

Aplicação da PCR na identificação de *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* em queijos artesanais

Celina Mara Soares¹
Dirce Yorika Kabuki²
Arnaldo Yoshiteru Kuaye³

Ilustração: Marcos Moulin



Introdução

No Brasil é comum a utilização de leite cru na fabricação de queijos artesanais. Para a indústria de laticínios, esta matéria-prima contribui como fonte de bactérias ácido lácticas com propriedades tecnológicas favoráveis. Entretanto, a utilização de leite cru na produção de alimentos também representa uma importante fonte de microrganismos patogênicos à saúde humana (BINTSIS; PAPADEMAS, 2002). Em alguns tipos de queijo, *Enterococcus* é apontado como o gênero predominante da microflora de bactérias ácido lácticas. Este gênero também representa uma parte importante da microbiota de alimentos fermentados, especialmente de queijos produzidos com leite cru, onde contribuem para a ocorrência de características organolépticas desejáveis, relacionadas à consistência e aroma característicos, obtidos através das atividades proteolítica e lipolítica, além da produção de compostos voláteis importantes (GIRAFFA; CARMINATI; NEVIANI, 1997; MANOLOPOULOU et al., 2003; SARANTINOPOULOS

et al., 2001; SARANTINOPOULOS; KALANTZOPOULOS; TSAKALIDOU, 2001). Entretanto, a atuação de espécies de enterococos como agente etiológico de infecções humanas é conhecida. Nos últimos anos, algumas espécies têm adquirido maior importância em quadros nosocomiais como patógenos oportunistas (GIRAFFA, 2002). *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* são exemplos de espécies nas quais foram detectados fatores de virulência associados à patogenicidade e virulência do gênero bacteriano (MANNU et al., 2003; QIN et al., 2000; RICE et al., 2003; SEMEDO et al., 2003). Geralmente, a identificação das espécies de enterococos é realizada através de testes bioquímicos demorados e de difícil reprodução e interpretação. Estas limitações constituem consequências diretas da ausência de variações fenotípicas entre as espécies (FACKLAM; CARVALHO; TEIXEIRA, 2002).

O presente estudo teve por objetivo isolar e a identificar *E. faecium* e *E. faecalis*, provenientes de amostras de queijos artesanais, por meio de

¹ Médica Veterinária, D.Sc. em Tecnologia de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, celina@ctaa.embrapa.br

² Bióloga, D.Sc. em Tecnologia de Alimentos, Bióloga da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, Campinas, SP, kabuki@fea.unicamp.br

³ Engenheiro de Alimentos, D.Sc. em Tecnologia de Alimentos, Professor da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, Campinas, SP, kuaye@fea.unicamp.br

metodologia rápida e de fácil execução.

Material e Métodos

As amostras de queijos artesanais foram coletadas em estabelecimentos atacadista e varejista do interior do Estado de São Paulo.

Isolamento e confirmação do gênero

Primeiramente, 25 g de cada amostra foram homogeneizadas em 225 mL de solução de citrato de sódio 2%. Diluições decimais seriadas foram semeadas em ágar KF *Streptococcus* e incubadas a 45°C por 48 horas, conforme metodologia descrita por Hartman, Deibel e Sieverding (2001).

Foram isoladas cento e cinquenta e cinco colônias típicas que foram submetidas aos testes de confirmação de gênero (HARTMAN; DEIBEL; SIEVERDING, 2001).

Cada colônia foi transferida para um tubo contendo caldo BHI (Brain Heart Infusion) e, após incubação a 35°C/18-24 h, foram preparadas lâminas para a coloração de Gram para observação da morfologia característica de enterococos (cocos gram positivos, em pares ou, eventualmente, em cadeias curtas). Para a confirmação do gênero, foram realizados os testes em caldo BHI quanto ao crescimento em 6,5% de NaCl; pH 9,6; e a 45°C e 10°C; além do teste de atividade da catalase.

Cento e quarenta e sete colônias presuntivas de enterococos (gram positivas, catalase-negativas, capazes de apresentar crescimento em pH 9,6, e em temperaturas de 45°C e 10°C) foram submetidas a análises moleculares para a identificação de *E. faecium* e *E. faecalis*.

