vulnerável a contaminação e menor tempo de vida de prateleira (*shelf-life*), principalmente se é elaborado sem boas práticas de higiene.

A partir do exposto, buscou-se avaliar as metodologias básicas de Identificação de *Enterococcus faecalis* em queijos coloniais artesanais.

## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 METODOLOGIA

A pesquisa foi desenvolvida no Núcleo Biotecnológico da Universidade do Oeste de Santa Catarina (Unoesc) em Videira/SC, no laboratório de Biotecnologia Aplicada à Agroindústria e a Saúde, como parte integrante do componente curricular de Microbiologia II (1ºSem. 2018). Neste componente, a proposta de metodologia ativa foi definida como sendo a mais adequada para a formação em Microbiologia. Trata-se de projeto simples, exequível em pouco tempo, com avaliação crítica e monitorada durante o desenvolvimento pela professora orientadora.

#### 2.1.1 Identificação

Foi utilizada cultura liofilizada de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, inoculada em Brain-Heart Infusion Broth (BHI) (Acumedia®), com incubação em estufa bacteriológica por 24 horas +/- 2 horas em condição de aerobiose e de anaerobiose nas temperaturas de 28°C +/- 1°C e 37°C +/- 1°C, a fim de analisar o melhor ambiente para crescimento da linhagem. Com o objetivo de desenvolver um ambiente com reduzida tensão de oxigênio, fez-se uso de jarras de anaerobiose.

Alíquotas de cultura em caldo Brain-Heart Infusion BHI (Himedia®), e inoculou pela técnica spread plate ágar ar BHI (Himedia®), a temperatura de 37°C +/- 1°C. Decorridas 24 horas, seguiram-se os testes bioquímicos para identificação de *E. faecalis*. Segundo Herve e Porte (2007) esses patógenos se caracterizam por ser: catalase (negativa), NaCl 6,5% (+), tolerância ao telurito, gama hemólise ( $\gamma$ ) entre outros.

A morfologia e reação ao Gram foi analisada por microscopia óptica de luz (Nikon), com aumento total de 1600x (obj.100x/oc.16x). Em seguida foi realizada a prova da catalase, analisando o surgimento de bolhas quando adicionado peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 3% sobre a colônia bacteriana. Inoculou-se também o microrganismo em Caldo Triptona (Synth) com 6,5% de NaCl, verificando se o mesmo seria capaz de se desenvolver em altas concentrações de sais. O meio ágar Baird Parker (BP) (Acumedia®) acrescido de telurito a 1% e 5% de Egg Yolk (Newprov) foi utilizado a fim de verificar se o isolado cresce e tem tolerância ao telurito. Observou-se também, a capacidade de hemólise do microrganismo em Columbia Blood ágar base (Himedia®), acrescido de 5% de sangue de cordeiro (Newprov), com incubação a 35°C/24h.

No decorrer dos testes, a cultura foi mantida em ágar BHI inclinado e armazenada em geladeira. A fim de assegurar a viabilidade da cepa, o mesmo foi congelado, adicionando-se a cultura previamente crescida a 37°C/24 h em caldo BHI, 20% de glicerol em criotubos estéreis, mantidos a 20°C.

### 2.1.2 Antibiograma

O antibiograma foi realizado para testar a resistência da cepa a diversas drogas antimicrobianas. Para isso, utilizou-se do meio de cultura ágar Mueller Hinton (MH) (Kasvi), pelo método amplamente estabelecido de Difusão em disco Kirby- Bauer. A partir de colônias isoladas em ágar BHI de 24 horas +/- 2h, realizou-se suspensão dos microrganismos em um tubo contendo água destilada estéril, com turbidez ajustada segundo a escala 0,5 de McFarland (Laborclin). Submergiu-se um swab de algodão no tubo com a suspensão bacteriana, retirando o excesso de inóculo e semeando sobre a superfície do ágar MH.

Os antibióticos em multidiscos para os teste são de uso comum para Gram-positivos (Laborclin) e inclui as drogas: Cefepime (COM) 30ug; Ciprofloxacina (CIP) 5ug; Clindamicina (CLI) 2ug; Cloranfenicol (CLO) 30ug; Eritromicina (ERI) 15ug; Gentamicina (GEN) 10ug; Oxacilina (OXA) 1ug; Penicilina-G (PEN) 10ug; Rifampicina (RIF) 5ug; Sulfazotrim (SUT) 25ug; Tetraciclina (TET) 30ug e Vancomicina (VAN) 30ug. Os discos foram inseridos sobre o ágar MH previamente semeado com o microorganismo e as placas incubadas a 37°C/24h. Decorrido tempo, realizou-se a medição dos diâmetros (mm) dos halos de inibição formados em torno de cada disco com régua padrão (Laborclin).

