



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE  
*ENTEROCOCCUS* ISOLADAS DE CARÇAÇAS DE  
FRANGO COMERCIALIZADAS NO DISTRITO  
FEDERAL**

**ANA CLAUDIA FARIA BORGES DE CAMPOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL**

**BRASÍLIA/DF**

**MAIO/2012**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE  
*ENTEROCOCCUS* ISOLADAS DE CARÇAÇAS DE  
FRANGO COMERCIALIZADAS NO DISTRITO  
FEDERAL**

**ANA CLAUDIA FARIA BORGES DE CAMPOS**

**ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. ÂNGELA PATRÍCIA SANTANA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL**

**BRASÍLIA/DF**  
**MAIO/2012**

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

CAMPOS, A. C. F. B. de. **Resistência antimicrobiana de cepas de *Enterococcus* isoladas de carcaças de frango comercializadas no Distrito Federal.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2012, 72p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

### FICHA CATALOGRÁFICA

Campos, Ana Claudia Faria Borges de

Resistência antimicrobiana de cepas de *Enterococcus* isoladas de carcaças de frango comercializadas no Distrito Federal. / Ana Claudia Faria Borges de Campos; orientação de Ângela Patrícia Santana – Brasília, 2012. 72p. :il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2012.

1. *Enterococcus*. 2. Carcaça de frango. 3. Antibiograma. 4. Genes de resistência antimicrobiana. I. CAMPOS, A. C. F. B. de. II. Título

CDD ou CPU  
Agris / FAO



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE *ENTEROCOCCUS*  
ISOLADAS DE CARÇAÇAS DE FRANGO COMERCIALIZADAS NO  
DISTRITO FEDERAL**

ANA CLAUDIA FARIA BORGES DE CAMPOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE  
ANIMAL, COMO PARTE DOS REQUISITOS  
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE  
MESTRE EM SAÚDE ANIMAL

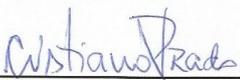
APROVADO POR:

  
\_\_\_\_\_

ÂNGELA PATRÍCIA SANTANA, PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
(ORIENTADOR)

  
\_\_\_\_\_

SIMONE PERECMANIS, PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
(EXAMINADOR INTERNO)

  
\_\_\_\_\_

CRISTIANO SALES PRADO, PROF. DR. UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
(EXAMINADOR EXTERNO)

BRASÍLIA/DF, 02 DE MAIO DE 2012

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por esta oportunidade, por ter me capacitado e me dado força para prosseguir nesta caminhada.

Ao meu marido, Raphael, pela compreensão, pela ajuda, pela paciência e pela força em todos os momentos.

Aos meus pais e minhas irmãs, pela força, pelos conselhos e por acreditarem em mim.

A minha orientadora e amiga, Ângela Patrícia, por ter me acolhido e ter acreditado e confiado em mim.

Aos meus colegas de laboratório e de mestrado: Nara, Patrícia, Patrícia Renault, Pâmela, Stefânia, Helenira, Milena, Igor, Hudson, Vinícius, Anne Dianne pelo empenho em me ajudar nas pesquisas, pelas palavras de afirmação e risadas.

Aos colegas do Laboratório de Terapia Gênica pelos conselhos e ajudas em momentos difíceis.

Aos eternos amigos Luiz Marques, Valdete, Thiago, Aline, Vanessa, Mailton, Roberta e Kátia pelas orações e por todos os conselhos.

Agradeço a todos aqueles que de uma forma ou de outra contribuíram nestes dois anos de mestrado.

Obrigada a CAPES pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
CAPÍTULO I .....	1
INTRODUÇÃO.....	1
REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
OBJETIVOS.....	28
REFERÊNCIAS.....	29
CAPÍTULO II .....	35
RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE <i>ENTEROCOCCUS</i> ISOLADAS DE CARÇAÇAS DE FRANGO COMERCIALIZADAS NO DISTRITO FEDERAL ..	35
INTRODUÇÃO.....	35
MATERIAL E MÉTODOS.....	38
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	42
CONCLUSÃO .....	57
REFERÊNCIAS.....	58
CAPÍTULO III .....	64
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	64

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi realizar o isolamento de cepas de *Enterococcus* de carcaças de frango resfriadas e congeladas, comercializadas no Distrito Federal, analisar o perfil de resistência antimicrobiana através da realização de antibiograma, promover uma pesquisa de genes de resistência antimicrobiana e diferenciação das espécies *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* através da reação em cadeia da polimerase. Foram analisadas 100 carcaças de frango congeladas e resfriadas, das quais foram isoladas 50 cepas de *Enterococcus* spp, sendo 42% de *E. faecalis* e 2% de *E. faecium*. O teste de susceptibilidade antimicrobiana demonstrou que todas as cepas isoladas apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano, dos quais 90,47% das cepas de *E. faecalis*, 100% das cepas de *E. faecium* e 82,14% dos *Enterococcus* spp apresentaram resistência à Tetraciclina; 80,95% das cepas de *E. faecalis* e 35,71% das cepas de *Enterococcus* spp foram resistentes à Eritromicina; 39,28% dos *Enterococcus* spp e 23,80% dos *E. faecalis* à Ciprofloxacina e 28,57% dos *E. faecalis* apresentaram resistência ao Cloranfenicol. Foram detectados os genes de resistência antimicrobiana *tet(M)*, sendo o mais encontrado, seguido pelo *erm(B)*, *vanC-1*, *aph(3')-IIIa*, *ant(6)-Ia*, *vanB*, *vanA*, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* e *erm(A)*. O isolamento de cepas de *Enterococcus* com resistência antimicrobiana em carcaças de frango, observados neste estudo, pode acarretar sérios problemas para a saúde pública, devido à resistência propriamente dita, e devido a esses microrganismos terem a capacidade de transmitir genes de resistência antimicrobiana para outros microrganismos presentes na microbiota intestinal de humanos e animais, podendo inviabilizar o uso destas drogas para uso clínico.

**Palavras-chave:** *Enterococcus* spp, alimentos, tetraciclina, cloranfenicol, genes de resistência antimicrobiana.

## ABSTRACT

The aim of this work was to detect *Enterococcus* from cooled and frozen poultry carcasses commercialized at the Federal District area, analyze the profile of antimicrobial resistance by antibiotic susceptibility test, detect the antimicrobial resistance genes and differentiate *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* by polymerase chain reaction. Were analyzed 100 poultry carcasses cooled and frozen that were isolated 50 strains of *Enterococcus* spp, being 42% of *E. faecalis* and 2% of *E. faecium*. The antimicrobial susceptibility testing showed that all isolates were resistant to at least one antimicrobial. In 90,47% of *E. faecalis*, 100% of *E. faecium* and 82,14% of *Enterococcus* spp were resistant to Tetracycline; 80,95% of *E. faecalis* and 35,71% of *Enterococcus* spp strains were resistant to Erythromycin; 39,28% of *Enterococcus* spp and 23,80% of *E. faecalis* to Ciprofloxacin and 28,57% of *E. faecalis* were resistant to Chloramphenicol. Were detected genes of antimicrobial resistance as *tet(M)*, being this gene most verified. Were detected the genes *erm(B)*, *vanC-1*, *aph(3')-IIIa*, *ant(6)-Ia*, *vanB*, *vanA*, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* and *erm(A)*. The antimicrobial resistance observed in *Enterococcus* from poultry carcasses, observed in this study, might suggest serious problems for public health due the high resistance, due these microorganisms have ability to transmit genes for antimicrobial resistance to other microorganisms presents in the intestinal tract of humans and animals, can hinder the use of these drugs for clinical use.

**Key words:** *Enterococcus* spp, food, tetracycline, chloramphenicol, antimicrobial resistance genes.

## CAPÍTULO I

### INTRODUÇÃO

Os *Enterococcus* spp têm surgido como importantes patógenos oportunistas e com uma notável capacidade de expressar resistência a vários grupos de agentes antimicrobianos, limitando o número de opções terapêuticas. Eles estão associados com uma variedade de infecções humanas, adquiridas principalmente no ambiente hospitalar, tais como bacteremia, endocardite, infecções do trato urinário e infecções de feridas (VAN DEN BOGAARD *et al.*, 2002; FRACALANZZA *et al.*, 2007; GAMA, 2008; RIZZOTTI *et al.*, 2009; KOBAYASHI *et al.*, 2011; VIGNAROLI *et al.*, 2011; ZOU *et al.*, 2011). Por outro lado, espécies do gênero *Enterococcus* spp constituem uma grande proporção da microbiota normal associada ao trato gastrointestinal de humanos e animais. Eles podem ser encontrados em quase tudo que cercam os seres humanos, incluindo alimentos, principalmente produtos crus de origem animal (carne e leite) e de fontes associadas a baixas condições de higiene, onde a sua presença é um indicador de contaminação fecal (AARESTRUP *et al.*, 2002; BIAVASCO *et al.*, 2007; FRACALANZZA *et al.*, 2007; CASAL *et al.*, 2009; LÓPEZ *et al.*, 2009; RIBOLDI *et al.*, 2009). A natureza ubíqua dos *Enterococcus* spp, de crescerem de 10 a 45°C; em meios com alta concentração de sal; e em ambientes com amplos valores de pH, tornam estes resistentes às condições ambientais adversas facilitando sua colonização em habitats diferentes e sua disseminação através da cadeia alimentar. Todas essas características representam um desafio

para o controle da disseminação de cepas patogênicas desses organismos (AARESTRUP *et al.*, 2002; FACKLAM *et al.*, 2002; FRACALANZZA *et al.*, 2007; RIBOLDI *et al.*, 2009; VIGNAROLI *et al.*, 2011). Portanto, a presença de *Enterococcus* spp resistentes aos antimicrobianos em alimentos tem sido um assunto de crescente preocupação (FRACALANZZA *et al.*, 2007).

Os *Enterococcus* spp são intrinsecamente resistentes a uma gama de antimicrobianos de uso terapêutico (POETA *et al.*, 2005; GAMA, 2008; RIBOLDI *et al.*, 2009; ASLAM *et al.*, 2010; CASSENEGO, 2010; LÓPEZ *et al.*, 2010; ZOU *et al.*, 2011). São também conhecidos pela capacidade de adquirir e transferir marcadores de resistência através de um processo mediado por genes presentes em plasmídeos e transposons que facilitam a sua disseminação de uma forma em geral (FRACALANZZA *et al.*, 2007; RIZZOTTI *et al.*, 2009). Estudos têm demonstrado um aumento da resistência dos enterococos a agentes antimicrobianos como  $\beta$ -lactâmicos, um alto nível de resistência aos aminoglicosídeos e mais recentemente aos glicopeptídeos. Vários genes diferentes de resistência a antibióticos têm sido identificados em enterococos, principalmente *Enterococcus faecium* (EMANEINI *et al.*, 2008). Dados sobre resistência a antibióticos em enterococos associados com os alimentos indicam que há uma forte evidência epidemiológica de um *link* entre o uso de antibióticos na medicina humana e na produção animal com o surgimento, disseminação e persistência de cepas resistentes em produtos de origem animal. Essa resistência é, na maior parte, transferível para os enterococos, bem como a patógenos mais virulentos (FRACALANZZA *et al.*, 2007; RIZZOTTI *et al.*, 2009).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar a presença de *Enterococcus* spp em amostras de carcaças de frango congeladas e resfriadas, efetuar o antibiograma das seguintes drogas: ampicilina, vancomicina, teicoplanina, gentamicina, eritromicina, ciprofloxacina, enrofloxacina, tetraciclina, cloranfenicol, ceftazidima e cefalotina; a identificação das espécies (*E. faecalis* e *E. faecium*); bem como avaliar a presença de genes de resistência aos antimicrobianos: vancomicina, gentamicina, estreptomicina, canamicina, eritromicina e tetraciclina, através reação em cadeia da polimerase (PCR).

## REFERENCIAL TEÓRICO

### Características do gênero

Os *Enterococcus* spp são cocos Gram positivos que geralmente se dispõem aos pares e em curtas cadeias, e são catalase negativos (LÓPEZ *et al.*, 2009; RIBOLDI *et al.*, 2009; RIZZOTTI *et al.*, 2009; LÓPEZ *et al.*, 2010; CASSENEGO, 2010; ZOU *et al.*, 2011). São anaeróbios facultativos com um ótimo crescimento à 35°C, podendo crescer de 10 a 45°C e podem sobreviver durante 30 minutos a 60°C, bem como suportam variações de pH entre 4,0 e 9,6. Todos os *Enterococcus* spp crescem em meios contendo 6,5% NaCl, e hidrolisam a esculina na presença de 40% de sais biliares. A maioria dos *Enterococcus* spp, exceto *Enterococcus cecorum*, *Enterococcus columbae*, *Enterococcus pallens*, e *Enterococcus saccharolyticus*, hidrolisam pyrrolidonyl- $\beta$ -naphthylamide (PYR) (FACKLAM *et al.*, 2002; GAMA, 2008; CASSENEGO, 2010). Os *Enterococcus* spp não possuem a enzima citocromo, mas ocasionalmente produzem a pseudocatalase e aparecem como catalase positivos com uma fraca efervescência. A maioria das cepas são homofermentativas tendo como produto final da fermentação da glicose o ácido láctico e não há produção de gás (FACKLAM *et al.*, 2002; GAMA, 2008). Algumas espécies como *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* são móveis e todas as linhagens produzem a enzima leucina-aminopeptidase (LAP) (GAMA, 2008; CASSENEGO, 2010). A maioria das cepas produz o antígeno ácido teicóico glicerol, associado à parede celular, grupo estreptocócico antígeno D, e sua detecção muitas vezes é difícil (GAMA, 2008).

Por longos períodos, as bactérias do gênero *Enterococcus* foram consideradas como pertencentes ao gênero *Streptococcus* possuidores do antígeno D, inicialmente descritas como “estreptococos de origem fecal”. Após vários estudos evidenciou-se a grande distância genética existente entre estes dois grupos, sugerindo um novo gênero microbiano denominado *Enterococcus* spp. A classificação foi proposta por Schleifer e incluída inicialmente as espécies *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* (GAMA, 2008). Foram identificadas até o momento 39 espécies: *E. asini*, *E. avium*, *E. caccae*, *E. camelliae*, *E.*

*canintestini*, *E. canis*, *E. cassaliflavus*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. devriesei*, *E. dispar*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. flavescens*, *E. gallinarum*, *E. gilvus*, *E. haemoperoxidus*, *E. hermanniensis*, *E. hiraе*, *E. italicus*, *E. malodoratus*, *E. moraviensis*, *E. mundtii*, *E. pallens*, *E. phoeniculicola*, *E. porcinus*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus*, *E. ratti*, *E. saccharolyticus*, *E. saccharominimus*, *E. seriolicida*, *E. silesiacus*, *E. solitarium*, *E. sulfureus*, *E. termitis*, *E. thailandicus* e *E. villorum* (GAMA, 2008; CASSENEGO, 2010).

### **Fatores de virulência**

Os Enterococos possuem diversos fatores de virulência (BRTKOVÁ *et al.*, 2011). A aderência ao tecido do hospedeiro, invasão e formação de abscesso, modulação da resposta inflamatória e secreção de produtos tóxicos, entre outros, são características que determinam virulência em linhagens de Enterococos. Dependendo do tipo de combinação desses fatores, estes se tornam determinantes para a patogenicidade da cepa (GAMA, 2008).

#### **a) Substâncias de agregação**

A substância de agregação (Agg) é uma proteína de superfície presente em plasmídeos de cepas de *E. faecalis* e é expressa em resposta a indução por feromônios, que promove a formação de agregados durante a conjugação bacteriana. Agg medeia o contato eficiente da célula doadora com a célula receptora que facilita a transferência de plasmídeos e promove agregação celular (GILMORE *et al.*, 2002; POETA *et al.*, 2005; FOULQUIÉ MORENO *et al.*, 2006; GAMA, 2008). Segundo Gama (2008), o soro humano também induz a produção da Agg sugerindo que células que possuem a capacidade de expressar esta substância podem formar agregações maiores do que células que não a expressam. Esse mesmo autor relata também que diversos fatores de adesão executam um importante papel na ligação do microrganismo à mucosa e a outras superfícies epiteliais, facilitando a colonização e a formação de vegetações. Desse modo, a Agg é um fator de virulência que parece mediar a ligação específica ao epitélio intestinal, células epiteliais renais, neutrófilos humanos e macrófagos. Foulquié Moreno *et al.* (2006)

relatam que estudos em endocardites demonstraram sinergismo entre citolisina e Agg. A Agg é encontrada exclusivamente em cepas de *E. faecalis*, entretanto a incidência em isolados de alimentos parece ser alta.

Em um estudo efetuado por Poeta *et al.* (2005) em Portugal, em enterococos isolados de animais selvagens, o determinante de resistência *agg* esteve sempre associado a presença do determinante de feromônio *cpd* e estes foram os mais encontrados em *E. faecalis*.

### **b) Proteínas de superfície de Enterococos (Esp)**

Além da substância de agregação, os enterococos expressam uma proteína de alto peso molecular, denominada Esp. É constituída por 1873 aminoácidos e possui características de outras proteínas de superfícies de bactérias Gram positivas (GILMORE *et al.*, 2002; FOULQUIÉ MORENO *et al.*, 2006; GAMA, 2008). Esp desempenha um papel na adesão e na evasão da resposta imune do hospedeiro. E sua incidência em alimentos é alta em *E. faecalis* e dificilmente encontrada em *E. faecium* (FOULQUIÉ MORENO *et al.*, 2006). Segundo Gilmore *et al.* (2002), Poeta *et al.* (2005) e Gama (2008), o gene *esp* está associado com formação de biofilmes.

### **c) Citolisina**

A citolisina é uma toxina bacteriana expressada por algumas cepas de *E. faecalis* que está relacionada a estreptolisina S e também a membros da classe de bacteriocinas conhecidas como lantibióticos. Esta toxina demonstra ter atividade hemolítica e bactericida (GILMORE *et al.*, 2002; GAMA, 2008). É produzida por *E. faecalis*, possui atividade antimicrobiana contra um amplo grupo de bactérias Gram positivas (estafilococos e estreptococos) e apresenta atividade hemolítica contra hemácias de cavalo, coelho e humano, porém não tem ação em hemácias de carneiro nem contra bactérias Gram negativas (GAMA, 2008). A citolisina é codificada em plasmídeos que responde a feromônios ou no cromossomo em ilhas de patogenicidade (GILMORE *et al.*, 2002).