Identificação de *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* através da PCR (Reação da Polimerase em Cadeia)

Extração de DNA

A extração de DNA bacteriano dos isolados presuntivos de *Enterococcus* spp seguiu a metodologia preconizada por Furrer et al. (1991), com modificações. Inicialmente, cada um dos isolados foi inoculado em caldo BHI e incubado a 35°C/24 h. Em seguida, 600 µL foram transferidos para tubos eppendorf e centrifugados a 13000 g por 10 min. Após o descarte do sobrenadante, o pellet foi ressuspenso em 95 µL de Tampão PCR 1x (50 mM KCl, 10 mM Tris HCl), ao qual foi adicionado 4 µL de solução lisozima (50 mg/mL) e mantido à temperatura ambiente por 15 min. Numa próxima etapa, adicionou-se 1 µL de proteinase K (20 mg/mL), com

incubação em banho-maria a 60°C, durante 60 min. Em seguida, as amostras de DNA dos isolados foram submetidas a 95°C/8min e estocadas a -20°C.

Reação

Os primers utilizados nas análises moleculares estão listados na TABELA 1. Para a identificação das espécies foram utilizados os genes *ddl_{E. faecium}* e *ddl_{E. faecalis}* (DUTKA-MALEN; EVERS; COURVALIN, 1995). Cada reação (25 µL) foi constituída por: 0,625 U de Taq Polimerase, 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dNTP), 2,0 mM MgCl₂, tampão PCR 1x (20 mM Tris HCL, 50mM KCl) e 25 pmol de cada primer. As condições utilizadas para a amplificação foram: ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 2 min; seguido por 30 ciclos a 94°C por 30 s, 54°C por 30 s e 72°C por 30 s; seguidos por um ciclo de extensão a 72°C por 10 min (MASCHIETO et al., 2004). Em todas as reações, *E. faecium* ATCC 6569 e *E. faecalis* ATCC 29212 foram utilizados como controle. As reações foram conduzidas no Termociclador Gradient (Eppendorf). Os produtos amplificados foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, comparando os fragmentos com um marcador de peso molecular 100 bp ladder (FIGURAS 1 e 2).

Resultados e Discussão

Isolamento e confirmação do gênero

De um total de 155 colônias analisadas, 147 (94,8%) apresentaram resultados característicos aos testes de isolamento e confirmação de gênero. Esses isolados presuntivos de *Enterococcus* spp foram submetidos às análises moleculares (PCR) para a identificação das espécies.

Identificação de enterococos através da PCR

Dos 147 isolados presuntivos, 121 (82,3%) foram identificados como *E. faecium* através da PCR. Nenhum *E. faecalis* foi identificado entre os isolados analisados. Estes resultados corroboram os relatos apresentados por pesquisadores sobre a prevalência de *E. faecium* em amostras de alimentos, particularmente, em laticínios. De modo geral, esta espécie é a predominante entre os enterococos isolados de amostras de queijo (CARIOLATO; ANDRIGHETTO; LOMBARDI, 2008; GOMES et al., 2008).

Vinte e seis isolados presuntivos (18,4%) apresentaram resultados negativos frente à pesquisa dos genes de identificação de espécie *ddl_{E. faecium}* e *ddl_{E. faecalis}*, embora tenham sido confirmados como *Enterococcus* spp através dos testes bioquímicos. Os resultados indicam que, provavelmente, estes isolados

pertencem a outras espécies do gênero.

Considerando os resultados obtidos, pôde-se concluir que a aplicação da técnica de PCR representa uma alternativa rápida de fácil execução para a identificação de *E. faecium* e *E. faecalis*.