### 2.2.3 Análise em alimentos

Foram coletados dois queijos coloniais, ambos com até 15 dias de maturação, produzidos de forma artesanal em duas propriedades rurais do interior do meio oeste catarinense.

Embora não estabelecida pela legislação vigente (BRASIL, 2001) foi realizada contagem de *Enterococcus faecalis*, om o objetivo de obter um padrão microbiológico também foram realizadas análises de coliformes totais, coliformes a 45 °C e *Salmonella sp.*, que compõem duas das análises exigidas pela legislação nacional (BRASIL, 2001) para queijos de média umidade.

Para Contagem de *Enterococcus faecalis*, 25 gramas das amostras foram homogeneizadas em 225mL de APT 0,1% (Merck), realizou-se as diluições decimais seriadas e inoculou-se 0,1 mL em placas de petri com ágar Bile Esculina (KASVI); testes realizados em duplicata. O *E. faecalis* caracteriza-se como uma bactéria Bile-Esculina positiva, sendo capaz de hidrolisar o esculina do meio em presença de bile, crescendo com coloração negra (HERVE; PORTE, 2007).

As placas de petri foram incubadas a 37°C +/- 1°C por 48 horas, decorrido tempo realizou-se a identificação das colônias suspeitas através de coloração de Gram, prova da catalase, crescimento em 6,5% de NaCl e telurito, conforme já citado. O *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 foi utilizado como cultura padrão/controle, e água destilada como controle negativo.

Para análise de coliformes totais e termotolerantes seguiu-se a metodologia descrita em Silva et al. (2017). Foram homogeneizados 25 gramas das amostras em 225mL de APT 0,1% e inoculado até a diluição 10<sup>-3</sup> em triplicada em tubos contendo caldo Lauryl Sulfate (Merck) com tubinhos Durhan. Os mesmos foram incubados em banho-Maria 35°C/48 horas. Dos tubos com turbidez e formação de gás foram retiradas alíquotas e inoculadas em tubos contendo caldo Ec Medium (EC) (Acumedia®) e caldo Brilliant Green Bile 2%(VB) (Himedia®), o primeiro incubado a 44,5°C e o segundo à 35°C (banho-maria) ambos por 24 horas sob agitação. Para positivos em EC, inoculou-se por estria com alça de Köhler em meio Eosin Methylene Blue Agar (EMB)(Acumedia®) para confirmação de *E. coli*, seguindo-se para as provas bioquímicas Indol (Ind) Vermelho-de-Metila (VM), Voges-Proskauer (VP) e citrato.

Para análise de Salmonella seguiu-se a metodologia descrita em Silva et al. (2017). Foi realizado o pré-enriquecimento mantendo 25 gramas das amostras em 225mL de APT 1% em sacos estéreis (Nasco®) a 37°C/24h. Após, 1mL da caldo APT foi transferido para tubo contendo 10mL de caldo tetritionato (Oxoid) e 1mL para um tubo contendo 10mL de Caldo Rappaport-Vassiliadis(Acumedia®). O primeiro incubado a 35°C e o segundo a 41.5°C/24h. Em seguida, inoculou-se uma alçada de cada cultura de enriquecimento em placas contendo ágar Xylose-Lisine Deoxycholate (XLD) (Himedia®) e Bismuth Sulphite Agar (Acumedia®), ambos com incubação a 37°C/24h. Todos os testes foram realizados em duplicata.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 CONFIRMAÇÃO DA IDENTIFICAÇÃO DE *E. faecalis*

Os meios de culturas utilizados para a reativação do microrganismo liofilizado, caldo BHI e ágar BHI geraram um crescimento favorável em todas as temperaturas e condições de disponibilidade de oxigênio testadas no período de 24 horas, dando como indicativo que a bactéria é anaeróbia facultativa.

As colônias no ágar BHI se apresentaram de forma circular, com pequena elevação e apresentando margem inteira. Logo, na análise microscópica por coloração de Gram, identificou-se que os microrganismos são cocos Gram-positivos. Desta forma, a prova da catalase apresentou resultado negativo, porém houve crescimento bacteriano no caldo Triptona 6,5% de NaCl, assim como enegrecimento no meio BP com Telurito a 1%. Segundo Herve e Porte (2007) a diferenciação entre *Enterococcus faecalis* e *faecium* pode-se dar pelo telurito, sendo o primeiro capaz de multiplicar-se em presença do composto. A gama hemólise em ágar sangue de cordeiro também foi verificada. A partir dos testes realizados confirmou-se microrganismo em questão era *Enterococcus faecalis*. Pois, essas bactérias apresentou características compatíveis conforme descrito por Herve e Porte (2007).