Este fator de virulência foi descrito estar presente em 60% de *E. faecalis* isolados de surtos. E têm demonstrado papel importante na primeira etapa dos

processos infecciosos em humanos, quando ainda é assintomático, contribuindo para a penetração nos tecidos intestinais humanos e desempenha funções patogênicas importantes, atuando como uma toxina que causa ruptura da membrana dos glóbulos vermelhos e de diversas outras células humanas (GAMA, 2008).

#### **d) Adesina de colágeno**

Infecções bacterianas são iniciadas através da aderência das bactérias nas células do hospedeiro (GILMORE *et al.*, 2002; GAMA, 2008). Uma proteína está envolvida neste processo pelo meio da ligação ao colágeno, que é codificada pelo gene *ace*, sendo designada como adesina de colágeno de *E. faecalis* (*Ace*) (POETA *et al.*, 2005; GAMA, 2008). Essa adesina intercede na ligação ao colágeno, fibronectina e laminina da matriz extracelular do hospedeiro e parece executar papel importante na patogênese da endocardite (GAMA, 2008). Poeta *et al.* (2005) relataram que o gene *ace* foi presente em 10% das cepas de *E. faecalis* isoladas de animais selvagens em Portugal.

#### **e) Gelatinase**

Gelatinase (Gel) é uma metaloendopeptidase extracelular envolvida com a hidrólise da gelatina, colágeno, hemoglobina e outros peptídeos bioativos (POETA *et al.*, 2005; FOULQUIÉ MORENO *et al.*, 2006; GAMA, 2008). É codificada pelo gene *GelE* e rica em resíduos de histidina, os quais servem como sítios de ligação para íons zinco. É extremamente hidrofóbica e seu pH ótimo de atuação varia entre 6 e 8. (GAMA, 2008). A gelatinase é geralmente produzida por enterococos isolados de infecções nosocomiais, fecais e de isolados clínicos e a presença da produção de Gel em alimentos em cepas de *E. faecalis* é alta (FOULQUIÉ MORENO *et al.*, 2006). Em um estudo efetuado em animais selvagens em Portugal por Poeta *et al.* (2005) relatou que elevada proporção dos *E. faecalis* isolados demonstraram este determinante de resistência (75,3%). Segundo Gama (2008), o gene *GelE* presente em *E. faecalis* subsp. *liquefaciens* foi sequenciado em 1991 e encontrou homologia significativa com os genes que codificam as proteinases de espécies de *Bacillus* e elastase de *Pseudomonas aeruginosa*. De acordo com esse mesmo autor, estudos

sobre gelatinase demonstram que esta contribui para a virulência de *E. faecalis* em animais; entretanto pouco se sabe sobre a patogênese em infecções humanas.

## **Epidemiologia de Enterococos**

Os enterococos fazem parte da microbiota normal do sistema gastrointestinal e geniturinário de humanos e animais, entretanto possuem capacidade de causar inúmeras infecções (CAUWERTS *et al.*, 2007; GAMA, 2008; CASSENEGO, 2010). Durante as últimas décadas, enterococos, principalmente *E. faecium* e *E. faecalis*, têm sido cada vez mais identificados como agentes causadores de infecções hospitalares em humanos, em paralelo com o aumento da resistência aos antimicrobianos (TEUBER *et al.*, 1999; CAUWERTS *et al.*, 2007; GAMA, 2008; CASSENEGO, 2010). No entanto, tem sido relatado o isolamento de *Enterococcus casseliflavus* e *Enterococcus raffinosus* como causa de infecções importantes em seres humanos (GAMA, 2008). Infecções causadas por Enterococos são a segunda e terceira infecção mais comum adquirida em hospital (VAN DEN BOGAARD *et al.*, 2002; GAMA, 2008; ASLAM *et al.*, 2010; LÓPEZ *et al.*, 2010). Segundo Werner *et al.* (2008), *E. faecalis* e *E. faecium* estão entre o terceiro e o quarto patógeno, isolado em infecções hospitalares, mais prevalente em todo o mundo. Cerca de 12% das infecções nosocomiais dos Estados Unidos são causadas por este microrganismo (VAN DEN BOGAARD *et al.*, 2002). Os enterococos estão associados com infecções no trato urinário e endocardites em pacientes imunocompetentes, e pacientes imunocomprometidos com bacteremia ou septicemia podem levar a infecções relacionadas incluindo meningites, infecções do trato urinário e infecções intra-abdominais (VAN DEN BOGAARD *et al.*, 2002; CAUWERTS *et al.*, 2007; GAMA, 2008). A maior parte das infecções por Enterococos origina-se da microbiota normal do paciente, embora os microrganismos possam ser transferidos de paciente para paciente ou adquiridos através do consumo de água ou alimentos contaminados (GAMA, 2008).

Enterococos resistentes à vancomicina (VRE) foram inicialmente relatados em infecções humanas, no final de 1980 na França e do Reino Unido e, desde então, se disseminaram consideravelmente por todo o mundo (AARESTRUP *et al.*, 2002; KAK e CHOW, 2002; WERNER *et al.*, 2008). O primeiro caso de *E. faecium* resistente à

vancomicina e teicoplanina no Brasil foi isolado de um paciente com meningite em junho de 1997 na cidade de São Paulo. Nesse mesmo hospital, desde maio de 1998, novas cepas de VRE foram detectadas em infecções hospitalares (ZANELLA *et al.*, 2003). Em 1998, mais de 20% dos isolados de *Enterococcus* spp nos Estados Unidos foram resistentes à vancomicina e a porcentagem de isolados de *E. faecium* que são resistentes à vancomicina é maior que 90% em alguns hospitais (KAK e CHOW, 2002). A maioria dos relatos de VRE são provenientes de unidades de terapia intensiva, enfermarias de oncologia, unidades ambulatoriais de diálise, e longo prazo de internação (KAK e CHOW, 2002).

Fatores de risco para aquisição de VRE nos Estados Unidos incluem o aumento da idade, cirurgia abdominal, cirrose, diálise, neoplasia hematológica, neutropenia, doença grave, e o prévio uso de antimicrobianos, como vancomicina, cefalosporinas e agentes que combatem anaeróbios (KAK e CHOW, 2002). Uma vez que colonizaram o paciente, VRE persistem no trato gastrointestinal e podem ser disseminados horizontalmente para outros pacientes. A identificação correta é necessária a fim de controlar as espécies que podem estar causando a doença, para fins de tratamento (DUTKA-MALEN *et al.*, 1995; KAK e CHOW, 2002; JACKSON *et al.*, 2004).

A resistência adquirida, principalmente à penicilina / ampicilina, aminoglicosídeos (alto nível de resistência) e glicopeptídeos são relatadas em um número crescente de isolados e o espectro da terapêutica, nestes casos, é limitado. Alternativas terapêuticas para o tratamento de infecções com VRE e a outros antimicrobianos são restritas aos antimicrobianos recentemente introduzidos na prática clínica como a quinupristina/dalfopristina, a tigeciclina, a linezolida e a daptomicina. No entanto, esses medicamentos só são aprovados para algumas indicações e casos de resistência já foram relatados (KLARE *et al.*, 2005; WERNER *et al.*, 2008; KOBAYASHI *et al.*, 2011).

Infecções causadas por *Enterococcus* spp são uma ameaça para a saúde humana, principalmente devido à dificuldade de sua erradicação com o uso dos antimicrobianos (VIGNAROLI *et al.*, 2011). Segundo Werner *et al.* (2008), fatores não microbiológicos tais como consumo de antimicrobianos, pressão de colonização, falta de pessoal, conformidade com a higiene das mãos e outras medidas de controle de infecção também influenciam nesta evolução. De acordo com Teuber *et*

*al.* (1999), o desenvolvimento evolutivo da resistência tem sido atribuída a posse de uma ampla gama de hospedeiros e elementos genéticos móveis como plasmídeos e transposons conjugativos.

A disseminação zoonótica de resistência antimicrobiana e cepas virulentas de enterococos têm se tornado uma preocupação significativa na saúde pública (ZOU *et al.*, 2011). Jensen *et al.* (1999) relataram cepas de *E. faecium* isoladas de suínos e de pacientes hospitalizados na Dinamarca, o que foi sugestivo de transmissão de VRE por uma rota zoonótica de origem alimentar. Hong-Zhou *et al.* (2002) também relataram um surto de *E. faecium* na China, onde milhares de suínos morreram e 40 tratadores foram hospitalizados devido a uma doença após o contato com suínos doentes, sugerindo fortemente uma disseminação de cepas de enterococos virulentas dos suínos para os humanos. Segundo López *et al.* (2009) e Brtková *et al.* (2011), Enterococos isolados de animais funcionam como reservatórios de genes de resistência antimicrobiana e alertam para o risco dos *Enterococcus* spp transferirem resistência à vancomicina para outras bactérias patogênicas, tais como *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). Brtková *et al.* (2011) continuam dizendo que diversas cepas de enterococos podem ser resistentes a baixo pH e a sais biliares. Essas cepas ingeridas com alimentos ou através de contato direto com animais sobrevivem no trato gastrointestinal de humanos. Por esta maneira, enterococos pode se tornar uma fonte de genes de resistência antimicrobiana.

### **Resistência antimicrobiana em Enterococos**

Com o aumento na prevalência mundial de *Enterococcus* spp envolvidos em infecções nosocomiais, ocorreu um aumento do uso de antimicrobianos em hospitais (CASSENEGO, 2010). Esses microrganismos têm desenvolvido resistência aos antimicrobianos comumente empregados na terapêutica, seja pela aquisição de genes de resistência em plasmídeos ou transposons de outros microrganismos ou ainda por mutações cromossômicas espontâneas (GAMA, 2008).

### **a) Resistência aos aminoglicosídeos**

O grupo dos aminoglicosídeos inclui a gentamicina, tobramicina, amicacina, netilmicina, canamicina, estreptomicina, dibencacina e a neomicina (GAMA, 2008). Esses fármacos são empregados principalmente no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram negativas, entretanto exercem efeito sinérgico com inibidores da síntese de parede celular em bactérias Gram positivas, sendo bactericidas (KAK e CHOW, 2002; GAMA, 2008). Embora sejam fármacos importantes e amplamente utilizados os mesmos são extremamente tóxicos limitando sua utilização (GAMA, 2008). O primeiro isolado de Enterococos com alto nível de resistência à gentamicina foi descrito em 1980 em um hospital e após esse período, tem sido identificado diversas vezes em amostras clínicas de pacientes hospitalizados e no trato intestinal de humanos e animais (ZARRILLI *et al.*, 2005).

Os aminoglicosídeos exercem seu efeito bactericida por interferirem na síntese protéica pela ligação a porção 16S rRNA da subunidade ribossomal 30S. Os enterococos caracterizam-se por apresentar resistência intrínseca a baixos níveis de aminoglicosídeos, resultando em dificuldades no transporte do antimicrobiano através da membrana celular. A principal forma de resistência a este agente se deve à aquisição de genes de resistência que codificam enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs) que podem ser fosfotransferases (fosforilam a molécula de aminoglicosídeos a partir de ATP), acetiltransferases (acetilam a molécula de aminoglicosídeo a partir de acetil-CoA) ou nucleotidiltransferases (adiciona moléculas de adenina, também proveniente de ATP) (KAK e CHOW, 2002; EMANEINI *et al.*, 2008; GAMA, 2008; CASSENEGO, 2010). Segundo Zarrilli *et al.* (2005) e Kobayashi *et al.* (2011), estas AMEs eliminam o efeito do sinergismo bacteriano entre agentes ativos contra a parede celular como os  $\beta$ -lactâmicos ou glicopeptídeos e praticamente todos os aminoglicosídeos disponíveis comercialmente como: gentamicina, tobramicina, netilmicina, canamicina e amicacina.

Frequentemente, isolados clínicos de Enterococos que apresentam níveis elevados de resistência aos aminoglicosídeos possuem genes de resistência a esses antimicrobianos (CASSENEGO, 2010). O gene *aph(2'')-Ic* codifica uma fosfotransferase responsável pela resistência clínica à gentamicina, tobramicina,

canamicina e dibecacina, mas não a amicacina ou netilmicina. O mesmo está relacionado com a eliminação do sinergismo ampicilina/gentamicina. Este gene foi descrito pela primeira vez no ano de 1997 em plasmídeos conjugativos de *E. gallinarum*, desde então tem sido identificado em *E. faecalis* e *E. faecium*. Os genes *aph(2'')-Ib* e *aph(2'')-Id* codificam uma fosfotransferase responsável pelo elevado nível de resistência à gentamicina, tobramicina, canamicina, netilmicina e dibecacina. O segundo tem sido detectado somente em isolados clínicos de *E. faecium* resistente à vancomicina (KAK e CHOW, 2002; GAMA, 2008). O gene *aph(3'')-IIIa* codifica uma fosfotransferase que confere elevado nível de resistência à canamicina em Enterococos (KAK e CHOW, 2002; ZARRILLI *et al.*, 2005; EMANEINI *et al.*, 2008; GAMA, 2008). Este gene já foi detectado em *Staphylococcus* spp e em *Streptococcus pneumoniae*. O *ant(4')-Ia* codifica uma nucleotidotransferase que confere resistência à tobramicina, amicacina, canamicina e dibecacina sendo encontrado em Enterococos bem como bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. O *ant(6)-Ia* inativa estreptomicina, e o *aac(6')-Ii* inativa tobramicina, canamicina, netilmicina e sisomicina. Este último codifica uma acetiltransferase, que elimina o sinergismo entre  $\beta$ -lactâmicos e aminoglicosídeos (KAK e CHOW, 2002; ZARRILLI *et al.*, 2005; GAMA, 2008).

Um dos genes AMEs mais prevalentes entre as bactérias Gram positivas é o *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* que codifica uma enzima bifuncional, AAC(6')-APH(2''), que possui ambas atividades de acetilação e fosforilação da molécula do antibiótico (KAK e CHOW, 2002; ZARRILLI *et al.*, 2005; EMANEINI *et al.*, 2008; GAMA, 2008). Esse gene é resultante da fusão de dois genes ancestrais e desencadeia resistência a um amplo espectro de aminoglicosídeos incluindo gentamicina, tobramicina, amicacina e canamicina. Este gene tem sido identificado em *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e vários *Streptococcus* spp, bem como em *Enterococcus* spp e pode ser localizado em transposons e plasmídeos (KAK e CHOW, 2002; GAMA, 2008). Mais de 90% dos isolados clínicos que possuem alto nível de resistência à gentamicina possuem o gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, e menos de 10% possuem *aph(2'')-Ic*; *aph(2'')-Id*; *aph(2'')-Ib* (KAK e CHOW, 2002; GAMA, 2008).

Segundo Kasimoglu-Dogru *et al.* (2010), os aminoglicosídeos são considerados os antimicrobianos de escolha no tratamento de infecções causadas

por enterococos (em combinação com glicopeptídeos e/ou  $\beta$ -lactâmicos), então a possibilidade da disseminação desta resistência através da cadeia alimentar é alarmante.

### **b) Resistência aos $\beta$ -lactâmicos**

Os Enterococos possuem resistência natural intrínseca a antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos (LOPES *et al.*, 2005; GAMA, 2008; BARBOSA *et al.*, 2009; CASSENEGO, 2010). A resistência intrínseca difere entre os antibióticos desse grupo, com as penicilinas exercendo maior atividade frente a estes microrganismos, seguidas por carbapenens e cefalosporinas, com menor atividade. Dentre as penicilinas, a ampicilina é a mais efetiva. A resistência intrínseca a todas as cefalosporinas é em um nível tão elevado que não podem ser utilizadas para o tratamento de infecções em pacientes infectados por *Enterococcus* spp. Na verdade, o uso de cefalosporinas no tratamento de *Enterococcus* spp pode levar a uma superinfecção (KAK e CHOW, 2002; LOPES *et al.*, 2005; GAMA, 2008; CASSENEGO, 2010). Na maioria dos hospitais, mais de 90% dos isolados de *E. faecium* são resistentes a ampicilina (GAMA, 2008; CASSENEGO, 2010).

Elevado nível de resistência a penicilinas é ocasionado principalmente pela superprodução de proteínas de ligação a penicilina (PBP) de baixa afinidade, ou ainda por mutações nas PBP o que as torna menos suscetível a inibição pelas penicilinas. Já foram descritas linhagens de *E. faecalis* produtoras de  $\beta$ -lactamase codificadas pelo gene *blaZ* (GAMA, 2008; CASSENEGO, 2010). Segundo Lopes et al. (2005), enterococos resistentes a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos parecem estar associados com cepas clínicas.

### **c) Resistência ao cloranfenicol**

O antibiótico cloranfenicol possui amplo espectro de atividade antimicrobiana, atua inibindo a síntese de proteínas nas bactérias, e em menor grau nas células eucarióticas. Atua primariamente através de sua ligação reversível à subunidade ribossômica 50S. Com o elevado nível de multirresistência de linhagens enterocócicas alguns hospitais têm empregado o cloranfenicol no tratamento desses

processos infecciosos, entretanto cerca de 50% das linhagens pertencentes a este gênero são resistentes (KAK e CHOW, 2002; GAMA, 2008; CASSENEGO, 2010). O mesmo pode atuar também nas células mitocondriais de mamíferos, o que dificulta sua utilização pela elevada toxicidade, representada pelo alto índice de discrasias sanguíneas (leucopenia) (KAK e CHOW, 2002; GAMA, 2008; BARBOSA *et al.*, 2009; CASSENEGO, 2010). Na maioria dos Enterococos a resistência é mediada pela presença do gene *cat*, que pode ser encontrado no cromossomo ou em plasmídeos, que codifica uma acetiltransferase, a qual tem função de alterar a estrutura do antimicrobiano, fazendo com que esta perca a capacidade de ligação à porção ribossomal (KAK e CHOW, 2002; GAMA, 2008; CASSENEGO, 2010).