TABELA 1. Primers utilizados na PCR para a detecção de genes de identificação *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*

Gene e primer	Sequência (5' – 3')	Produto (bp)
<i>ddl_{E. faecium}</i>		
F1	GCAAGGCTTCTTAGAGA	550
F2	CATCGTGTAAGCTAAC TTC	
<i>ddl_{E. faecalis}</i>		
E1	ATCAAGTACAGTTAGTCT	941
E2	ACGATTCAAAGCTAACTG	

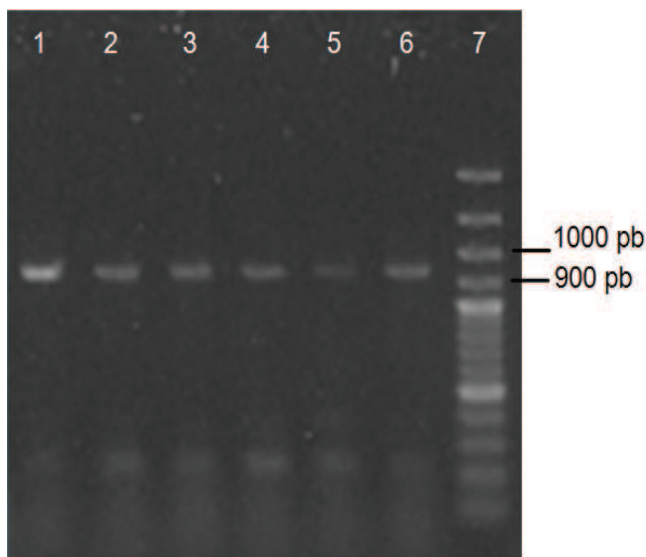


FIGURA 1. Gel de agarose contendo produto da PCR do gene de identificação de *E. faecalis*. Canaletas 1 a 6: *E. faecalis* ATCC 29212 positivo para o gene *ddl_{E. faecalis}* (941 pb); 7: marcador molecular (100 pb).

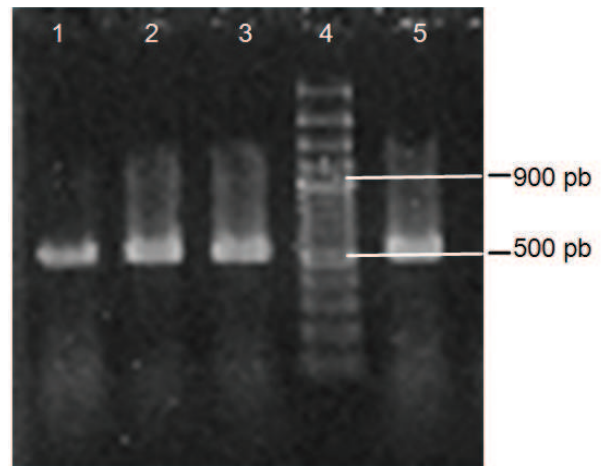


FIGURA 2. Gel de agarose contendo produto de PCR do gene de identificação de *E. faecium*. Canaletas 1 a 3: isolados de amostras de queijo positivos para o gene *ddl_{E. faecium}* (550 pb); 4: marcador molecular (100 pb); 5: *E. faecium* ATCC 6569 positivo para o gene *ddl_{E. faecium}*.

Referências

- BINTSIS, T.; PAPADEMÁS, P. Microbiological quality of white-brined cheese: a review. **International Journal of Dairy Technology**, v. 55, n. 3, p. 113-120, aug. 2002.
- CARIOLATO, D.; ANDRIGHETTO, C.; LOMBARDI, A. Occurrence of virulence factors and antibiotic resistances in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* collected from dairy and human samples in North Italy. **Food Control**, v. 19, n. 9, p. 886-892, 2008.
- DUTKA-MALEN, S.; EVERS, S.; COURVALIN, P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 24-27, 1995. (Erratum, v. 33, p. 1434).
- FACKLAM, R. R.; CARVALHO, M. da G. S.; TEIXEIRA, L. M. History, taxonomy, biochemical characteristics and antibiotic susceptibility testing of enterococci. In: GILMORE, M. S. (Ed.). **The enterococci: pathogenesis, molecular biology and antibiotic resistance**. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2002. p. 1-54.
- FURRER, B.; CANDRIAN, U.; HOEFELIN, CH.; LUETHY, J. Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and milk by in vitro amplification of haemolysin gene fragments. **Journal of Applied Microbiology**, v. 70, n. 5, p. 372-379, may 1991.
- GIRAFFA, G. Enterococci from foods. **FEMS**

Microbiology Reviews, v. 26, n. 2, p. 163-171, 2002.