#### 3.2 ANTIBIOGRAMA

A cepa de *Enterococcus faecalis* com perfil antimicrobiano testado apresentou resistência a Clindamicina e com 100% de resistência a Oxacilina. A mesma também apresentou perfil intermediário a Tetraciclina e a Cefepime. Logo, o isolado se mostrou sensível a 66,6% (n=8) dos antibióticos testados (Figura 1). Portanto, a Clindamicina surtiu pouco efeito sobre a linhagem testada.

Esse mesmo resultado foi encontrado por Elias (2017) em seu projeto, afirmando que, na clindamicina, as taxas de resistência foram de 100% para os isolados de *E. faecalis*. Com isso, Trabulsi e Alterthum (2017) expressam o caso dessas alterações, como sendo constantemente adquiridas, logo que, quando genéticas podem ser originadas de mutações cromossômicas, ou até mesmo adquiridas de plasmídeos de resistência ou de transposons.

### 3.1.1 Análise em alimento

Nas amostras de queijo colonial, foi encontrado *Enterococcus faecalis* em uma das amostras, num total de  $1,1 \times 10^9$  UFC/g (Figura 2). Em Pernambuco, Cabral (2016) também evidenciou numerosa população de *Enterococcus* sp. quando analisou amostras de queijo artesanal.

A presença de coliformes totais foi constada nas duas amostras. Logo, na amostra 1 obteve-se 3,6 coliformes a 45°C/g e confirmação de *E. Colli*, sendo que a Anvisa (BRASIL, 2001) prevê nível máximo de 1000 coliformes a 45°C/g. A resolução também consta ausência de salmonella/25g, estando de acordo com os resultados obtidos.

No desenvolvimento da pesquisa houve o aparecimento de larvas cilindros com pontuação negra no início do corpo, nas placas de cultura de Bile Esculina de ambos os queijos após alguns dias de incubação. Segundo Garcia (2001) podem existir larvas que vivem no queijo, assim como em demais alimentos. Sendo que, em geral pertencem a *Piophilidae* casei, conhecida como mosca do queijo.

Os microrganismos e vermes indesejados pode ser podem ser oriundos de falhas graves na higienização de equipamentos, água de baixa qualidade, assim como pela mão de obra pouco-qualificada (CASTRO et al., 2016).

#### 4 CONCLUSÃO

Conforme o exposto, nota-se que as metodologias utilizadas para caracterização de *Enterococcus faecalis* foram altamente eficientes para sua identificação. Sendo um microrganismo Gram-positivo, catalase negativo, com capacidade de crescer em alta concentração de sais, e potencial patogênico. Contudo, a linhagem apresentou-se sensível a maioria dos antimicrobianos testados, porém expressou-se resistente a Clindamicina e a Oxacilina.

A presença de *E. faecalis* em uma das amostras de queijo colonial artesanal observadas, e demais microrganismos patógenos como a *E. Coli* evidencia que a higiene no processo é falha, necessitando de orientação visando a redução de riscos à saúde do consumidor.

#### REFERÊNCIAS

BARROS, Mariana Vilhena. Infecções Nosocomiais por *Enterococcus faecalis*. 2014. 66 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014.

BIAVASCO, F et al. VanA-Type Enterococci from Humans, Animals, and Food: Species Distribution, Population Structure, Tn1546 Typing and Location, and Virulence Determinants. *Applied And Environmental Microbiology*, v. 73, n. 10, p. 3307-3319, Maio 2007.

BLACK, Jacquelyn G. *Microbiologia: fundamentos e perspectivas*. 4. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 829 p.

BRASIL, 2001. Agência Nacional de Vigilância Sanitária- ANVISA. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC\\_12\\_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b)>. Acesso em: 31 maio 2018.

CABRAL, Maria Luiza Barros et al. Queijo artesanal: uma fonte potencial de bactérias do ácido láctico selvagem para obter novas culturas iniciais. *Jornal de bioenergia e ciência dos alimentos*, v. 3, n. 4, p. 207-215, 2016.

CASTRO, R. D. et al. Lactic acid microbiota identification in water, raw milk, endogenous starter culture, and fresh Minas artisanal cheese from the Campo das Vertentes region of Brazil during the dry and rainy seasons. *Journal of dairy science*, v. 99, n. 8, p. 6086-6096, 2016.

ELIAS, Darcielle Bruna Dias. Perfil de sensibilidade antimicrobiana em urinoculturas de um hospital universitário do estado do Ceará no período de janeiro a junho de 2015. *RBAC*, v. 49, n. 4, p. 381-9, 2017.