Como o cloranfenicol é uma das drogas efetivas usadas em infecções VRE em humanos, a disseminação de genes de resistência por transferência através da cadeia alimentar pode levar a uma elevação na prevalência da resistência nos enterococos (KASIMOGLU-DOGRU *et al.*, 2010)

#### **d) Resistência as estreptograminas**

As estreptograminas pertencem ao grupo macrolídeo-lincosaminas-estreptograminas. A família das estreptograminas compreende micamicinas, pristinamicinas, oestreomicinas, virginamicinas. As pristinamicinas tópicas e orais vêm sendo empregadas na França há um longo período no tratamento de infecções por bactérias do gênero *Staphylococcus* spp (GAMA, 2008; CASSENEGO, 2010). Esses antimicrobianos atuam inibindo a síntese de proteínas por interferir com a subunidade 50S do ribossomo bacteriano (KAK e CHOW, 2002; GAMA, 2008; CASSENEGO, 2010). As pristinamicinas deram origem a derivados semi-sintéticos, dalfopristina e quinupristina (GAMA, 2008; CASSENEGO, 2010). Estas são uma mistura de dois compostos de estreptogramina (B e A), respectivamente (HWANG *et al.*, 2010).

Devido à presença de elevados níveis de resistência a antibióticos, tem-se buscado o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, como quinupristina/dalfopristina. Essa associação atua de modo sinérgico e é normalmente bactericida, ao contrário de quando os mesmos são usados isoladamente, ou comparado com os antibióticos similares pertencentes ao grupo

macrolídeo. Os principais alvos desse grupo são os microrganismos resistentes e que possuem opções terapêuticas limitadas. Entretanto, pequeno período após a aprovação destes dois medicamentos, microrganismos resistentes começaram a ser encontrados. Em geral, tem sido relatado que quinupristina/dalfopristina apresenta atividade inibitória contra *E. faecium*, incluindo VRE que são resistentes a outros agentes clinicamente disponíveis. No entanto, dois genes já foram descobertos em *E. faecium*, como responsáveis pela resistência a quinupristina/dalfopristina: *vatD* e *vatE*, os quais codificam acetiltransferases a estreptograminas A. *E. faecalis* é resistente à associação destes antimicrobianos devido à expressão do gene *lsa*, que é responsável pela resistência intrínseca a clindamicina e quinopristina/dalfopristina, ou por possuírem o gene *vatE* (KAK e CHOW, 2002; GAMA, 2008; CASSENEGO, 2010).

#### **e) Resistência aos glicopeptídeos**

Os glicopeptídeos vancomicina e teicoplanina são usados no tratamento de infecções sérias devido à resistência de organismos Gram positivos. Eles têm sido utilizados na prática clínica por mais de 30 anos antes de surgirem relatos de resistência (KAK e CHOW, 2002; GAMA, 2008; LÓPEZ *et al.*, 2009; CASSENEGO, 2010). Eles exercem seus efeitos inibindo a síntese da parede celular de bactérias sensíveis através de sua ligação de alta afinidade a extremidade terminal D-alanil-D-alanina de unidades precursoras da parede celular. A resistência nesse gênero à vancomicina resulta de uma alteração do alvo D-alanil-D-alanina em D-alanil-D-lactato ou D-alanil-D-serina, que apresentam baixa afinidade com a vancomicina, devido à ausência de um local crítico para a ponte de hidrogênio (GAMA, 2008; CASSENEGO, 2010).

Diferentes mecanismos de resistência aos glicopeptídeos foram descritos, do tipo adquirida (*vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE*, *vanG* e *vanL*), bem como do tipo intrínseca presente em Enterococos móveis (*vanC*, associado às espécies *Enterococcus gallinarum* e *Enterococcus casseliflavus / flavescens*) (GAMA, 2008; WERNER *et al.*, 2008; LÓPEZ *et al.*, 2009; CASSENEGO, 2010). O gene *vanA* expressa alta resistência a vancomicina e teicoplanina, e é normalmente adquirido através do transposon Tn1546 ou membros da família relacionados como Tn3. O gene *vanB*

induz níveis variados de resistência a vancomicina, entretanto não induz resistência a teicoplanina, e normalmente está localizado no cromossomo bacteriano, mas podendo ser carregado por plasmídeos e transposons (EMANEINI *et al.*, 2008; GAMA, 2008; CASSENEGO, 2010). O gene *vanD* induz um nível moderado de resistência a vancomicina e teicoplanina e apresenta-se localizado no cromossomo e não parece ser transferível. Os determinantes *vanE* e *vanG* codificam um baixo nível de resistência a vancomicina e acredita-se que sejam adquiridos e induzíveis (GAMA, 2008; CASSENEGO, 2010).

Resistência adquirida à vancomicina demonstra ser um sério e crescente desafio na terapêutica entre os *Enterococcus* spp em toda a Europa. Alguns países da Europa registraram um aumento na tendência de VRE ao longo do tempo (por exemplo, Irlanda, Alemanha e Grécia). Em outros países a prevalência de VRE ainda é baixa (por exemplo, Países Nórdicos e Holanda). Alguns estados membros da Europa demonstraram uma diminuição da taxa de VRE (por exemplo, Áustria, Portugal e Itália), entretanto, as razões para essa tendência ainda não está clara (WERNER *et al.*, 2008).

Um trabalho feito por Biavasco *et al.* (2007) onde analisaram 154 *Enterococcus* spp resistentes a glicopeptídeo (GRE) possuindo o gene *vanA* em seres humanos (n = 69), animais (n = 49), e alimentos (n = 36) na Itália, Bélgica e Noruega, concluíram que todos os GRE, independentemente de suas origens e espécies, podem ser considerados reservatórios de determinantes de resistência e características de virulência. Além disso, o achado de *vanA* em *E. faecalis* em carne sugere um envolvimento de alimentos na propagação da GRE virulento em seres humanos.

#### **f) Resistência aos macrolídeos**

O grupo dos macrolídeos inclui a eritromicina, claritomicina, clindamicina, roxitromicina e azitromicina. São antibióticos bacteriostáticos que inibem a síntese de proteínas através de sua ligação reversível às subunidades ribossômicas 50S de microrganismos sensíveis (GAMA, 2008; CASSENEGO, 2010). Os antimicrobianos macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina B (MLS<sub>B</sub>) são alternativas importantes no tratamento de infecções em humanos. Resistência adquirida contra esses

antibióticos tem sido frequentemente relatada em enterococos isolados de humanos bem como de animais (LEENER *et al.*, 2004; CAUWERTS *et al.*, 2007; SCHWAIGER e BAUER, 2008; ZOU *et al.*, 2011). Diferentes mecanismos de aquisição de resistência a estes antimicrobianos têm sido descritos como a modificação do alvo, o efluxo ativo e a inativação enzimática (CAUWERTS *et al.*, 2007). Resistência aos macrolídeos em enterococos é geralmente devido a metilação da 23S do RNA ribossomal codificado pelos genes *erm* (eritromicina ribossomo metilase) (LEENER *et al.*, 2004; CAUWERTS *et al.*, 2007; EMANEINI *et al.*, 2008; SCHWAIGER e BAUER, 2008; ZOU *et al.*, 2011). Esse mecanismo é usualmente mediado pelo gene *erm(B)*, e raramente pelo gene *erm(A)* (GAMA, 2008; CASSENEGO, 2010). Esses genes *erm* conferem resistência cruzada aos antimicrobianos MLS<sub>B</sub> (LEENER *et al.*, 2004; SCHWAIGER e BAUER, 2008; ZOU *et al.*, 2011). Resistência adquirida a esses antimicrobianos em enterococos frequentemente está associado com a presença do gene *erm (B)* (CAUWERTS *et al.*, 2007). Em enterococos animais bem como de humanos, o fenótipo MLS<sub>B</sub> é principalmente codificado pelo gene *erm (B)* (LEENER *et al.*, 2004; GUPTA *et al.*, 2009). O gene *mef(A)* codifica uma proteína de efluxo que expulsa os macrolídeos da célula. Esse gene parece estar localizado num elemento conjugativo e regula os níveis de resistência a eritromicina mais baixos do que aqueles mediados pelo gene *erm(B)* (GAMA, 2008; CASSENEGO, 2010). O gene *erm (B)* está frequentemente ligado ao gene *tet (M)* no transposon conjugativo Tn1545, que tem grande importância clínica em bactérias Gram-positivas. Genes de resistência a macrolídeos e glicopeptídeos têm sido descritos no mesmo elemento genético móvel em *E. faecium* em suínos e humanos (LEENER *et al.*, 2004).

Devido ao uso generalizado dos macrolídeos, *Enterococcus* spp resistentes a estes antimicrobianos têm sido isolados em humanos e animais (ZOU *et al.*, 2011). E de acordo com Emaneini *et al.* (2008), resistência aos macrolídeos tal como a eritromicina é prevalente entre enterococos.

Zou *et al.* (2011) relatam que que alto nível de resistência a eritromicina pode estar associado ao uso indiscriminado desta classe de antimicrobiano na produção animal, especialmente o uso generalizado de tilosina como promotor de crescimento e tratamento de doenças e concluíram que resistência a eritromicina em *E. faecalis*

isolados de suínos está associada primeiramente com a presença dos genes *erm(B)* e *erm(A)*.

#### **g) Resistência à quinolona**

A primeira quinolona descrita foi o ácido nalidíxico, tendo sido este empregado amplamente no tratamento de infecções urinárias. Depois foram introduzidos a este grupo mais quatro quinolonas fluoradas, como ciprofloxacino, moxifloxacino, norfloxacino e gatifloxacino. Até o momento já existem mais de 20 quinolonas descritas (GAMA, 2008; CASSENEGO, 2010). Para bactérias Gram positivas, como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*, resistência a fluorquinolonas é essencialmente mediado por alteração enzimática do alvo como a DNA girase (genes *gyrA* e *gyrB*) e topoisomerase IV (genes *parC* e *parE*) e/ou diminuição do acúmulo intracelular através do efluxo deste agente (OYAMADA *et al.*, 2006; GAMA, 2008; CASSENEGO, 2010). A atividade da ciprofloxacina contra Enterococos é moderada, e a resistência nestes microrganismos a este antimicrobiano é bastante comum. Algumas fluorquinolonas (moxifloxacino e gatifloxacino) se mostram bastante efetivas *in vitro* contra bactérias do gênero Enterococos, entretanto isolados resistentes a ciprofloxacino são normalmente resistentes a moxifloxacino e gatifloxacino. A resistência a quinolonas em Enterococos não está bem esclarecida, quando comparado com os mecanismos de resistência em estafilococos e pneumococos (GAMA, 2008; CASSENEGO, 2010). O mecanismo de resistência ocorre basicamente por mutações nas regiões *parC* e *gyrA* do DNA bacteriano (OYAMADA *et al.*, 2006; GAMA, 2008; CASSENEGO, 2010). Segundo Oyamada *et al.* (2006) o número de isolados clínicos de *E. faecalis* resistentes a fluorquinolonas tem aumentado com o aumento do uso das fluorquinolonas.

#### **h) Resistência à tetraciclina**

A resistência à tetraciclina é um dos fenótipos de resistência adquirida mais presentes em Enterococos isolados de alimentos. Dentre os isolados de Enterococos cerca de 65% apresentam-se resistentes a este grupo (GAMA, 2008;

CASSENEGO, 2010). As tetraciclinas são agentes bacteriostáticos, de amplo espectro, exibindo atividade contra uma ampla gama de bactérias Gram positivas e Gram negativas, organismos atípicos, como clamídias, micoplasmas, riquetsias e, protozoários. As tetraciclinas inibem a síntese proteica bacteriana, impedindo a associação de aminoacyl-tRNA com o ribossomo bacteriano. Elas são utilizadas em terapias humanas, na medicina veterinária, na agricultura e aquicultura (CHOPRA e ROBERTS, 2001; CAUWERTS *et al.*, 2006; CAUWERTS *et al.*, 2007; GAMA, 2008; NEELA *et al.*, 2009; CASSENEGO, 2010). Cauwerts *et al.* (2007) e Persoons *et al.* (2010) frisam que as tetraciclinas são frequentemente utilizadas para o tratamento de aves, sendo relativamente barato e eficaz contra uma grande variedade de microrganismos. O aumento de bactérias resistentes a tetraciclinas é um assunto sério nesses últimos anos, não apenas na clínica humana mas também em outros campos (CHOPRA e ROBERTS, 2001). A utilização das tetracilinas no controle de infecções tornou-se cada vez mais limitada nos últimos anos devido ao surgimento de patógenos resistentes (CHOPRA e ROBERTS, 2001; KAZIMIERCZAK *et al.*, 2009). O uso de baixas doses de tetraciclina como promotor de crescimento em criação de animais, principalmente para alimentação, causa um aumento na presença de bactérias resistentes a tetraciclina, não apenas bactérias patogênicas mas também bactérias ambientais comensais (RAHMAN *et al.*, 2008).

Atualmente, cerca de 40 genes distintos de resistência a tetraciclina são conhecidos e estão geralmente associados com elementos genéticos móveis. As formas mais comuns de resistência são através do efluxo da tetraciclina da célula e da síntese de proteção ribossomal que previne a ligação da tetraciclina com o ribossomo. Em poucos casos o fenótipo de resistência depende de mutações na região 16S rRna ou inativação química do antibiótico (CAUWERTS *et al.*, 2006; CAUWERTS *et al.*, 2007; GAMA, 2008; KAZIMIERCZAK *et al.*, 2009; CASSENEGO, 2010). Numerosos estudos têm demonstrado que a resistência à tetraciclina é tipicamente transferível e uma variedade de plasmídeos tem sido observado (BOGUSLAWSKA *et al.*, 2009; KAZIMIERCZAK *et al.*, 2009). Até então foram identificadas oito classes de genes envolvidos na resistência codificada por proteínas transmembrana responsáveis pelo efluxo do antimicrobiano através da membrana celular. Classes de A até E são encontradas entre membros da família *Enterobacteriaceae* e do gênero *Haemophilus*, *Vibrio*, *Aeromonas* e *Moraxella*

estando presente em plasmídeos. Classe K e L têm sido encontradas em bactérias Gram positivas como microrganismos pertencentes aos gêneros *Enterococcus* spp, *Staphylococcus* spp e *Streptococcus* spp, estando localizados principalmente em plasmídeos (GAMA, 2008; CASSENEGO, 2010).

Proteínas de proteção ribossomal são proteínas citoplasmáticas que protegem os ribossomos da ação da tetraciclina e conferem resistência a doxiciclina e minociclina. Elas conferem um espectro mais amplo de resistência às tetraciclinas que é visto em bactérias que carregam proteínas de efluxo de tetraciclina, com exceção do Tet (B). As proteínas Tet (M), Tet (O), e OtrA reduzem a susceptibilidade dos ribossomos à ação de tetraciclinas. As proteínas Tet (M) e Tet (O) são as proteínas mais características do grupo de proteção ribossomal (CHOPRA e ROBERTS, 2001).

Sugere-se que ao longo do tempo outros genes de resistência a antibióticos foram inseridos diretamente para esta família de transposons, criando unidades maiores carregando dois a quatro diferentes genes de resistência a antibióticos. Esta poderia ser uma explicação para o gene *tet(M)* estar muitas vezes ligado ao gene *erm(B)*, que codifica uma rRNA methylase e confere resistência aos macrolídeos, lincosamidas, e estreptograminas B (MLSB). A combinação dos genes *tet(M)* e *erm(B)* é comum em Gram positivos como estreptococos, estafilococos e enterococos. Da mesma forma, um gene de cloranfenicol acetiltransferase e um aminoglicosídeo fosfotransferase que codifica resistência a canamicina (KNR), *aph A-3*, estão muitas vezes ligados ao *tet(M)* no mesmo transposon. Além disso, transposons conjugativos múltiplos, que possuem um transposon completo inserido em outro transposon, têm sido descritos em alguns dos cocos. Estes podem transferir como uma única unidade, ou o transposon inserido pode ser transferido separadamente, dando maior flexibilidade para a transferência de genes de resistência a antibióticos. Os genes *tet* são encontrados em uma variedade de bactérias isoladas de humanos, animais e meio ambiente (CHOPRA e ROBERTS, 2001).

O gene *tet(M)* está freqüentemente associado com um elemento conjugativo da família *Tn916-Tn1545*. Na maioria das espécies Gram-positivas, o gene *tet (M)* é encontrado no cromossomo, na maioria das vezes em elementos conjugativos. (CHOPRA e ROBERTS, 2001; AGERSØ *et al.*, 2006; CAUWERTS *et al.*, 2007;

GAMA, 2008; BOGUSLAWSKA *et al.*, 2009; RIZZOTTI *et al.*, 2009; ASLAM *et al.*, 2010; CASSENEGO, 2010). Isso possibilita o gene *tet(M)* de se mover facilmente entre espécies, e resulta em uma ampla distribuição entre numerosas bactérias no ambiente (RAHMAN *et al.*, 2008). Experimentos têm demonstrado a habilidade de algumas cepas de *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* e *Enterococcus durans* de transferirem determinantes de resistência através dos transposons *Tn916-1545*, bem como a capacidade de alguns *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* e cepas de *Enterococcus durans* transferirem determinantes de resistência a tetraciclina, por meio de transposons *Tn916-1545* (RIZZOTTI *et al.*, 2009). O gene *tet(M)* que codifica proteção ribossomal e o gene *tet(L)* que codifica bomba de efluxo são os genes mais frequentemente encontrados em enterococos isolados em frangos (BOGUSLAWSKA *et al.*, 2009).

### ***Enterococcus* spp em alimentos**

A contaminação fecal é uma das principais fontes para a presença de *Enterococcus* spp em carnes de aves (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Em microbiologia alimentar, eles têm sido considerados como indicadores de contaminação fecal de alimentos e água para consumo humano e são capazes de multiplicar-se em uma variedade de matérias orgânicas (leite, carne, vegetais) ou em alimentos fermentados feitos a partir de carne e leite (por exemplo, salsichas e queijos) (TEUBER *et al.*, 1999). Eles também são encontrados como contaminantes em carne crua, leite e em produtos lácteos (TEUBER *et al.*, 1999; AARESTRUP *et al.*, 2002). Normalmente, *E. faecium* e *E. faecalis* são as espécies encontradas com mais frequência, embora a prevalência varie muito entre diferentes países e diferentes tipos de produtos. São raramente encontradas as espécies *E. durans*, *E. hirae*, *E. gallinarum* e outras cepas não identificadas. Comparando com o encontrado em animais, alta diversidade genética tem sido encontrada entre os isolados de *Enterococcus* spp em alimentos (AARESTRUP *et al.*, 2002). Segundo esses mesmos autores, tem sido aceito por várias décadas que fontes não humanas de *Enterococcus* spp podem contaminar alimentos destinados ao consumo humano.