GIRAFFA, G.; CARMINATI, D.; NEVIANI, E. Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 6, p. 732-738, 1997.

GOMES, B. C.; ESTEVES, C. T.; PALAZZO, I. C. V.; DARINI, A. L. C.; FELIS, G. E.; SECHI, L. A.; FRANCO, B. D. G. M.; MARTINIS, E. C. P. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. Isolated from Brazilian foods. **Food Microbiology**, v. 25, n. 5, p. 668-675, 2008.

HARTMAN, P. A.; DEIBEL, R. H.; SIEVERDING, L. M. Enterococci. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2001. chap. 9, p. 83-86.

MANNU, L.; PABA, A.; DAGA, E.; COMUNIAN, R.; ZANETTI, S.; DUPRÈ, I.; SECHI, L. A. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, n. 2-3, p. 291-304, 2003.

MANOLOPOULOU, E.; SARANTINOPOULOS, P.; ZOIDOU, E.; AKTYPIS, A.; MOSCHOPOULOU, E.; KANDARAKIS, I. G.; ANIFANTAKIS, E. M. Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, n. 2, p. 153-161, 2003.

MASCHIETO, A.; MARTINEZ, R.; PALAZZO, I. C. V.; DARINI, A. L. da C. Antimicrobial resistanci of

Enterococcus sp isolated from the intestinal tract of patients from a university hospital in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 7, p. 763-767, 2004.

QIN, X.; SINGH, K. V.; WEINSTOCK, M.; MURRAY, B. E. Effects of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 5, p. 2579-2586, 2000.

RICE, L. B.; CARIAS, L.; RUDIN, S.; VAEL, C.; GOOSSENS, H.; KONSTABEL, C.; KLARE, I.; NALLAPAREDDY, S. R.; HUANG, W.; MURRAY, B. E. A potential virulence gene, *hylEfm*, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. **Journal of Infectious Diseases**, v. 187, n. 3, p. 508-512, 2003.

SARANTINOPOULOS, P.; ANDRIGHETTO, C.; GEORGALAKI, M. D.; REA, M. C.; LOMBARDI, A.; COGAN, T. M.; KALANTZOPOULOS, G.; TSAKALIDOU, E. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 8, p. 621-647, 2001.

SARANTINOPOULOS, P.; KALANTZOPOULOS, G.; TSAKALIDOU, E. Citrate metabolism by *Enterococcus faecalis* FAIR-E 229. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 12, p. 5482-5487, 2001.

SEMEDO, T.; SANTOS, M. A.; LOPES, M. F. S.; MARQUES, J. J. F.; CRESPO, M. T. B.; TENREIRO, R. Virulence factors in food, clinical and reference enterococci: a common trait in the genus? **Systematic and Applied Microbiology**, v. 26, n. 1, p. 13-22, 2003.

Comunicado Técnico, 167

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Agroindústria de Alimentos
Endereço: Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba
23020-470 - Rio de Janeiro - RJ

Fone: (0XX21) 3622-9600

Fax: (0XX21) 3622-9713

Home Page: <http://www.ctaa.embrapa.br>

E-mail: sac@ctaa.embrapa.br

1ª edição

1ª impressão (2010): tiragem (50 exemplares)

Comitê de publicações

Presidente: *Virginia Martins da Matta*

Membros: *Andre Luis do Nascimento Gomes, Daniela de Grandi Castro Freitas, Luciana Sampaio de Araújo, Marcos Jose de Oliveira Fonseca, Marília Penteado Stephan, Michele Belas Coutinho, Renata Galhardo Borguini, Renata Torrezan*

Expediente

Supervisão editorial: *Renata Galhardo Borguini*

Revisão de texto: *Edmar das Mercês Penha*

Normalização bibliográfica: *Luciana S. de Araújo*

Editoração eletrônica: *Marcos Moulin e André Luis do Nascimento Gomes*