GARCIA, João Brogotá Perdigão. *Brachycera: entomologia, patogenia e controle na indústria de alimentos*. São Paulo. Fev. 2011. Disponível em: <<http://www.crbiodigital.com.br/portal?txt=3877313032>>. Acesso em: 31 maio 2018.

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

HERVE E, Beatrice; PORTE T, Lorena. *Enterococcus sp Parte II*. *Rev. chil. infectol.*, Santiago, v. 24, n. 4, p. 311-312, agosto 2007. Disponível em: <[https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-10182007000400009&lng=es&nrm=iso](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182007000400009&lng=es&nrm=iso)>. Acesso em: 23 maio 2018.

KOHL, Tatiane. Resistência antimicrobiana de bactérias isoladas de amostras de animais atendidos em hospital veterinário. Santa Catarina, 2016. Disponível em: <<file:///C:/Users/Usuario/Downloads/1197-5453-1-PB.pdf>>. Acesso em: 02 jun. 2018.

MEDINA, Roxana et al. Characterization of the Lactic Acid Bacteria in Ewe's Milk and Cheese from Northwest Argentina. *Journal of Food Protection*, v. 64, n. 4, p. 559-563, 2001.

MUCINHATO, Raísa Moreira Dardaque et al. *Enterococcus spp. Isolados de Alimentos Vegetais: Análise da Resistência a Antimicrobianos*. *Blucher Biochemistry Proceedings*, v. 1, n. 2, p. 99-102, 2015.

SILVA, Neusely da, et al. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água*. 5. ed. São Paulo: Blucher, 2017. 560 p.

TRABULSI, Luiz Rachid; ALTERTHUM, Flavio. *Microbiologia*. 6. ed. São Paulo: Atheneu, 2017. 888 p.

Sobre o(s) autor(es)

\*Acadêmicas do curso de Bacharelado em Biotecnologia Industrial pela Universidade do Oeste de Santa Catarina em Videira, SC.

\*\*Professora orientadora, componente curricular Microbiologia II.

E-mail: rafaelaansiliero19@gmail.com; nathalia.turkot@hotmail.com

Figura 1 - Perfil de sensibilidade a antimicrobianos por linhagem de *Enterococcus faecalis*

Droga	Dose ( $\mu\text{g}$ )	Halos Inibição (mm)	Perfil	Diâmetro das zonas de inibição (mm)		
				R	I	S
ERI	15	27	S	$\leq 13$	14-22	$\geq 23$
PEN	10	25	S	$\leq 14$	-	$\geq 15$
CPM	30	15	I	$\leq 14$	15-17	$\geq 18$
GEN	10	22	S	$\leq 12$	13-14	$\geq 15$
VAN	10	20	S	$\leq 14$	15-16	$\geq 17$
CIP	5	27	S	$\leq 15$	16-20	$\geq 21$
SUT	25	23	S	$\leq 10$	11 - 15	$\geq 16$
TET	30	17	I	$\leq 14$	15-18	$\geq 20$
CLO	30	30	S	$\leq 12$	13-17	$\geq 18$
RIF	5	25	S	$\leq 16$	17-19	$\geq 20$
OXA	1	0	R	$\leq 9$	10-13	$\geq 14$
CLI	2	10	R	$\leq 14$	15-20	$\geq 21$

Fonte: Os autores (2018)

Legenda: S= Sensível ao antimicrobiano, R= Resistente ao antimicrobiano, I=Intermediário.  
 ERI: Eritromicina; PEN:Penicilina G; CPM:Cefepime; GEN:Gentamicina; VAN:Vancomicina;  
 CIP:Ciprofloxacina; SUT:Sulfazotrim; TET:Tetraciclina; CLO:Cloranfenicol; RIF:Rifampicina;  
 OXA:Oxacilina; CLI:Clindamicina.

Figura 2 - Resultado nas análises microbiológicas realizadas com amostras de queijos coloniais.

	<i>Enterococcus Faecalis</i> (UFC/g)	Coliformes totais (NMP/g)	Coliformes Termotolerantes (NMP/mL)	<i>Escherichia Coli</i>	<i>Salmonella</i>
Amostra 1	0	$1,5 \times 10^3$	$3,6 \times 10^0$	Presença/ 25g	Ausência/25g
Amostra 2	$1,09 \times 10^3$	$> 1,1 \times 10^3$	$< 3,0$	Ausência/25g	Ausência/25g
Controle Negativo	0	$< 3,0$	$< 3,0$	Ausência/25g	Ausência/25g
Controle/Padrão positivo	$2 \times 10^3$ UFC/mL				

Fonte: Os autores (2018).