*Enterococcus* spp são tolerantes a temperaturas extremas, salinidade, pH e estão entre as bactérias não esporuladas mais termotolerantes. Cepas de *E.*

*faecium* têm sido capazes de sobreviver a 60°C por 20 minutos, 71°C por 10 minutos e 80°C por 3 minutos. Assim, *Enterococcus* spp podem sobreviver a diversos tipos de processamento de alimentos (AARESTRUP *et al.*, 2002). A resistência dos *Enterococcus* spp às temperaturas de pasteurização e sua adaptabilidade a diferentes substratos e condições de crescimento (baixa e altas temperaturas, pHs extremos e salinidade) implica que os mesmos podem ser encontrados em qualquer alimento de origem animal (carne ou leite), alimentos processados crus ou que tenham sido submetidos à tratamento térmico. Isto significa que estas bactérias podem ser encontradas em qualquer ponto do fluxograma de produção de diversos tipos de alimentos (FOULQUIÉ MORENO *et al.*, 2006; VIGNAROLI *et al.*, 2011). Estes mesmo autores enfatizam o possível papel desempenhado pelos *Enterococcus* spp resistentes aos antimicrobianos, principalmente os resistentes à vancomicina, como sendo os alimentos um reservatório natural na disseminação de traços de resistência aos antimicrobianos no ambiente. Logo, a presença destes microrganismos nos alimentos pode carrear ao homem potenciais fatores de virulência que podem comprometer a saúde humana. De acordo com Biavasco *et al.* (2007) e Agersø *et al.* (2008) a cadeia alimentar tem sido sugerida como potencial veículo de transmissão de VRE de animais para os humanos. Segundo Brtková *et al.* (2011) o trato gastrointestinal dos frangos pode ser um reservatório de enterococos resistentes a tetraciclina e eritromicina e podem transferir estes genes para humanos através da cadeia alimentar.

Segundo Aarestrup *et al.* (2002), enterococos resistentes aos glicopeptídeos (GRE) têm sido encontrados em animais destinados a alimentação em vários países da Europa, incluindo a Bélgica, Dinamarca, Finlândia, Alemanha, Noruega, Espanha, Holanda e Reino Unido. GRE também tem sido encontrado em animais de estimação, no esgoto, em fezes de aves, em frango importado no Japão, em frango na Coréia do Sul, no líquido de descongelamento de carcaças de frango em supermercados e em amostras de carne suína crua. A maioria dos isolados resistentes aos glicopeptídeos são *E. faecium*, mas outras espécies de *Enterococcus* spp, incluindo *E. hirae*, *E. gallinarum*, *E. faecalis*, *E. durans*, e *E. casseliflavus* também tem sido encontrados abrigoando o gene *vanA*. Estes *Enterococcus* spp e estes genes de resistência podem atingir os humanos de várias formas, incluindo contato direto com trabalhadores da fazenda, resíduos, águas

superficiais, ou pelo contato ou consumo de produtos cárneos. Embora os padrões de higiene na produção da carne sejam mais altos em países desenvolvidos, a contaminação fecal em produtos cárneos não pode ser completamente eliminada. Se a contaminação de produtos cárneos for significativa para transmitir GRE para humanos, estes microrganismos podem ser encontrados como colonizadores da flora intestinal de humanos não-hospitalizados.

Lopes *et al.* (2005) relatam a importância do controle da resistência antimicrobiana desde que alguns isolados de leite começaram a mostrar resistências geralmente associada a isolados clínicos, especialmente à gentamicina, um antimicrobiano que a resistência está definitivamente associada às práticas clínicas. Além disso, amostras clínicas de animais de estimação são altamente multirresistentes aos mesmos antimicrobianos de isolados clínicos de humanos, fato que é preocupante devido à proximidade de animais com seres humanos.

Alto nível de resistência aos aminoglicosídeos tem sido observado entre isolados de *Enterococcus* spp de animais destinados a alimentação, alimentos de origem animal e do meio ambiente em todo o mundo (AARESTRUP *et al.*, 2002). Tem sido demonstrado também que os mesmos genes de resistência foram encontrados em bactérias isoladas de queijos não pasteurizados e em bactérias isoladas de pacientes humanos. Além disso, a maioria dos isolados clínicos de *Enterococcus* spp em humanos são espécies que normalmente colonizam humanos. Estas observações suportam a hipótese de que *Enterococcus* spp transmitido por alimentos estão colonizando seres humanos ou trocando genes de resistência aos antimicrobianos com bactérias que colonizam os seres humanos. No entanto, ainda não foi demonstrada a correlação entre a ingestão de produtos alimentares que contenham *Enterococcus* spp e infecções (LOPES *et al.*, 2005).

Resistência antimicrobiana em bactérias encontradas em alimentos de origem animal está se tornando uma ameaça crescente para a saúde animal e humana. Resistência antimicrobiana presente em bactérias de animais de produção pode levar a falha terapêutica e perdas econômicas para o produtor, e a transferência de resistência a bactérias patogênicas importantes para humanos pode causar dificuldades no tratamento. Em todo o mundo, bactérias indicadoras, ao lado de patogênicas e bactérias zoonóticas, são utilizadas para o monitoramento da resistência em animais e seres humanos. Bactérias indicadoras são de especial

interesse por causa de seu possível papel como um reservatório de resistência, abrigando genes de resistência que podem ser transmitidas a outras populações bacterianas dentro do mesmo hospedeiro ou a outros hospedeiros. Devido à sua presença comum em ambos os animais e trato intestinal humano, a *Escherichia coli* e *Enterococcus faecium* são internacionalmente utilizadas como bactérias indicadoras Gram negativa e Gram positivas, respectivamente, para monitorar a resistência aos antibióticos na criação animal. Um acompanhamento regular da evolução da resistência entre essas bactérias indicadoras de aves pode fornecer informações úteis sobre as tendências e evoluções da resistência antimicrobiana e está se tornando uma questão importante para animais e de saúde pública (PERSOONS *et al.*, 2010).

### **Importância dos Enterococos em alimentos**

Os Enterococos caracterizam-se como linhagens homofermentativas tendo como o produto final da fermentação da glicose o ácido láctico, sem produção de gás o que diminui o pH e pode inibir microrganismos patogênicos como *Salmonella* spp, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* enteropatogênica e *Campylobacter jejuni*, além de conferir sabor ácido característico de produtos fermentados. Adicionalmente, as bactérias ácidas lácticas podem produzir substâncias antimicrobianas, como bacteriocinas, conferindo aos produtos maturados e queijos do tipo frescal melhor qualidade sanitária (GAMA, 2008).

Os *Enterococcus* spp são utilizados como culturas *starters* na fermentação de alimentos para a produção de certos queijos e outros produtos de leite fermentado (TEUBER *et al.*, 1999; AARESTRUP *et al.*, 2002). Certas cepas de *E. faecium* são aplicados como probióticos para animais de criação e os seres humanos, e pode ser um componente inoculante para silagem (TEUBER *et al.*, 1999). Por muitos anos, a presença de enterococos em alimentos tem sido altamente controversa. De um lado, as cepas de *Enterococcus* spp com características bioquímicas específicas que são essenciais para a fabricação de vários produtos lácteos fermentados, e algumas cepas são exploradas tecnologicamente como cultura *starters* ou probióticos. Por outro lado, os enterococos também têm sido implicados na deterioração de carnes processadas e incluem cepas que foram reconhecidas como patógenos emergentes

causadores de infecções em humanos principalmente hospitalares, mas também infecções adquiridas na comunidade (HUYS *et al.*, 2004).

Foram realizados estudos do uso de linhagens de Enterococos como probióticos para utilização em humanos ou animais, sendo a linhagem de *E. faecium* SF68 uma das mais estudadas em termos de atividade probiótica. Esses estudos relataram a importância do uso de cepas de *E. faecium* e *E. faecalis* como probiótico, pois os mesmos podem implicar em ganho de resposta imune, equilíbrio da microbiota intestinal, redução de enzimas fecais envolvidas em processos de câncer, tratamento de diarreia associada a antibióticos, controle de colites induzidas por Rotavírus e prevenção de úlceras causadas por *Helicobacter pilory*, redução de colesterol sérico, antagonismo a patógenos associados à contaminação de alimentos, microrganismos envolvidos em cáries dentárias, candidíase de trato urinário, além de outras atividades ainda não relatadas (GAMA, 2008; CASSENEGO, 2010).

### **O uso de agentes antimicrobianos em animais**

Além do tratamento de infecções em humanos, agentes antimicrobianos são utilizados em animais destinados à alimentação, em animais de estimação, na produção de plantas, para fins industriais e uso laboratorial. Na produção moderna de alimentos de origem animal, agentes antimicrobianos são utilizados de maneiras diferentes como na terapia, na profilaxia, e como promotor de crescimento. Este último uso tem sido seriamente questionado em diversos países e é um objeto de forte debate (AARESTRUP *et al.*, 2002). Geralmente não há diferenças entre as classes dos agentes antimicrobianos utilizados como terapia e como promotores de crescimento em animais destinados à alimentação e aqueles usados em tratamentos de infecções em humanos (AARESTRUP *et al.*, 2002; KAK e CHOW, 2002; HWANG *et al.*, 2009).

Durante o período de uso de antimicrobianos como promotores de crescimento, houve um aumento no número de *Enterococcus* isolados de alimentos resistentes a vários agentes antimicrobianos, incluindo vancomicina, gentamicina e estreptograminas (CASSENEGO, 2010). Em 1995, o uso do glicopeptídeo avoparcina foi banido na Dinamarca devido à preocupação com a seleção de VRE e

o risco potencial de disseminação desta resistência através da cadeia alimentar em humanos (AARESTRUP *et al.*, 2002). Isto foi seguido por uma proibição total em todos os países da União Europeia em 1997 (AARESTRUP *et al.*, 2002; BIAVASCO *et al.*, 2007; AGERSØ *et al.*, 2008). Em 1998, virginiamicina foi banida na Dinamarca por causa da resistência cruzada com quinupristina/dalfopristina. Em dezembro de 1998, a Comissão Europeia decidiu banir o uso de bacitracina, espiramicina, tilosina e virginiamicina como promotores de crescimento. Esta iniciativa seguiu a recomendação da Organização Mundial da Saúde e tiveram efeitos significantes nos tipos e quantidades de agentes antimicrobianos usados na Europa (AARESTRUP *et al.*, 2002). Desde a proibição do uso de avoparcina na alimentação animal na União Europeia, a prevalência de GRE tem diminuído entre os animais domésticos e na comunidade, embora tem sido relatado a persistência da resistência de GRE em ambientes expostos à avoparcina (AARESTRUP *et al.*, 2002; BIAVASCO *et al.*, 2007). Em contrapartida, a incidência de GRE em hospitais permaneceu substancialmente inalterada no norte da Europa e tem aumentado nos países do sul da Europa (BIAVASCO *et al.*, 2007). Uma preocupação crescente sobre a seleção de resistência através do uso de análogos de antimicrobianos humanos como promotores de crescimento em animais levou a União Europeia banir o uso de todos antimicrobianos como aditivos alimentares. Seu uso está proibido em toda a produção até os dias atuais (CASSENEGO, 2010).

Infecções causadas por *Enterococcus* spp em animais são raramente tratadas com agentes antimicrobianos (AARESTRUP *et al.*, 2002). Entretanto, como habitantes normais do trato intestinal, *Enterococcus* spp são expostos à seleção antimicrobiana todas as vezes que o animal é submetido a uma terapia antimicrobiana ou quando são administrados agentes antimicrobianos como promotores de crescimento ou profilaxia. Muitos estudos têm demonstrado que o uso de agentes antimicrobianos, tanto em alta quanto em baixa concentração, seleciona para resistência e podem levar à formação de um reservatório animal de enterococos resistentes a antimicrobianos, bem como aumentar a seleção de bactérias zoonóticas resistentes, que podem infectar humanos devido ao contato com animais e através da ingestão de alimentos de origem animal (AARESTRUP *et al.*, 2002; HWANG *et al.*, 2009; VIGNAROLI *et al.*, 2011). E tem sido sugerido que o uso de antibióticos para promover o crescimento dos animais ou para tratamento e

controle de doenças dos animais acelera o aparecimento de bactérias resistentes aos antibióticos em humanos (VIGNAROLI *et al.*, 2011). O uso massiço de drogas como promotores de crescimento tem aumentado a resistência antimicrobiana em enterococos de origem animal (HWANG *et al.*, 2009).

A forma mais efetiva de limitar a disseminação da resistência antimicrobiana, e assim ampliando a utilidade de antimicrobianos, seria através da restrição de seu uso. Como consequência, tem sido recomendado que agentes antimicrobianos que causam resistência aos antimicrobianos usados na terapia de humanos poderiam não ser usados como promotores de crescimento na criação animal. Promotores de crescimento poderiam ser limitados a agentes que não possuem valor na terapêutica. Para limitar o surgimento de resistência antimicrobiana e as conseqüências aos humanos e saúde animal, é necessário coletar dados a respeito dos fatores que afetam a ocorrência, o surgimento e a disseminação da resistência. Monitoramento da resistência antimicrobiana tanto na clínica quanto na criação animal é essencial para a preservação dos valores terapêuticos dos antimicrobianos (AARESTRUP *et al.*, 2002).

Segundo UBABEF (2011), a produção de carne de frango no Brasil chegou a 12,230 milhões de toneladas em 2010, demonstrando um crescimento de 11,38% em relação a 2009, quando foram produzidas 10,980 milhões de toneladas. Com este desempenho o Brasil se aproxima da China, hoje o segundo maior produtor mundial, cuja produção de 2010 teria somado 12,550 milhões de toneladas, abaixo apenas dos Estados Unidos, com 16,648 milhões de toneladas, conforme projeções do Departamento de Agricultura dos EUA (USDA). O crescimento em 2010 foi impulsionado principalmente pelo aumento de consumo de carne de frango e pela expansão de 5,1% nas exportações. Do volume total de frangos produzido pelo país, 69% foi destinado ao consumo interno, e 31% para exportações. Com isto, o consumo per capita de carne de frango foi de 44 quilos nesse ano. Em exportações, registrou-se novo recorde histórico em volume, com total de 3,8 milhões de toneladas de frangos, exportadas para mais de 150 países. Atualmente o Brasil é um dos maiores exportadores de carne de frango, ocupando o primeiro lugar no ranking mundial.

Com o aumento do consumo da carne de frango e seus derivados, e conseqüentemente, aumento da produção aviária no mundo, inúmeras doenças

causadas por microrganismos surgiram devido à elevada densidade de frangos nos aviários. Em decorrência deste fato, modernas tecnologias de produção avícola têm implicado numa utilização cada vez maior do uso de substâncias químicas (antimicrobianos) durante todas as fases de produção. Para que o setor avícola mantenha o sucesso, é preciso investir em produtividade a baixo custo, ter cuidado com a qualidade e sanidade de granjas, no que se refere principalmente à nutrição animal, ganho de peso e doenças infecciosas que possam vir a acometer os animais, comprometendo seu desempenho zootécnico, e também, com a questão ambiental, destacando-se a importância do aproveitamento dos resíduos da indústria avícola (CASSENEGO, 2010).

Esforços institucionais têm sido realizados para garantir a segurança alimentar no Brasil, como o programa nacional de monitoramento de resistência antimicrobiana de *Salmonella* e *Enterococcus* em carcaças de frangos, coordenados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2008). Esses programas são importantes para avaliações de risco, atualmente um pré-requisito para o comércio internacional de produtos alimentares. A presença de microrganismos resistentes em animais produtores de alimentos e a possível contaminação de sua carcaça são aspectos importantes em termos de sanidade animal e de saúde pública. Como consequência dessa pressão seletiva dentro da produção avícola, um amplo espectro de bactérias resistentes e genes de resistência têm sido formados e há uma preocupação generalizada sobre o potencial de infiltração desses determinantes de resistência em patógenos humanos (CASSENEGO, 2010).

## OBJETIVOS

Este estudo teve por objetivos principais:

- Realizar o isolamento de *Enterococcus* spp em amostras de carcaças de frango congeladas e resfriadas comercializadas no Distrito Federal;
- Efetuar o antibiograma das colônias de *Enterococcus* spp das seguintes drogas: ampicilina, vancomicina, teicoplanina, gentamicina, eritromicina, ciprofloxacina, enrofloxacina, tetraciclina, cloranfenicol, ceftazidima e cefalotina;
- Identificar as espécies *E. faecium* (*ddl<sub>E. faecium</sub>*) e *E. faecalis* (*ddl<sub>E. faecalis</sub>*) através da PCR;
- Avaliar a presença de 11 genes de resistência aos antimicrobianos vancomicina (*vanA*, *vanB*, *vanC1* e *vanC2/3*), aminoglicosídeos (*ant(6)-Ia*, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* e *aph(3')-IIIa*), eritromicina (*erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*) e tetraciclina (*tet(M)*) em cepas de *Enterococcus* spp através da PCR.

## REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F. M., BUTAYE, P., WITTE, W. Nonhuman Reservoirs of Enterococci. In. GILMORE, M. S. **The Enterococci – Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance**. Washington, D. C.: ASM PRESS, 2002.

AGERSØ, Y. et al. Identification of Tn5397-like and Tn916-like transposons and diversity of the tetracycline resistance gene tet(M) in enterococci from humans, pigs and poultry. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.57, p.832–839, 2006.

AGERSØ, Y. et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* isolates from a Danish patient and two healthy human volunteers are possibly related to isolates from imported turkey meat. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.62, n.4, p.844–845, 2008.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango – PREBAF**. Janeiro/2008.

ASLAM, M. et al. Characterization of antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. recovered from a commercial beef processing plant. **Foodborne Pathogens Disease**, v.7, n.3, p.235–241, 2010.

BARBOSA, J. et al. Antibiotic susceptibility of enterococci isolated from traditional fermented meat products. **Food Microbiology**. v. 26, p.527–532, 2009.

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, 2007.

BOGUSLAWSKA, J. et al. Intra- and interspecies conjugal transfer of Tn916-like elements from *Lactococcus lactis* in vitro and in vivo. **Appl Environ Microbiol**, v.75, n.19, p.6352–6360, 2009.

