PEDRO HENRIQUE NOGUEIRA DE LIMA FILSNER

Isolamento e caracterização de *Enterococcus faecalis* resistentes a vancomicina ou a altas concentrações de aminoglicosídeos provenientes de suínos no Brasil

São Paulo

2013

PEDRO HENRIQUE NOGUEIRA DE LIMA FILSNER

Isolamento e caracterização de *Enterococcus faecalis* resistentes a vancomicina ou a altas concentrações de aminoglicosídeos provenientes de suínos no Brasil

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Profa. Dra. Andrea Micke Moreno

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2917
FMVZ

Filsner, Pedro Henrique Nogueira de Lima
Isolamento e caracterização de *Enterococcus faecalis* resistentes a vancomicina ou a
altas concentrações de aminoglicosídeos provenientes de suínos no Brasil / Pedro Henrique
Nogueira de Lima Filsner. -- 2013.
40 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Andrea Micke Moreno.

1. Suínos. 2. *Enterococcus*. 3. Aminoglicosídeos. 4. PFGE. 5. CIM. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Comparação entre os perfis plasmidiais de cepas de *Escherichia coli* isoladas do ciclo de produção suína carregando genes de resistência a cefalosporinas e quinolonas", protocolado sob o nº 2572/2012, utilizando 100 (cem) suínos, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Andrea Micke Moreno, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 15/2/2012.

We certify that the Research "Plasmidial profile comparison in *Escherichia coli* strains isolated from commercial swine sources harboring resistance genes to cephalosporins and quinolones", protocol number 2572/2012, utilizing 100 (one hundred) pigs, under the responsibility Profa. Dra. Andrea Micke Moreno, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 2/15/2012.

São Paulo, 16 de fevereiro de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: FILSNER, Pedro Henrique Nogueira de Lima

Título: **Isolamento e caracterização de *Enterococcus faecalis* resistentes a vancomicina ou a altas concentrações de aminoglicosídeos provenientes de suínos no Brasil**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição:: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição:: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição:: _____ Julgamento: _____

*Aos meus amados pais,
pelo carinho, confiança e
dedicação.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e minha querida avó Ilda, pessoas valorosas, que com luta, dedicação e carinho tornaram esta etapa da minha vida possível.

À Iris Carreiro, pelo apoio irrestrito e pelos momentos que compartilhamos.

À Prof. Dra. Andrea Micke Moreno, à confiança depositada em mim, aceitando que fizesse parte da equipe do Laboratório de Sanidade Suína e Virologia. Por toda sua atenção e, sobretudo, o empenho estando sempre disposta a ajudar, não só a mim, mas todos seus orientados.

A todos os amigos e colegas que fiz no Laboratório de Sanidade Suína e Virologia: Ana Paula Santos da Silva, Vasco Túlio de Moura Gomes, Cleise Ribeiro Gomes, Cristina Roman Amigo, Débora Gobbi, Alexandre Sanches, Marina Moreno, Thaís Ferreira, Jucélia, Maria José, Rosi, Maria Garcia Spindola, Carlos Cabrera, Ketrin Silva, Givago Faria, Barbara Costa, Fabiana Miraglia, Luiza Zanolli Moreno, Mirela Oliveira e Maria Gabriela Xavier Oliveira .

Aos funcionários Sandra, Cristina, Virgínea e Danival

À CAPES, pela bolsa que possibilitou o desenvolvimento desse trabalho.

Aos funcionários e proprietários responsáveis pelos locais de coleta.

A todos os professores, pós-graduandos e funcionários do Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal.