BRTKOVÁ, A. et al. Detection of tetracycline and macrolide resistance determinants in enterococci of animal and environmental origin using multiplex PCR. **Folia Microbiol**, Jun/2011.

CASAL, M. M.; CAUSSE, M.; SOLIS, F.; RODRIGUEZ, F.; CALSAL, M. Investigación de las resistências a antimicrobianos en *Enterococcus faecalis*. **Rev Esp Quimioter**, v.22, n.3, p.117-119, 2009.

CASSENEGO, A. P. V. Avaliação da colonização e resistência antimicrobiana de *Enterococcus* sp. isolados de “swabs” cloacais de frango de corte. 89p. Dissertação de mestrado em Microbiologia agrícola e do ambiente, Instituto de ciências básicas da saúde, Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. Março, 2010.

CAUWERTS, K. et al. Cloacal *Lactobacillus* isolates from broilers often display resistance toward tetracycline antibiotics. **Microb Drug Resist**, vol. 12, n. 04, p. 284–288, 2006.

CAUWERTS, K. et al. High prevalence of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from broilers carrying the *erm(B)* gene. **Avian Pathology**, v.36, n.5, p.395–399, 2007.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. C. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.65, n.2, p.232–260, 2001.

DUTKA-MALEN, S., S. Evers, and P. Courvalin. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. **J. Clin. Microbiol.** v.33, p.24–27, 1995.

EMANEINI, M. et al. Characterization of Glycopeptides, Aminoglycosides and Macrolide resistance among *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* isolates from hospitals in Tehran. **Polish Journal of Microbiology**, v.57, n.2, p.173–178, 2008.

FACKLAM, R. R. et al. History, Taxonomy, Biochemical Characteristics, and Antibiotic Susceptibility Testing of Enterococci. In. GILMORE, M. S. **The Enterococci – Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance**. Washington, D. C.: ASM PRESS, 2002.

FOULQUIÉ MORENO, M.R. et al. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of food Microbiology**, v.106, p.1-24, 2006.

FRACALANZZA, S. A. P et al. Antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from poultry meat and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.102, n.7, p.853-859, 2007.

GAMA, B. A. Análise da resistência antimicrobiana e de genes de virulência de *Enterococcus* spp. Dissertação de mestrado. Porto Alegre, RS, Brasil. (73p.) Janeiro, 2008.

GILMORE, M. S. Enterococcal Virulence. In. GILMORE, M. S. **The Enterococci – Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance**. Washington, D. C.: ASM PRESS, 2002.

GUPTA, V. et al. Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus*: a study from North India. **J. Postgrad. Med**, v.55, p.176–179, 2009.

HONG-ZHOU, L. et al. *Enterococcus faecium* - related outbreak with molecular evidence of transmission from pigs to humans. **J. Clin. Microbiol**, v.40, p.913-917, 2002.

HUYS, G. et al. Prevalence and Molecular Characterization of Tetracycline Resistance in *Enterococcus* Isolates from Food. **Appl. Environ. Microbiol**. v.70, n.3, p.1555–1562, Mar. 2004.

HWANG, I. Y. et al. Species distribution and resistance patterns to growth-promoting antimicrobials of enterococci isolated from pigs and chickens in Korea. **J Vet Diagn Invest**. v. 21, p.858–862, 2009.

HWANG, I.Y. et al. Distribution of streptogramin resistance genes and genetic relatedness among quinupristin/dalfopristin-resistant *Enterococcus faecium* recovered from pigs and chickens in Korea. **Research in Veterinary Science**, v.89, p.1–4, 2010.

JACKSON, C. R. et al. Use of a Genus- and Species-Specific Multiplex PCR for Identification of Enterococci. **Journal of Clinical Microbiology**, p.3558–3565, 2004.

JENSEN, L. B. et al. Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Strains with Highly Similar PulsedField Gel Electrophoresis Patterns Containing Similar Tn1546-Like Elements Isolated from a Hospitalized Patient and Pigs in Denmark. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.43, n.3, p.724–725, 1999.

KASIMOGLU-DOGRU, A. et al. Prevalence and antibiotic resistance profiles of *Enterococcus* species in chicken at slaughter level; absence of *vanA* and *vanB* genes in *E. faecalis* and *E. faecium*. **Research in Veterinary Science**, v.89, p.153–158, 2010.

KAK, V.; CHOW, J. W. Acquired Antibiotic Resistances in Enterococci. In. GILMORE, M. S. **The Enterococci – Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance**. Washington, D. C.: ASM PRESS, 2002.

KAZIMIERCZAK, K. A. et al. Tetracycline Resistome of the organic pig gut. **Appl Environ Microbiol**, v.75, n.6, p.1717–1722, 2009.

KLARE, I. et al. Spread of ampicillin/vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* of the epidemic-virulent clonal complex-17 carrying the genes *esp* and *hyl* in German hospitals. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** v. 24, p. 815-825, 2005.

KOBAYASHI, C. C. B. A. et al. Resistência antimicrobiana associada em isolados clínicos de *Enterococcus* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.44, n.3, p.344-348, 2011.

LEENER, E. et al. Distribution of the *erm(B)* Gene, Tetracycline Resistance Genes, and Tn1545-like Transposons in Macrolide- and Lincosamide-Resistant Enterococci from Pigs and Humans. **Microbial Drug Resistance**, v.10, n.4, p.341–345, 2004.

LOPES, M. F. S., RIBEIRO, T., ABRANTES, M., MARQUES, J. J.F., TENREIRO, R., CRESPO, M. T. B. Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci. **International Journal of Food Microbiology**, v.103, p.191–198, 2005.

LÓPEZ, M. et al. Detection of vanA and vanB2-containing enterococci from food samples in Spain, including *Enterococcus faecium* strains of CC17 and the new singleton ST425. **International Journal of Food Microbiology**, v.133, p.172–178, 2009.

LÓPEZ, F. et al. Antimicrobial susceptibility and macrolide resistance genes in *Enterococcus faecium* with reduced susceptibility to quinupristin–dalfopristin: level of quinupristin–dalfopristin resistance is not dependent on *erm(B)* attenuator region sequence. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.66, p.73–77, 2010.

NEELA, F. A. et al. Transfer of the chromosomally encoded tetracycline resistance gene tet(M) from marine bacteria to *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis*. **World J Microbiol Biotechnol**, v.25, p.1095–1101, 2009.

OLIVEIRA, M. et al. Antimicrobial resistance and in vitro biofilm-forming ability of enterococci from intensive and extensive farming broilers. **Poultry Science**, v.89, p.1065–1069, 2010.

OYAMADA, Y. et al. Topoisomerase mutations and efflux are associated with fluorquinolone resistance in *Enterococcus faecalis*. **Journal of Medical Microbiology**, v.55, p.1395-1401, 2006.

PERSOONS, D. et al. Prevalence and Persistence of Antimicrobial Resistance in Broiler Indicator Bacteria. **Microbial Drug Resistance**, v.16, n.1, p.67-74, 2010.

POETA, P. et al. Characterization of Antibiotic Resistance Genes and Virulence Factors in Faecal Enterococci of Wild Animals in Portugal. **J. Vet. Med. B** 52, p.396–402, 2005.

RAHMAN, M. H. et al. Occurrence of two genotypes of tetracycline (TC) resistance gene *tet(M)* in the TC-resistant bacteria in marine sediments of Japan. **Environ. Sci. Technol.**, v.42, n.14, p.5055-5061, 2008.

RIBOLDI, G. P. et al. Antimicrobial resistance profile of *Enterococcus* spp isolated from food in Southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p.125–128, 2009.

RIZZOTTI, L. et al. Molecular diversity and transferability of the tetracycline resistance gene *tet(M)*, carried on *Tn916-1545* family transposons, in enterococci from a total food chain. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.96, p.43–52, 2009.

SCHWAIGER, K.; BAUER, J. Detection of the Erythromycin Rrna Methylase Gene *erm(A)* in *Enterococcus faecalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, n.8, p.2994–2995, 2008.

TEUBER, M. et al. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.76, p.115–137, 1999.

UBABEF – União Brasileira de Avicultura. **Relatório anual 2010/2011**. Disponível em: <http://www.abef.com.br/ubabef/exibenoticiaubabef.php?notcodigo=2761>. Acesso em: 13 dez. 2011.

VAN DEN BOGAARD, A. E. et al. Antibiotic resistance of fecal enterococci in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. **Journal Antimicrob Chemother**, v. 49, p. 497–505, 2002.

VIGNAROLI, C. et al. Multidrug-Resistant Enterococci in Meat and Faeces and Co-Transfer of Resistance from an *Enterococcus durans* to a Human *Enterococcus faecium*. **Curr Microbiol**, v.62, p.1438–1447, 2011.

WERNER, G. et al. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. **Eurosurveillance**, v. 13, n.47, p.1–11, 2008.

ZANELLA, R. C. et al. Phenotypic and genotypic characterization of VanA enterococcus isolated during the first nosocomial outbreak in Brazil. **Microb Drug Resist**, v.9, p.283-291, 2003.

ZARRILLI, R. et al. Molecular epidemiology of high-level aminoglycoside-resistant enterococci isolated from patients in a university hospital in southern Italy. **Jornal of Antimicrobial Chemotherapy**, n.56, p.827-835, 2005.

ZOU, L.-K. et al. Erythromycin resistance and virulence genes in *Enterococcus faecalis* from swine in China. **New Microbiologica**, v.34, p.73-80, 2011.

## CAPÍTULO II

### RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE *ENTEROCOCCUS* ISOLADAS DE CARÇAÇAS DE FRANGO COMERCIALIZADAS NO DISTRITO FEDERAL

#### INTRODUÇÃO

Os *Enterococcus* spp são um importante grupo de bactérias devido a sua interação com os humanos. Algumas cepas são utilizadas na produção de alimentos enquanto que outras são causadoras de infecções sérias em humanos e animais (FACKLAM *et al.*, 2002). Os *Enterococcus* spp compõem a microbiota intestinal de seres humanos e animais saudáveis e estão amplamente distribuídos no ambiente (CASAL *et al.*, 2009; LÓPEZ *et al.*, 2009; RIBOLDI *et al.*, 2009). Eles são considerados como patógenos emergentes de humanos e muitas vezes são identificados como a causa de um número crescente de infecções hospitalares (GAMA, 2008; RIZZOTTI *et al.*, 2009; VIGNAROLI *et al.*, 2011; ZOU *et al.*, 2011). As duas espécies mais importantes, *E. faecium* e *E. faecalis*, estão frequentemente implicadas em infecções animais e humanas, como bacteremia, septicemia, infecções do trato urinário, infecções de feridas, meningites e endocardites (VAN DEN BOGAARD *et al.*, 2002; CAUWERTS *et al.*, 2007; GAMA, 2008; ZOU *et al.*, 2011).

Os *Enterococcus* spp são extremamente resistentes e sobrevivem a condições que são letais a maioria de outros microrganismos (AARESTRUP *et al.*, 2002; RIBOLDI *et al.*, 2009; VIGNAROLI *et al.*, 2011). Esses microrganismos são

considerados patógenos de grande importância para os humanos devido à sua habilidade de adquirir virulência e à facilidade de se tornar resistente a antimicrobianos (DUTKA-MALEN *et al.*, 1995; CASAL *et al.*, 2009; RIZZOTTI *et al.*, 2009; LÓPEZ *et al.*, 2009; ZOU *et al.*, 2011). Eles têm a capacidade de transferir genes de resistência por meio de elementos móveis, e são conhecidos por serem intrinsecamente resistentes a diversos antimicrobianos como cefalosporinas, penicilinas, aminoglicosídeos, vancomicinas, lincosamidas, polimixinas, estreptograminas A e monobactams. Como resultado, as opções terapêuticas estão se tornando limitadas para o tratamento de infecções causadas por *Enterococcus* spp (ASLAM *et al.*, 2010; CASSENEGO, 2010; LÓPEZ *et al.*, 2010; ZOU *et al.*, 2011).

*Enterococcus* spp resistentes à vancomicina (VRE) foram inicialmente relatados em infecções humanas no final de 1980 na França e do Reino Unido e, desde então, se disseminaram consideravelmente por todo o mundo (AARESTRUP *et al.*, 2002; KAK e CHOW, 2002; WERNER *et al.*, 2008). O primeiro caso de *E. faecium* resistente à vancomicina e teicoplanina no Brasil foi isolado de um paciente com meningite em junho de 1997 na cidade de São Paulo. Nesse mesmo hospital, desde maio de 1998, novas cepas de VRE foram detectadas em infecções hospitalares (ZANELLA *et al.*, 2003). O surgimento de VRE tornou-se um problema clínico urgente e sério para a saúde pública e foi classificado como um patógeno que contribui significativamente para infecções hospitalares em todo o mundo desde o isolamento no final da década de 80 (KASZANYITZKY *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2009). Além disso, o risco dos *Enterococcus* spp transferirem resistência à vancomicina para outras bactérias patogênicas, tal como *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), é também uma questão de preocupação (KASZANYITZKY *et al.*, 2007; LÓPEZ *et al.*, 2009). Um dos promotores de crescimento com grave problema para a saúde humana é avoparcina, uma vez que pode desenvolver resistência antimicrobiana a outros glicopeptídeos. Assim, os relatos iniciais de origem humana sobre *Enterococcus* spp resistentes aos glicopeptídeos (GRE) causou uma grande preocupação. A primeira descrição sobre o isolamento de VRE de animais foi publicado em 1993, posteriormente VRE foi encontrado em carne, no ambiente e em humanos saudáveis da Europa (KASZANYITZKY *et al.*, 2007).

Diversos fenótipos de resistência à vancomicina foram descritos, e, dentre os principais, cinco deles são conhecidos por serem adquiridos (VanA, VanB, VanD, VanE e VanG) enquanto que um deles (VanC) por ser uma propriedade intrínseca dos *Enterococos* móveis (*E. casseliflavus*, *E. gallinarum* e *E. flavescens*) (GAMA, 2008; CASSENEGO, 2010).

No Brasil, segundo UBABEF (2011) a produção de carne de frango chegou a 12,230 milhões de toneladas em 2010, demonstrando um crescimento de 11,38% em relação a 2009, quando foram produzidas 10,980 milhões de toneladas. Com este desempenho o Brasil se aproxima da China, hoje o segundo maior produtor mundial, cuja produção de 2010 teria somado 12,550 milhões de toneladas, abaixo apenas dos Estados Unidos, com 16,648 milhões de toneladas, conforme projeções do Departamento de Agricultura dos EUA (USDA). O crescimento em 2010 foi impulsionado principalmente pelo aumento de consumo de carne de frango e pela expansão de 5,1% nas exportações. Do volume total de frangos produzido pelo país, 69% foi destinado ao consumo interno, e 31% para exportações. Com isto, o consumo per capita de carne de frango foi de 44 quilos nesse ano. Em exportações, registrou-se novo recorde histórico em volume, com total de 3,8 milhões de toneladas de frangos, exportadas para mais de 150 países. Atualmente o Brasil é um dos maiores exportadores de carne de frango, ocupando 1º lugar no ranking mundial.

No sistema de criação de frangos, drogas antimicrobianas podem ser utilizadas como agentes terapêuticos e/ou promotores de crescimento (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Os *Enterococcus* spp são propensos a sofrer seleção a cada administração de antimicrobiano, levando à formação de um reservatório animal de *Enterococcus* spp resistentes a antimicrobianos que podem infectar os seres humanos tanto por contato direto com animais, como através da ingestão de alimentos de origem animal ou por água contaminada, peixe e vegetais (KASZANYITZKY *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2010; VIGNAROLI *et al.*, 2011). Vignaroli *et al.* (2011) relatam que *Enterococcus* spp resistentes a antimicrobianos ingeridos tem demonstrado serem capazes de transferirem seus genes de resistência a antibióticos para a microbiota endógena do ser humano, bem como para bactérias transitórias, incluindo patógenos e sugerem que a carne pode ser um ambiente adequado para uma ampla faixa de transferência de resistência

antimicrobiana *in vivo* e que os *Enterococcus* spp multirresistentes de animais e alimentos parecem manter-se suscetíveis aos antibióticos mais recentes. De acordo com Kaszanyitzky *et al.* (2007) e Oliveira *et al.* (2010) a triagem de resistência antimicrobiana em *Enterococcus* spp isolados de alimentos de origem animal é essencial para monitorar o risco de transferência de genes de resistência antimicrobiana para humanos e para garantir segurança alimentar.

Foi feita uma análise em âmbito nacional pela ANVISA (2008), no Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango – PREBAF, no qual avaliou-se a presença de *Enterococcus* spp em carcaças de frango congeladas e efetuou-se o antibiograma das cepas isoladas. Um total de 542 amostras foram analisadas no período de 2004 a 2006. Quanto à presença de *Enterococcus* spp, 535 (98,7%) amostras foram positivas para a presença desta bactéria. Foi observado também que houve uma predominância de quatro espécies: *E. faecalis* (61,4%), *E. gallinarum* (28,7%), *E. casseliflavus* (5,06%) e *E. faecium* (2,2%).

Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivo efetuar a pesquisa de cepas de *Enterococcus* spp isolados de carcaças de frango resfriadas e congeladas, realizar o antibiograma, identificar através da reação em cadeia da polimerase (PCR) as espécies *E. faecium* e *E. faecalis* e realizar a detecção de genes de resistência antimicrobiana.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Obtenção das amostras e isolamento bacteriano**

Foram adquiridas 100 amostras de carcaças de frango, sendo 54 carcaças resfriadas e 46 congeladas, de 11 marcas comercializadas em 20 estabelecimentos comerciais localizados no Distrito Federal no período de Junho a Dezembro de 2010. As amostras foram adquiridas simulando uma situação real de compra pelo consumidor, onde uma unidade amostral adquirida era composta por uma carcaça inteira, com embalagem íntegra, sem qualquer sinal de violação, com SIF e dentro

do prazo de validade. As amostras foram transportadas até o Laboratório de Microbiologia de Alimentos (LAMAL) da UnB em caixas isotérmicas e posteriormente acondicionadas em refrigerador a 4°C, para em seguida proceder o isolamento microbiológico das amostras adquiridas.

A metodologia utilizada para o isolamento de *Enterococcus* spp e realização do antibiograma foi a descrita por López *et al.* (2009). Foram pesadas 0,3 g de cada amostra (carcaça inteira) da região da cloaca, pescoço e embaixo da asa, em papel alumínio estéril, e posteriormente transferidas para tubos contendo 3 mL de Solução Salina 0,85% esterilizada. Após a homogeneização em vórtex (PHOENIX®) durante 15 segundos, foram aliquoteados 300µl do homogeneizado e plaqueados em meio seletivo (BD® BBL™ Enterococcosel™ Agar) com e sem suplementação de 4µl/mL de vancomicina 250 mg (Sigma®). As placas foram incubadas a 35°C por 48h em estufas bacteriológica (Quimis®). As colônias pequenas, translúcidas com zonas entre preto-acastanhado e preto foram plaqueadas em Agar Nutriente (Acumedia®) para se obter o isolamento das colônias de *Enterococcus* spp e efetuar os testes bioquímicos. Para cada colônia, foi feito a coloração de Gram, o teste de catalase e hidrólise enzimática da L-pyrrolidonyl-beta-naphthylamide (PYR TEST – PROBAC do Brasil®). As colônias com morfologia de cocos Gram positivos, negativos para catalase e positivos para PYR foram submetidas à realização do antibiograma.

### **Identificação por PCR das espécies *E. faecalis*, *E. faecium* e teste de susceptibilidade antimicrobiana**

Para a identificação das espécies *E. faecium* e *E. faecalis* foi realizada uma múltipla PCR de colônia, segundo Titze-de-Almeida *et al.* (2004), cujos oligonucleotídeos estão descritos no Quadro 1. A programação utilizada para a amplificação dos fragmentos foi de 30 ciclos para a seguinte combinação de temperaturas: 94°C por 5 min, 94°C por 1 min, 52°C por 1 min, 72°C por 2 min e 72°C por 5 min. Ao final a temperatura 4°C foi programada para até a retirada dos tubos.

**Quadro 1** – Oligonucleotídeos utilizados para a diferenciação das espécies.

Gene	Sequência do Primer 5' – 3'	Tamanho (pb)	Referência
<i>ddl<sub>E. faecium</sub></i>	TAGAGACATTGAATATGCC	550	Titze-de-Almeida

	TCGAATGTGCTACAATC		<i>et al.</i> (2004)
<i>ddl</i> <sub><i>E. faecalis</i></sub>	ATCAAGTACAGTTAGTCT ACGATTCAAAGCTAACTG	941	Titze-de-Almeida <i>et al.</i> (2004)

Para cada colônia isolada foi realizado o teste de antibiograma, e as bases farmacológicas analisadas foram Ampicilina (10 µg), Vancomicina (30 µg), Teicoplanina (30 µg), Gentamicina (10 µg), Eritromicina (15 µg), Ciprofloxacina (5 µg), Enrofloxacina (5 µg), Tetraciclina (30 µg), Cloranfenicol (30 µg), Ceftazidima (30 µg) e Cefalotina (30 µg) da marca BIO-RAD®. O método utilizado foi o de disco de difusão, conforme recomendado por National Committee for Clinical Laboratory Standards (2003), em que a preparação do inóculo foi feita pelo método de crescimento, no qual foram selecionadas de três a cinco colônias isoladas, transferidas para um tubo contendo entre 4 e 5 mL do caldo TSB (BD®) e incubado a 35°C até alcançar a turbidez de 0,5 na escala padrão McFarland. Após esse período, um *swab* estéril foi mergulhado no caldo e feito a inoculação no ágar Müller-Hinton (HIMEDIA®), esfregando-se o *swab* em toda a superfície do Agar. Em seguida, com o uso de uma pinça anatômica, foram distribuídos os discos de antimicrobianos por igual em cada placa de 100x20mm, de maneira que o centro dos discos de antibióticos entre um e outro não exceda 24 mm, conforme previamente recomendado por NCCLS (2003). Após este procedimento, as mesmas foram incubadas sob a temperatura de 35°C, por 18 horas. E para o teste de susceptibilidade a vancomicina, a incubação da cepa foi de 35°C por 24 horas completas para que qualquer halo de inibição ao redor do disco de vancomicina seja examinado cuidadosamente para checar a existência de pequenas colônias ou de um filme de crescimento dentro do halo de inibição, segundo protocolo descrito por NCCLS (2003). A leitura do teste foi realizada com uma régua e posteriormente os dados obtidos foram comparados com a tabela padrão de interpretação dos halos de inibição da NCCLS (2003).

### **Detección de genes de resistência antimicrobiana através da PCR**

Colônias isoladas foram utilizadas individualmente para a realização das PCRs, conforme descrito por Titze-de-Almeida *et al.* (2004). Já para identificar os

genes de resistência aos antimicrobianos Vancomicina (*vanA*, *vanB*, *vanC-1* e *vanC-2/3*), Aminoglicosídeos (*ant(6)-Ia*, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* e *aph(3')-IIIa*), Eritromicina (*erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*) e Tetraciclina (*tet(M)*) foram utilizados os oligonucleotídeos descritos no Quadro 2.

**Quadro 2** - Oligonucleotídeos utilizados na detecção de genes de resistência.

Gene	Sequência do Primer 5' – 3'	Tamanho (pb)	Referência
<i>vanA</i>	GGGAAAACGACAATTGC GTACAATGCGGCCGTTA	732	Dutka-Malen <i>et al.</i> (1995)
<i>vanB</i>	ACCTACCCTGTCTTTGTGAA AATGTCTGCTGGAACGATA	304	Zanella <i>et al.</i> (2003)
<i>vanC-1</i>	GGTATCAAGGAAACCTC CTTCCGCCATCATAGCT	822	Dutka-Malen <i>et al.</i> (1995)
<i>vanC-2/3</i>	CTCCTACGATTCTCTTG CGAGCAAGACCTTTAAG	439	Dutka-Malen <i>et al.</i> (1995)
<i>ant(6)-Ia</i>	ACTGGCTTAATCAATTTGGG GCCTTTCCGCCACCTCACCG	597	Clark <i>et al.</i> (1999)
<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>	CCAAGAGCAATAAGGGCATA CACTATCATAACCACTACCG	220	Van de Klundert e Vliegthart (1993)
<i>aph(3')-IIIa</i>	GCCGATGTGGATTGCGAAAA GCTTGATCCCCAGTAAGTCA	292	Van de Klundert e Vliegthart (1993)
<i>erm(A)</i>	TCTAAAAGCATGTAAAAGAA CTTCGATAGTTTATTAATATTA GT	645	Sutcliffe <i>et al.</i> (1996)
<i>erm(B)</i>	GAAAAGGTA CTCAACCAAATA AGTAACGGTACTTAAATTGTT TAC	639	Sutcliffe <i>et al.</i> (1996)
<i>erm(C)</i>	TCAAAACATAATATAGATAAA GCTAATATTGTTTAAATCGTC AAT	642	Sutcliffe <i>et al.</i> (1996)
<i>tet(M)</i>	GTAAATAGTGTTCTTGGAG CTAAGATATGGCTCTAACAA	696	Aarestrup <i>et al.</i> (2000)

As condições para a realização da múltipla PCR para detecção dos genes de resistência à Vancomicina foram as mesmas utilizadas na diferenciação das espécies *E. faecium* e *E. faecalis*. Já para a identificação de genes de resistência à Eritromicina e aminoglicosídeos foi utilizado o protocolo de Angot *et al.* (2000), com aumento na temperatura de anelamento de 47°C para 52°C, no qual consistia de 35 ciclos de 94°C por 5 min, 94°C por 30 seg, 52°C por 45 seg, 72°C por 1 min e uma extensão final de 72°C por 10 min. A detecção de genes de resistência à Tetraciclina foi efetuada segundo Rahman *et al.* (2008), que era composto de 30 ciclos de 94°C por 1 min, 56°C por 30 seg, 72°C por 1 min e uma extensão final de 72°C por 5 min.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Isolamento bacteriano em amostras de frango resfriado e congelado comercializados no Distrito Federal**

Das 100 amostras analisadas de carcaças de frango, comercializadas no Distrito Federal, 50 (50%) foram positivas para a pesquisa de *Enterococcus* spp, sendo 29 (58%) de carcaças de frango resfriadas e 21 (42%) de carcaças de frango congeladas. Vale ressaltar que este trabalho foi o primeiro a ser realizado na região do Distrito Federal para a pesquisa de cepas de *Enterococcus* spp isoladas de carcaças de frango resfriadas e congeladas.

Este resultado foi similar ao observado por Fracalanza *et al.* (2007) que verificaram a presença de 56,8% de *Enterococcus* spp em carne de frango comercializada na região do Rio de Janeiro. Porém, com outros produtos, Riboldi *et al.* (2009) relataram a presença de *Enterococcus* spp em 54,6% das amostras de alimentos na região Sul do Brasil, porém os alimentos analisados foram mandioca, beterraba, batata-doce, salsa, repolho, carne crua, leite pasteurizado e produtos lácteos. Leite e Franco (2009) isolaram *Enterococcus* spp em 37% das amostras de coxas de frango resfriadas obtidas diretamente de abatedouros e em supermercados no município do Rio de Janeiro. Foi relatada pela ANVISA no ano de 2008, no

PREBAF (Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango), a presença de *Enterococcus* spp em 98,7% das carcaças de frango congeladas em uma pesquisa efetuada em todo o Brasil, de um total de 542 amostras. Na região de Ancara, Turquia, Kasimoglu-Dogru *et al.* (2010) constataram a presença de 78% de *Enterococcus* spp em pele de pescoço de frangos em abatedouros.

### **Identificação por PCR das espécies *E. faecalis*, *E. faecium* e realização do teste de susceptibilidade antimicrobiana**

Das 50 cepas de *Enterococcus* spp isoladas e analisadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR), foram identificadas pela PCR 21 (42%) cepas de *E. faecalis*, sendo 11 (52,4%) de carcaças congeladas e 10 (47,6%) de carcaças resfriadas; e uma (2%) cepa de *E. faecium* proveniente de carcaça resfriada. As outras 28 (56%) cepas obtiveram resultado negativo na PCR para identificação das espécies anteriormente citadas, sendo consideradas neste trabalho como *Enterococcus* spp, e destas 10 (35,7%) cepas foram isoladas de carcaças congeladas e 18 (64,3%) de carcaças resfriadas. No que se refere à presença destas duas espécies, estes resultados foram similares aos verificados por Fracalanza *et al.* (2007) em que detectaram 85 (50,9%) cepas de *E. faecalis* e cinco (3%) cepas de *E. faecium* em amostras de carne de frango oriundas do Rio de Janeiro. Um estudo efetuado por Gama (2008), na cidade de Porto Alegre, verificou a presença de *Enterococcus* spp em alimentos diversos, de origem vegetal e animal, e em isolados de diferentes processos infecciosos provenientes de unidades hospitalares. Neste estudo foi constatado que a espécie prevalente foi *E. faecalis*, ocorrendo em 80 a 90% de todas as amostras clínicas e dos alimentos analisados, enquanto que *E. faecium* representou cerca de 5 a 15%. Riboldi *et al.* (2009) detectaram 27 (48,21%) cepas de *E. faecalis*, 23 (41%) de *E. faecium* e seis (10,7%) cepas de *Enterococcus* spp isoladas de mandioca, beterraba, batata-doce, salsa, repolho, carne crua na região do Rio de Janeiro. Na pesquisa do PREBAF em amostras de carcaça de frango congeladas, realizada pela ANVISA (2008) foi verificada a presença de 61,4% de *E. faecalis* e 2,2% de *E. faecium* no Brasil. Um estudo efetuado por Aslam *et al.* (2010) em plantas de processamento de carne

bovina na região do Canadá, relatou a presença de 173 (87,03%) cepas de *E. faecalis*, 21 (10,6%) cepas de *E. faecium* e seis (3,06%) cepas de *Enterococcus* spp de outras espécies. Barbosa *et al.* (2009) relataram a presença de 76 (41,75%) cepas de *E. faecalis*, 44 (24,17%) de *E. faecium*, e 61 (33,51%) de *Enterococcus* spp isolados de produtos cárneos fermentados produzidos na região Norte de Portugal. Chan *et al.* (2008) pesquisaram amostras de fezes de frangos e amostras de água provenientes de criação de frangos em Kelantan, Malásia, cujos resultados observados foram também a presença de 47 (47%) cepas de *E. faecalis* e 22 (22%) de *E. faecium*. Contrariamente ao resultados deste trabalho, uma pesquisa realizada na região de Ancara, Turquia, por Kasimoglu-Dogru *et al.* (2010) em pele de pescoço de frango provenientes de abatedouros, relatou que *E. faecium* (48%) foi a espécie mais encontrada, seguida por *Enterococcus durans* (23%) e em menor quantidade (19%) de cepas de *E. faecalis*.

De uma forma geral os resultados observados neste trabalho foram similares aos observados pelos trabalhos realizados em outras regiões do Brasil, bem como os resultados verificados em outros países.

Os resultados do teste de resistência antimicrobiana (Tabela 1) demonstraram que todas as cepas (100%) isoladas de carcaças de frango foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano testado. Com relação à resistência aos antimicrobianos Cefotaxima e Cefalotina, Ammerum *et al.* (2010) e Kasimoglu-Dogru *et al.* (2010) relataram que os *Enterococcus* spp possuem resistência intrínseca a esta classe de antimicrobiano, possivelmente explicando a alta resistência observada neste trabalho. Em consideração à resistência encontrada à Tetraciclina e Eritromicina, o trabalho efetuado por Busani *et al.* (2004) encontrou um resultado similar a este trabalho, em carne de frango na Itália, em que a resistência à Tetraciclina foi presente em 95% dos *E. faecium* e 81% dos *E. faecalis*; diferentemente do encontrado para resistência à Eritromicina, em que 90% dos *E. faecium* e 55% dos *E. faecalis* apresentaram resistência a esse antimicrobiano. Kasimoglu-Dogru *et al.* (2010), em um estudo efetuado na região de Ancara, Turquia, com pele de pescoço de frango, constataram resistência à Tetraciclina em 98% dos *E. faecium* e 100% dos *E. faecalis* e relataram ainda resistência à Eritromicina em 90% dos *E. faecium* e 94% dos *E. faecalis*. O PREBAF efetuado pela ANVISA em 2008, em carcaça de frango congelada na região do Distrito Federal, relatou resistência à Tetraciclina em

91,9% dos *Enterococcus* spp e resistência à Eritromicina em 89,2%, entretanto não foi mencionada a ocorrência em relação ao número de amostras e diferenciação das espécies *E. faecalis* e *E. faecium*. Já no estudo de Fracalanza *et al.* (2007), a presença da resistência à Tetraciclina e Eritromicina foi de 31,2% e 23,8%, respectivamente, em *Enterococcus* spp isolados de carne de frango na região do Rio de Janeiro. Uma pesquisa efetuada na China por Zou *et al.* (2011) demonstrou que a maioria dos *E. faecalis* isolados de suínos foram resistentes à Eritromicina (66.67%). Emaneini *et al.* (2008) relataram que resistência aos macrolídeos, tal como à Eritromicina, é prevalente entre os Enterococos.

**Tabela 1** – Teste de resistência antimicrobiana realizados em 50 cepas de *Enterococcus* spp isoladas de carcaças de frango resfriadas e congeladas comercializados no Distrito Federal.

Agente Antimicrobiano	<i>E. faecalis</i> (n=21)			<i>E. faecium</i> (n=1)			<i>Enterococcus</i> spp (n=28)		
	S(%)	I(%)	R(%)	S(%)	I(%)	R(%)	S(%)	I(%)	R(%)
AM	100	0	0	100	0	0	89,28	0	10,71
VAN	42,85	57,14	0	100	0	0	100	0	0
TEC	100	0	0	100	0	0	100	0	0
GEN	85,71	0	14,28	100	0	0	100	0	0
ERI	9,52	9,52	80,95	0	100	0	21,42	42,85	35,71
CIP	38,09	38,09	23,80	0	100	0	28,57	32,14	39,28
ENR	14,28	66,66	19,04	0	100	0	14,28	42,85	42,85
TET	4,76	4,76	90,47	0	0	100	17,85	0	82,14
CLO	33,33	38,09	28,57	100	0	0	85,71	14,28	0
CAZ	0	0	100	0	100	0	0	3,57	96,42
CFL	4,76	42,85	52,38	100	0	0	14,28	42,85	42,85

AM: ampicilina; VAN: vancomicina; TEC: teicoplanina; GEN: gentamicina; ERI: eritromicina; CIP: ciprofloxacina; ENR: enrofloxacin; TET: tetraciclina; CLO: cloranfenicol; CAZ: ceftazidima; CFL: cefalotina. Perfil de resistência: S: suscetível; I: intermediário; R: resistente.

O uso da Tetraciclina na alimentação de frangos foi proibido no Brasil, pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento no ano de 2009 (MAPA, 2009) e com relação aos macrolídeos, a Tilosina e a Espiramicina são aceitas como

promotores de crescimento podendo causar resistência cruzada com a Eritromicina (MAPA, 2008). De acordo com Zou *et al.* (2011), alto nível de resistência à Eritromicina provavelmente está relacionado com a ampla utilização dessa classe de antimicrobiano em criação de animais, principalmente o uso generalizado da Tilosina como promotor de crescimento e no tratamento de doenças. Segundo Busani *et al.* (2004), Kaszanyitzky *et al.* (2007) e Zou *et al.* (2011) a resistência à Eritromicina e Tetraciclina induzidas pela terapia em animais é difícil de avaliar pois tem sido utilizados na terapia humana e animal ao longo de décadas e isso se reflete na elevada prevalência de resistência à Eritromicina e Tetraciclina na criação animal.

Em relação à resistência encontrada à Ciprofloxacina, Costa *et al.* (2010) relataram um resultado semelhante em Portugal, no qual 27,5% dos Enterococos isolados do ambiente de criação de frangos foram resistentes à Ciprofloxacina. O PREBAF da ANVISA (2008) relatou resistência a este antimicrobiano em 51,4% *Enterococcus* spp em carcaças de frango congeladas no Distrito Federal. Vale ressaltar que neste estudo, PREBAF, não há menção do número de amostras dessa região. Já Busani *et al.* (2004) relataram que 51% dos *E. faecium* e 10% dos *E. faecalis* foram resistentes à Ciprofloxacina em carne de frango na Itália. O trabalho efetuado por Riboldi *et al.* (2009), em que avaliaram a presença de *Enterococcus* spp. em alimentos (mandioca, beterraba, batata-doce, salsa, repolho, carne crua) na região Sul do Brasil, demonstrou que a resistência à Ciprofloxacina em *E. faecalis* foi de 7,4% e 16,7% em *Enterococcus* spp. Em um estudo efetuado por Aslam *et al.* (2010) no Canadá foi encontrada resistência intermediária à Ciprofloxacina em plantas de processamento de carne bovina. Segundo Klare *et al.* (2003), a maioria das cepas de Enterococos demonstram níveis de resistência e níveis intermediários contra as quinolonas. Essa resistência pode estar relacionada com o uso do Halquinol como promotor de crescimento, que também é uma quinolona, e seu uso é autorizado no Brasil desde 2008 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Com relação à resistência ao Cloranfenicol, Kasimoglu-Dogru *et al.* (2010) encontraram um resultado similar aos observados neste trabalho (28,57%) para *E. faecalis*, isolados de pele de pescoço de frango na Turquia, o qual apresentou 38% de resistência. Neste mesmo estudo encontraram resistência em 53% dos *E. faecium* para este mesmo antimicrobiano. Busani *et al.* (2004) relataram que 15%

dos *E. faecium* e 10% dos *E. faecalis* isolados de frango foram resistentes ao Cloranfenicol. No trabalho realizado por Riboldi *et al.* (2009) a resistência ao Cloranfenicol em amostras de alimentos (mandioca, beterraba, batata-doce, salsa, repolho, carne crua) foi em 7,4% dos *E. faecalis* e em 33,3% dos *Enterococcus* spp; e 7,4% dos *E. faecalis*, 30% dos *E. faecium* e 33,33% dos *Enterococcus* spp apresentaram resistência intermediária a este antimicrobiano. A pesquisa do PREBAF da ANVISA (2008) em carcaças de frango congeladas no Distrito Federal relatou resistência a este antimicrobiano em 48,6% em *Enterococcus* spp e resistência intermediária de 16,2%, entretanto neste estudo não há menção do número de amostras nessa região. Já Fracalanza *et al.* (2007) relataram a presença da resistência ao Cloranfenicol em 4,3% das amostras de carne de frango. É importante salientar que o uso do Cloranfenicol foi banido no Brasil em 2003 (MAPA, 2003) e possivelmente as causas de se verificar ainda a presença da resistência pode ser devido ao uso ilegal deste antimicrobiano e também a possibilidade da resistência se prolongar na população mesmo após a remoção da pressão seletiva, conforme mencionam Kasimoglu-Dogru *et al.* (2010). Esses mesmo autores continuam dizendo que o Cloranfenicol é um dos agentes eficazes contra as infecções de VRE em seres humanos e a disseminação de genes de resistência transferíveis através da cadeia alimentar pode levar a uma elevação na prevalência de resistência em enterococos (KASIMOGLU-DOGRU *et al.*, 2010).

Os resultados encontrados para a resistência à Vancomicina são similares aos observados por Fracalanza *et al.* (2007), em que esses autores verificaram 100% de sensibilidade a este antimicrobiano em amostras de carne de frango e leite em *E. faecalis* e *E. faecium*. Já Riboldi *et al.* (2009) encontraram resistência à Vancomicina em 3,5% dos *E. faecalis* isolados de alimentos (mandioca, beterraba, batata-doce, salsa, repolho, carne crua). Esses mesmos autores relataram resistência intermediária de 7,4% em *E. faecalis*. A pesquisa do PREBAF da ANVISA (2008) relatou resistência em *Enterococcus* spp a este antimicrobiano em 5,4% em carcaças de frango congeladas no Distrito Federal, e resistência intermediária em 11%, entretanto neste mesmo estudo falta detalhamento a respeito da ocorrência de resistência em relação ao número de amostras e diferenciação das espécies *E. faecalis* e *E. faecium* na pesquisa de resistência antimicrobiana no Distrito Federal. Segundo Oliveira *et al.* (2010), existem muitos estudos relatando

níveis intermediários de resistência a esse glicopeptídeo, o que faz da triagem do teste de resistência à Vancomicina ser mantida nas pesquisas por sua importância. Vale salientar que neste estudo, apenas *E. faecalis* apresentou resistência intermediária à Vancomicina.

No que diz respeito à resistência à Ampicilina e Gentamicina, Riboldi *et al.* (2009) relataram a presença de resistência à Ampicilina em isolados de alimentos (mandioca, beterraba, batata-doce, salsa, repolho, carne crua) de 11,1% em cepas de *E. faecalis*; e resistência à Gentamicina de 22,2% de cepas de *E. faecalis* e 13% em *E. faecium*. Já Busani *et al.* (2004) encontraram resistência à Ampicilina em 20% dos *E. faecium* e 22% dos *E. faecalis* em carne de frango; e 10% dos *E. faecium* e 11% dos *E. faecalis* demonstraram resistência à Gentamicina. O PREBAF da ANVISA (2008) relatou que em *Enterococcus* spp foi detectada resistência à Gentamicina em 27% em carcaças de frango congeladas no Distrito Federal e todas as amostras apresentaram sensibilidade à Ampicilina. Ampicilina é um antimicrobiano muito importante utilizado na clínica médica humana, pois se trata de uma droga de escolha no tratamento de infecções causadas por *Enterococcus* spp. Além disso, a combinação de ampicilina e gentamicina são utilizadas como tratamento seletivo de endocardites também causadas por *Enterococcus* spp (RIBOLDI *et al.*, 2009).

Segundo Aarestrup *et al.* (2002) e Fracalanza *et al.* (2007), os *Enterococcus* spp são considerados marcadores de contaminação fecal de alimentos e água para consumo humano e tem sido aceito por várias décadas, que fontes não humanas de *Enterococcus* spp podem contaminar alimentos destinados ao consumo humano. Brtková *et al.* (2011) demonstraram que o trato gastrointestinal dos frangos pode ser um reservatório de *Enterococcus* spp resistentes a Tetraciclina e Eritromicina e podem transferir estes genes para humanos através da cadeia alimentar. De acordo com Biavasco *et al.* (2007) e Agersø *et al.* (2008), a cadeia alimentar tem sido sugerida como potencial veículo de transmissão de VRE de animais para os humanos. Foulquié Moreno *et al.* (2006) enfatizam o possível papel desempenhado pelos *Enterococcus* spp resistentes aos antimicrobianos, principalmente os resistentes à Vancomicina, como sendo os alimentos um reservatório natural na disseminação de traços de resistência a antimicrobianos no ambiente. Logo, a presença destes microrganismos nos alimentos pode carrear ao homem potenciais

fatores de virulência que podem comprometer a saúde humana. Segundo Vignaroli *et al.* (2011) os *Enterococcus* spp resistentes a antimicrobianos isolados de animais de criação e de produtos cárneos podem transferir seus genes de resistência, localizados em elementos genéticos móveis para os *Enterococcus* spp humanos. Cauwerts *et al.* (2007) concluíram que o uso de Tetraciclina em frangos pode co-selecionar resistência aos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas, que podem ser uma importante alternativa na terapia de infecções de enterococos em humanos. Segundo este mesmo autor a presença de genes de resistência antimicrobiana em *Enterococcus* spp, principalmente aqueles em elementos móveis, é considerada como um perigo para a saúde de animais e humanos. E *Enterococcus* spp isolados de aves carregando genes de resistência antimicrobiana podem não apenas transferir estes genes para outros microrganismos, possivelmente patogênicos, mas podem representar um perigo à saúde humana no caso de transferência desses genes para bactérias zoonóticas. Além disso, esses *Enterococcus* spp podem ser transferidos, direta ou indiretamente, para o homem, onde eles podem ser capazes de causar doenças ou dispersar mais seus genes de resistência antimicrobiana entre comunidade bacteriana gastrointestinal.

Vale salientar que o uso indiscriminado de antibióticos humanos foi proibido no Brasil no ano de 2010 pela ANVISA com o objetivo de contribuir para a redução da resistência bacteriana na comunidade.

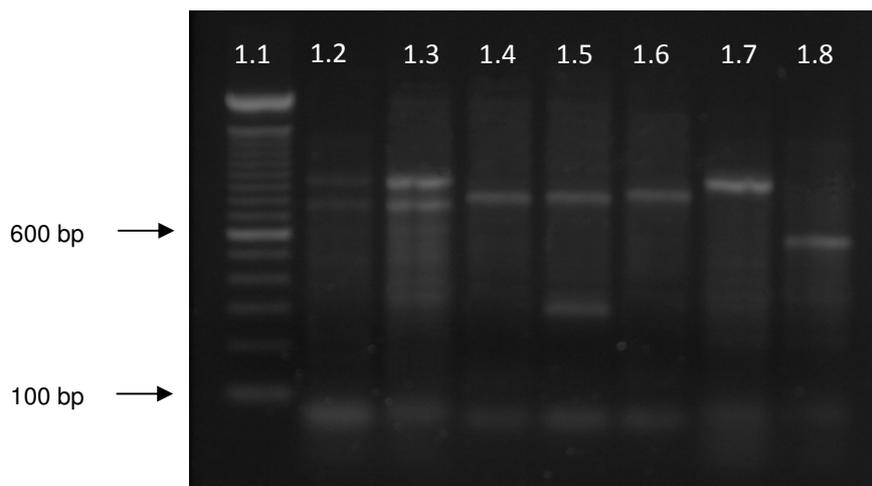
Maiores estudos devem ser realizados para se verificar a real origem da presença de resistência antimicrobiana em carcaças de frango resfriadas e congeladas.

## Detecção de genes de resistência antimicrobiana

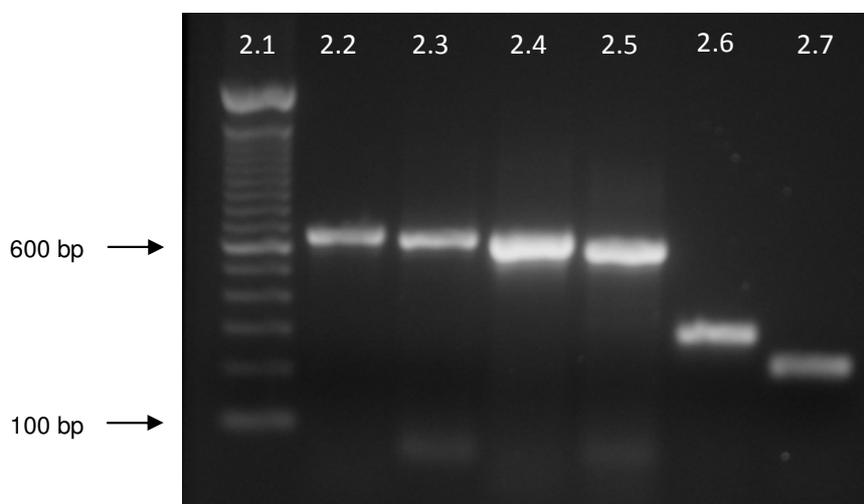
Os resultados da detecção dos genes de resistência antimicrobiana estão dispostos na Tabela 2 (Figuras 1 e 2).

**Tabela 2** – Resultado da PCR para detecção dos genes de resistência das cepas de *E. faecalis*, *E. faecium* e *Enterococcus* spp isoladas de carcaças de frango resfriadas e congeladas.

Espécie (n)	Gene	Número de cepas positivas (%)
<i>E. faecalis</i> (21)	<i>tet(M)</i>	17 (81%)
	<i>erm(B)</i>	16 (76,2%)
	<i>aph(3')-IIIa</i>	9 (42,9%)
	<i>vanC-1</i>	8 (38%)
	<i>ant(6)-Ia</i>	8 (38%)
	<i>vanA</i>	4 (19%)
	<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>	3 (14,3%)
<i>E. faecium</i> (1)	<i>tet(M)</i>	1 (100%)
<i>Enterococcus</i> spp (28)	<i>tet(M)</i>	24 (85,7%)
	<i>vanC-1</i>	15 (53,57%)
	<i>erm(B)</i>	10 (35,71%)
	<i>vanB</i>	7 (25%)
	<i>aph(3')-IIIa</i>	7 (25%)
	<i>ant(6)-Ia</i>	6 (21,42%)
	<i>erm(A)</i>	1 (3,57%)



**Figura 1** – PCR múltipla para identificação das espécies *E. faecalis*, *E. faecium* e detecção dos genes de resistência *vanA*, *vanB*, *vanC-1*. 1.1) Marcador DNA *ladder* 100bp; 1.2 e 1.3) fragmento de 941 bp da espécie *E. faecalis* e fragmento de 732 bp do gene *vanA*; 1.4 e 1.6) fragmento de 822 bp do gene *vanC-1*; 1.5) fragmento de 822 bp do gene *vanC-1* e fragmento de 300 bp do gene *vanB*; 1.7) fragmento de 941 bp da espécie *E. faecalis*; 1.8) fragmento de 550 bp da espécie *E. faecium*. Visualização em gel de agarose a 1,5% com concentração de 5 mg/ml de brometo de etídio.



**Figura 2** – PCR uniplex para identificação dos genes de resistência antimicrobiana *tet(M)*, *erm(A)*, *erm(B)*, *aph(3')-IIIa*, *ant(6)-Ia* e *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*. 2.1) Marcador DNA *ladder* 100bp; 2.2) fragmento de 696 bp do gene *tet (M)*; 2.3) fragmento de 645 bp do gene *erm (A)*; 2.4) fragmento de 639 do gene *erm (B)*; 2.5) fragmento de 597 bp do gene *ant(6)-Ia*; 2.6) fragmento de 292 bp do gene *aph(3')-IIIa*; 2.7) fragmento

de 220 bp do gene *aac(6')-Ie-aph(2'')*-Ia. Visualização em gel de agarose a 1,5% com concentração de 5 mg/ml de brometo de etídio.

No presente estudo 93% dos *Enterococcus* spp resistentes à Tetraciclina apresentaram o gene *tet(M)*. Um estudo feito por Gama (2008) na cidade de Porto Alegre, o qual analisou a presença de *Enterococcus* spp em alimentos diversos de origem vegetal e animal e em cepas isoladas de diferentes processos infecciosos provenientes de unidades hospitalares, relatou que 90% dos *Enterococcus* spp resistentes à Tetraciclina demonstrou possuir o gene *tet(M)*. Uma pesquisa efetuada por Poeta *et al.* (2005) em Portugal, em que se avaliou a resistência antimicrobiana de Enterococos isolados de animais selvagens, relatou que o gene *tet(M)* foi encontrado em todas as cepas isoladas resistentes à Tetraciclina. Agersø *et al.* (2006) na Dinamarca, observaram que o gene *tet(M)* foi detectado em 95% dos *E. faecium* e *E. faecalis* isolados de humanos, suínos e frangos de corte. Fairchild *et al.* (2005) efetuaram um estudo na Geórgia no qual analisaram *Enterococcus* spp isolados de criatórios de frango de corte resistentes à Tetraciclina, e 66,7% dos *Enterococcus* spp isolados dos criatórios possuíam o gene *tet(M)*. López *et al.* (2009) efetuaram um estudo em amostras de origem animal na Espanha e relataram que das 29 cepas isoladas resistentes à Tetraciclina apenas 15 apresentaram o gene *tet(M)*. Na pesquisa de Aslam *et al.* (2010), em uma planta de processamento de carne no Canadá, 52% dos enterococos foram resistentes à Tetraciclina e a maioria destas amostras possuíam o gene *tet(M)*. Brtková *et al.* (2011) encontraram o gene *tet(M)* em 43% das cepas isoladas de *Enterococcus* spp de origem animal e ambiental na Eslováquia.

De acordo com Aarestrup *et al.* (2002), a resistência à Tetraciclina foi notada entre as cepas isoladas de *Enterococcus* spp em animais destinados a alimentação em experimentos, durante a alimentação inicial destes animais em 1950. Kak e Chow (2002) complementam dizendo que a resistência à Tetraciclina está presente em pelo menos 60% a 65% dos isolados clínicos de *Enterococcus* spp, mesmo que esses antimicrobianos não sejam usados rotineiramente no tratamento de infecções causadas por este microrganismo. Segundo Agersø *et al.* (2006), *Enterococcus* spp isolados de animais, humanos e outras fontes são muitas vezes resistentes às Tetraciclinas, e vários genes de resistência a este antimicrobiano têm sido

identificados em *Enterococcus* spp. Este gene está amplamente distribuído e já foi encontrado em 42 gêneros de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Isto é provavelmente devido à associação do gene *tet(M)* com elementos conjugativos. Nos enterococos e em outras espécies, o gene *tet(M)* foi associado com transposons conjugativos relacionados com a família *Tn916/Tn1545*. Um estudo efetuado por Huys *et al.* (2004) na Bélgica em queijos europeus relataram a detecção do gene *tet(M)* em 43 isolados de um total de 187 *Enterococcus* spp. Todos os enterococos contendo esse gene também abrigaram um membro da família dos transposons conjugativos *Tn916-Tn1545*. Segundo Gama (2008) e Cassenego (2010) a resistência à Tetraciclina é um dos fenótipos de resistência adquirida mais presentes em *Enterococcus* spp isolados de alimentos. Esse grupo de antibióticos é muito empregado na agricultura e psicultura, principalmente como promotor de crescimento em países europeus.

Com relação à presença de genes de resistência à Eritromicina, neste estudo, cerca de 85% das amostras resistentes à Eritromicina no antibiograma apresentaram o gene *erm(B)*. Emaneini *et al.* (2008) efetuaram um estudo em *E. faecalis* e *E. faecium* isolados de um hospital no Iran e 41% desses enterococos apresentaram o gene *erm(B)*, 5% demonstraram possuir o gene *erm(A)* e nenhum isolado foi positivo para o gene *erm(C)*. Em um estudo efetuado por Aslam *et al.* (2010) em plantas de processamento de carne no Canadá, o gene *erm(B)* foi encontrado em 50% dos *E. faecium*, já os genes *erm(A)* e *erm(C)* não foram encontrados em nenhum isolado. Segundo esses autores, o alto nível de resistência à Eritromicina verificado nestes isolados provavelmente está associado ao uso indiscriminado desta classe de antimicrobiano na produção animal naquele país, especialmente o uso generalizado de Tilosina como promotor de crescimento e tratamento de doenças. Um estudo em produtos de origem animal efetuado por López *et al.* (2009) na Espanha demonstrou que todos as 12 cepas isoladas de *Enterococcus* spp que apresentaram resistência à Eritromicina foram positivos para os gene *erm(B)*, e cinco isolados apresentaram o gene *erm(A)*. Portillo *et al.* (2000) analisaram 78 cepas de *Enterococcus* spp provenientes de isolados clínicos e de alimentos para a resistência à Eritromicina e encontraram 39, de 40, amostras altamente resistentes à Eritromicina possuindo o gene *erm(B)* sendo destas, 14 cepas de *E. faecalis*, 12 cepas de *E. faecium*, oito cepas de *E. hirae*, duas cepas de

*E. durans*, duas de *E. avium* e uma de *E. gallinarum*. Uma cepa isolada de *E. faecium* foi positivo para o gene *erm(A)* e negativo para os genes *erm(B)* e *erm(C)*. Segundo esses autores, o gene *erm(B)* demonstra estar envolvido com a resistência aos macrolídeos em diferentes bactérias Gram-positivas, como *Enterococcus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus*. Zou *et al.* (2011) efetuaram uma pesquisa em 117 cepas de *E. faecalis* isolados de suínos na China e observaram que 54 cepas apresentaram o gene *erm(B)* e 37 cepas demonstraram possuir o gene *erm(A)*. Um estudo feito na Alemanha por Schwaiger e Bauer (2008), no qual analisaram a presença do gene *erm(A)* em amostras de *E. faecalis* isolados de animais e humanos, tiveram como resultado dois isolados de origem animal e dois de origem humana positivos para o gene *erm(A)*. No Brasil, o uso da Tilosina como promotores de crescimento é aceito desde 2008 (MAPA, 2008) e seu uso indiscriminado pode resultar em resistência a outros macrolídeos.

No que diz respeito à presença de genes de resistência aos aminoglicosídeos neste estudo, todas as amostras resistentes à Gentamicina no teste de susceptibilidade antimicrobiana, apresentaram o gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*. Similarmente, um estudo feito em hospitais no Iran por Emaneini *et al.* (2008) em cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* relataram a presença do gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* em 63% das cepas isoladas, e 37% do gene *aph(3')-IIIa*. Gama (2008) relatou que 100% das amostras resistentes à Gentamicina apresentaram o gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*. Segundo Emaneini *et al.* (2008) a presença destes múltiplos genes de resistência aos aminoglicosídeos, implica que gentamicina não pode ser utilizada para obter sinergismo com um glicopeptídeo ou  $\beta$ -lactâmico para o tratamento de infecções causadas por *Enterococcus* spp. López *et al.* (2009) relataram que das 11 cepas isoladas de *Enterococcus* spp resistentes à estreptomicina, sete foram positivas para o gene *ant(6)-Ia*. Já o gene *aph(3')-IIIa* foi detectado em cinco cepas isoladas, de um total de seis, de *E. gallinarum* resistentes à Canamicina, e uma cepa positiva para o gene *vanC-1* demonstrou alto nível de resistência à Gentamicina no teste de susceptibilidade antimicrobiana e esta apresentou o gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*. Poeta *et al.* (2005), em uma pesquisa em Portugal em animais selvagens, relataram que o gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* foi observado em duas cepas de *E. faecalis* com alto nível de resistência à Gentamicina, e três cepas

demonstraram alta resistência antimicrobiana à Canamicina e também apresentaram o gene *aph(3')-IIIa*. De acordo com um estudo efetuado por Chan *et al.* (2008), o gene *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* foi presente em 40 cepas de *Enterococcus* spp isolados de frangos e de amostras ambientais em Kelantan, Malásia.

Contrariamente aos resultados obtidos neste estudo em relação à presença de genes de resistência à Vancomicina, Xavier *et al.* (2006) em um estudo de isolamento de *Enterococcus* spp de amostras de fezes de frangos, realizado no Distrito Federal, relataram o gene *vanC-1* em 13% das cepas isoladas e nenhuma cepa foi positiva para os genes *vanA* e *vanB*. Li *et al.* (2007) efetuaram uma pesquisa em VRE detectados em um hospital Chinês, no qual o gene *vanA* foi encontrado em uma cepa de *E. faecalis*, o gene *vanB* foi detectado em uma cepa de *E. faecium* e em três cepas de *E. faecalis*, o gene *vanC-1* foi observado em cinco cepas de *E. gallinarum* e uma cepa de *E. flavescens* apresentou o gene *vanC-2*. Biavasco *et al.* (2007) relataram que todos *Enterococcus* spp resistentes à glicopeptídeos, independentemente de suas origens e espécies, podem ser considerados reservatórios de determinantes de resistência e características de virulência. Relataram ainda que o achado de *vanA* em *E. faecalis* em carne sugere um envolvimento de alimentos na propagação de *Enterococcus* spp resistentes à glicopeptídeos para seres humanos. De acordo com Agersø *et al.* (2008), o gene *vanA* é relativamente comum em cepas de *E. faecium* isolados de carnes e animais, enquanto que essa característica de resistência é raramente encontrado em *E. faecalis*, e a maioria dos *E. faecalis* positivos para *vanA* tem sido isolados de pacientes hospitalizados. Esses autores relatam ainda que o gene *vanA*, presente em *E. faecalis* isolado de carne ou de animais, foi encontrado na produção de frangos na Ásia e na Nova Zelândia. Os autores também afirmam que *E. faecalis* resistente à Vancomicina presente em carne de peru pode ser uma fonte de transmissão deste microrganismo resistente à Vancomicina para o intestino saudável de humanos. Essa bactéria no intestino humano pode resultar em infecções em indivíduos que estão passando por tratamento intensivo com agentes antimicrobianos.

De uma forma geral, foram detectados genes de resistência antimicrobiana nas cepas de enterococcus isoladas neste estudo. Riboldi *et al.* (2009) comentam que uma das razões que podem explicar o surgimento da resistência antimicrobiana

em *Enterococcus* spp isolados de alimentos (mandioca, beterraba, batata-doce, salsa, repolho, carne crua) pode estar relacionado ao uso massivo de antibióticos na agricultura. Segundo estes mesmos autores, alguns estudos têm demonstrado que o mesmo gene de resistência foi encontrado em alimentos e pacientes ao mesmo tempo. Ainda relatam que investigações experimentais mostraram que o plasmídeo de resistência *pAM $\beta$ 1* foi transferido entre *E.faecalis*, *E. faecium* e *Lactobacillus reuteri* no trato digestivo de camundongos, e este plasmídeo também foi transferido entre cepas de *L. curvatus* em salsichas fermentadas. Estas observações suportam a hipótese de que enterococos resistentes podem contaminar os alimentos, entrar no trato gastrointestinal humano e colonizar os seres humanos e/ou passar seus genes de resistência para bactérias comensais presentes no trato intestinal humano. Estes seguem sugerindo que o surgimento de enterococos resistentes a antimicrobianos e sua disseminação em alimentos podem criar uma situação de risco para a saúde pública.

## CONCLUSÃO

No presente estudo foram identificadas cepas de *E. faecalis*, *E. faecium* e de *Enterococcus* spp isoladas de carcaças de frango resfriadas e congeladas comercializadas na região do Distrito Federal, sendo o primeiro relato nestes tipos de matrizes nesta região. Foi observado um alto percentual de cepas resistentes aos antimicrobianos testados, principalmente à Ceftazidima, Tetraciclina, Eritromicina e Cefalotina. Também foi encontrada resistência ao Cloranfenicol, um antimicrobiano de uso proibido no Brasil desde 2003. Foi detectada, por meio da PCR, a presença dos genes de resistência antimicrobiana em cepas de *E. faecalis*, *E. faecium* e *Enterococcus* spp. Esta contaminação por esta bactéria, conjuntamente com a frequência de resistência antimicrobiana observadas neste estudo, pode acarretar em sérios problemas para a saúde pública.

## REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F. M. et al. Nonhuman Reservoirs of Enterococci. In. GILMORE, M. S. **The Enterococci – Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance**. Washington, D. C.: ASM PRESS, 2002. Cap.2, p. 55 - 99.

AGERSØ, Y. et al. Identification of Tn5397-like and Tn916-like transposons and diversity of the tetracycline resistance gene *tet(M)* in enterococci from humans, pigs and poultry. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.57, p.832–839, 2006.

AGERSØ, Y. et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* isolates from a Danish patient and two healthy human volunteers are possibly related to isolates from imported turkey meat. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.62, n.4, p.844–845, 2008.

ANGOT, P. et al. Macrolide Resistance Phenotypes and Genotypes in French Clinical Isolates of *Streptococcus pneumoniae*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease**, v.19, p.755–758, 2000.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Relatório do monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em Enterococos e Salmonelas isolados de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil**. Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango – PREBAF. Janeiro/2008.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Novas regras para antibióticos entram em vigor - 26 de novembro de 2010**. Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br).

ASLAM, M. et al. Characterization of antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. recovered from a commercial beef processing plant. **Foodborne Pathogens Disease**, v.7, n.3, p.235– 241, 2010.

BARBOSA, J. et al. **Antibiotic susceptibility of enterococci isolated from traditional fermented meat products**. *Food Microbiology*, v.26, p.527–532, 2009.

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, 2007.

BRTKOVÁ, A. et al. Detection of tetracycline and macrolide resistance determinants in enterococci of animal and environmental origin using multiplex PCR. **Folia Microbiologica**, v.56, n.3, p.236-240, 2011.

BUSANI, L. et al. Antimicrobial susceptibility of vancomycin-susceptible and -resistant enterococci isolated in Italy from raw meat products, farm animals, and human infections. **International Journal of Food Microbiology**, v.97, p.17–22, 2004.

CASAL, M. M. et al. Investigación de las resistências a antimicrobianos en *Enterococcus faecalis*. **Revista Espanola de Quimioterapia**, v.22, n.3, p.117-119, 2009.

CASSENEGO, A. P. V. **Avaliação da colonização e resistência antimicrobiana de Enterococcus sp. isolados de “swabs” cloacais de frango de corte**. 2010. 89f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia agrícola e do ambiente) - Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade do Rio Grande do Sul.

CHAN, Y. Y. Low prevalence of vancomycin- and bifunctional aminoglycoside-resistant enterococci isolated from poultry farms in Malaysia. **International Journal of Food Microbiology**, v.122, p.221–226, 2008.

COSTA, P. M. et al. Changes in antimicrobial resistance among faecal enterococci isolated from growing broilers prophylactically medicated with three commercial antimicrobials. **Preventive Veterinary Medicine**, v.93, p.71-76, 2010.

CAUWERTS, K. et al. High prevalence of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from broilers carrying the *erm(B)* gene. **Avian Pathology**, v. 36, n. 5, p.395–399, 2007.

DUTKA-MALEN, S. et al. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p.24–27, 1995.

EMANEINI, M. et al. Characterization of Glycopeptides, Aminoglycosides and Macrolide resistance among *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* isolates from hospitals in Tehran. **Polish Journal of Microbiology**, v.57, n.2, p.173–178, 2008.

FACKLAM, R. R. et al. History, Taxonomy, Biochemical Characteristics, and Antibiotic Susceptibility Testing of Enterococci. In. GILMORE, M. S. **The**

**Enterococci – Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance.**

Washington, D. C.: ASM PRESS, 2002. Cap. 1, p.1-54.

FAIRCHILD, A.S. et al. Effects of orally administered tetracycline on the intestinal community structure of chickens and on *tet* determinant carriage by commensal bacteria and *Campylobacter jejuni*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.10, p.5865–5872, 2005.

FOULQUIÉ MORENO, M.R. et al. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, p.1-24, 2006.

FRACALANZZA, S. A. P et al. Antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from poultry meat and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.102, n.7, p.853-859, 2007.

GAMA, B. A. **Análise da resistência antimicrobiana e de genes de virulência de *Enterococcus* spp.** 2008. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brasil.

HAMMERUM, A. M. et al. Antimicrobial-Resistant Enterococci in Animals and Meat: A Human Health Hazard? **Foodborne Pathogens And Disease**, v.7, n.10, p.1137–1143, 2010.

HUYS, G. et al. Prevalence and Molecular Characterization of Tetracycline Resistance in *Enterococcus* Isolates from Food. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.3, p.1555–1562, 2004.

KAK, V.; CHOW, J. W. Acquired Antibiotic Resistances in Enterococci. In: GILMORE, M. S. **The Enterococci – Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance**. Washington, D. C.: ASM PRESS, 2002. .Cap. 9, p.355 - 383.

KASIMOGLU-DOGRU, A. et al. Prevalence and antibiotic resistance profiles of *Enterococcus* species in chicken at slaughter level; absence of *vanA* and *vanB* genes in *E. faecalis* and *E. faecium*. **Research in Veterinary Science**, v.89, p.153–158, 2010.

KASZANYITZKY, É. J. et al. Antimicrobial susceptibility of enterococci strains isolated from slaughtered animals on the data of Hungarian resistance monitoring system from 2001 to 2004. **International Journal of Food Microbiology**, v.115, p.119–123, 2007.

KLARE, I. et al. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. **International Journal of Food Microbiology**, v.88, p.269–290, 2003.

LEENER, E. et al. Distribution of the *erm(B)* Gene, Tetracycline Resistance Genes, and Tn1545-like Transposons in Macrolide- and Lincosamide-Resistant Enterococci from Pigs and Humans. **Microbial Drug Resistance**, v.10, n.4, p.341–345, 2004.

LEITE, A. M. O.de; FRANCO, R. M. Enumeração e identificação bioquímica de *Enterococcus* spp em carne de frango comercializada no Rio de Janeiro. **Revista Higiene Alimentar**, v.22, n.176 – 177, p.155–159, 2009.

LI, S. et al. Vancomycin-Resistant Enterococci in a Chinese Hospital. **Current Microbiology**, v.55, p.125–127, 2007.

LOPES, M. F. S. et al. Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci. **International Journal of Food Microbiology**, v.103, p.191–198, 2005.

LÓPEZ, M. et al. Detection of *vanA* and *vanB2*-containing enterococci from food samples in Spain, including *Enterococcus faecium* strains of CC17 and the new singleton ST425. **International Journal of Food Microbiology**, v.133, p.172–178, 2009.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa 09, 27/06/2003**. Disponível em: [www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br).

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Tabela de aditivos antimicrobianos, anticoccidianos e agonistas com uso autorizado na Alimentação animal** – Atualizado em 03/12/2008 - Divisão de Aditivos/CPAA/DFIP/SDA. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/aditivos-autorizados>.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 26, 9/07/2009**. Disponível em: [www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br).

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**; Approved Standard—Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

OLIVEIRA, M. et al. Antimicrobial resistance and in vitro biofilm-forming ability of enterococci from intensive and extensive farming broilers. **Poultry Science**, v.89, p.1065–1069, 2010.

POETA, P. et al. Characterization of Antibiotic Resistance Genes and Virulence Factors in Faecal Enterococci of Wild Animals in Portugal. **Journal of Veterinary Medicine B, Infectious Disease and Veterinary Public Health**, v.52, n.9, p.396–402, 2005.

PORTILLO, A. et al. Macrolide Resistance Genes in *Enterococcus* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.44, n.4, p.967–971, 2000.

RAHMAN, M. H. et al. Occurrence of Two Genotypes of Tetracycline (TC) Resistance Gene tet(M) in the TC-Resistant Bacteria in Marine Sediments of Japan. **Environmental Science & Technology**, v.42, p.5055–5061, 2008.

RIBOLDI, G. P. et al. Antimicrobial resistance profile of *Enterococcus* spp isolated from food in Southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p.125–128, 2009.

RIZZOTTI, L. et al. Molecular diversity and transferability of the tetracycline resistance gene tet(M), carried on *Tn916-1545* family transposons, in enterococci from a total food chain. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.96, p.43–52, 2009.

SCHWAIGER, K.; BAUER, J. Detection of the Erythromycin rRNA Methylase Gene *erm(A)* in *Enterococcus faecalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, n.8, p.2994–2995, 2008.

TITZE-DE-ALMEIDA, R. et al. Molecular Epidemiology and Antimicrobial Susceptibility of Enterococci Recovered from Brazilian Intensive Care Units. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.8, n.3, p.197–205, 2004.

UBABEF – União Brasileira de Avicultura. Relatório anual 2010/2011. Disponível em: <http://www.abef.com.br/ubabef/exibenoticiaubabef.php?notcodigo=2761>.

VAN DEN BOGAARD, A. E. et al. Antibiotic resistance of fecal enterococci in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.49, p.497–505, 2002.

VIGNAROLI, C. et al. 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, p.1438–1447, 2011.

XAVIER, D. B. **Prevalência e variabilidade genética de Enterococos com resistência à vancomicina isolados de frangos caipiras de regiões do Distrito Federal**. 2007. 33f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília.

WANG, Z. et al. Investigation of the prevalence of patients co-colonized or infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin resistant enterococci in China: a hospital-based study. **Chinese Medical Journal**; v.122, n.11, p.1283-1288, 2009.

WERNER, G. et al. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. **Eurosurveillance**, v.13, n.47, p.1–11, 2008.

ZANELLA, R. C. et al. Phenotypic and genotypic characterization of VanA enterococcus isolated during the first nosocomial outbreak in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v.9, p.283-291, 2003.

ZOU, L.-K. et al. Erythromycin resistance and virulence genes in *Enterococcus faecalis* from swine in China. **New Microbiologica**, v.34, p.73-80, 2011.

## CAPÍTULO III

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho demonstrou a presença de *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* e *Enterococcus* spp em carcaças de frango comercializadas no Distrito Federal através de métodos de isolamento microbiológico e moleculares (PCR). Identificamos também resistência antimicrobiana, bem como os genes de resistência a diversos antibióticos nas cepas isoladas. Este resultado mostra o possível risco de contaminação entre os animais e entre os humanos através da ingestão de alimentos contaminados e/ou do contato direto dos criadores de animais, sendo importante citar também o alto índice de infecções hospitalares por esta bactéria.

A alta resistência antimicrobiana provavelmente se deve ao aumento de bactérias multirresistentes em nível mundial, principalmente pelo uso indiscriminado destas drogas no tratamento de infecções humanas e animais e pelo uso de antimicrobianos como promotores de crescimento e na profilaxia de doenças.

Embora o presente estudo apresente o isolamento de *Enterococcus* spp com alto índice de resistência antimicrobiana são necessários estudos mais aprofundados para se ter a real dimensão da disseminação deste microrganismo e de seus genes de resistência antimicrobiana.