"O mais profundo dos desejos por conhecimento é o desejo de conhecer o propósito do mundo e de nós mesmos." (G.K. Chesterton)

RESUMO

FILSNER, P. H. N. L. **Isolamento e caracterização de *Enterococcus faecalis* resistentes a vancomicina ou a altas concentrações de aminoglicosídeos provenientes de suínos no Brasil.** [Isolation and characterization of *Enterococcus faecalis* resistant to vancomycin or high concentrations of aminoglycosides from pigs in Brazil]. 2014. 40 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Agentes causadores de infecções urinárias, endocardites, meningites e septicemias os membros do gênero *Enterococcus* ganharam grande importância epidemiológica nos últimos anos, já que possuem resistência, tanto intrínseca quanto adquirida, a uma ampla gama de antibióticos. Entre as trinta e seis espécies descritas atualmente, duas recebem maior destaque, *E. faecalis* e *E. faecium* devido à alta frequência de multirresistência a antimicrobianos e a sua maior participação nos casos de infecções humanas. Vários estudos tem associado o uso de facilitadores de crescimento em animais de produção com o aumento da frequência de multirresistência em várias espécies de *Enterococcus*. Diante do exposto, no presente estudo foram avaliadas 245 cepas de *Enterococcus faecalis* isoladas de 171 suínos comerciais quanto ao perfil de resistência a antimicrobianos através da determinação da concentração inibitória mínima e quanto ao perfil genotípico através da eletroforese em campo pulsado. As maiores taxas de resistência observadas foram contra a tilosina (98,7%) e lincomicina (98,7%), seguidas pela tetraciclina (97,1%), eritromicina (96,7%), estreptomicina (96,3%), combinação quinupristina-dalfopristina (95,5%), kanamicina (93,8%), gentamicina (85,3%), ciprofloxacina (76,7%) e cloranfenicol (71,8%). Não foram identificadas cepas resistentes a vancomicina e a taxa de resistência a princípios como daptomicina (0,4%), nitrofurantoína (1,2%) e tigeciclina (1,6%) foi baixa. Através da eletroforese em campo pulsado as cepas foram agrupadas em 109 pulsotipos, não havendo grupamentos diretamente relacionados ao perfil de resistência. As cepas foram agrupadas em maior frequência, de acordo com o animal e a granja de origem. No Brasil, o uso de avoparcina em suinocultura não foi muito intensivo, o que provavelmente não contribuiu para a seleção de cepas resistentes a vancomicina, no entanto, a resistência a altos níveis de gentamicina e estreptomicina é alarmante, e devido à importância destes antimicrobianos no tratamento das infecções humanas por *Enterococcus*, estes níveis de resistência deveriam ser monitorados em isolados de origem animal e ambiental.

Palavras-chave: Suínos. *Enterococcus*. Aminoglicosídeos. PFGE. CIM

ABSTRACT

FILSNER, P. H. N. L. **Isolation and characterization of *Enterococcus faecalis* resistant to vancomycin or high concentrations of aminoglycosides from pigs in Brazil.** [Isolamento e caracterização de *Enterococcus faecalis* resistentes a vancomicina ou a altas concentrações de aminoglicosídeos provenientes de suínos no Brasil]. 2014. 40 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Causative agents of urinary tract infections, endocarditis, meningitis and septicemia members of the genus *Enterococcus* gained great epidemiological importance in the last years, due to resistance, both intrinsic and acquired a wide range of antibiotics. Among the thirty-six species currently described two receive greater emphasis, *E. faecalis* and *E. faecium* due to the high frequency of multidrug resistance to antimicrobial agents and their greater involvement in cases of human infections. Several studies have associated the use of growth promoters in production animals to increase the frequency of multidrug resistance in various species of *Enterococci*. On the exposed, in the present study, 245 strains of *E. faecalis* isolated from 171 commercial pigs were evaluated for the antimicrobial resistance profile by determining the minimum inhibitory concentration and for the genotypic profile by pulsed field gel electrophoresis. The highest resistance rates were observed against tylosin (98.7 %) and lincomycin (98.7 %), followed by tetracycline (97.1 %), erythromycin (96.7%), streptomycin (96.3%), a combination quinupristin - dalbapristin (95.5 %), kanamycin (93.8 %), gentamicin (85.3 %), ciprofloxacin (76.7 %) and chloramphenicol (71.8%). Strains resistant to vancomycin were not found, and the rate of resistance to daptomycin (0.4 %), nitrofurantoin (1.2%) and tigecycline (1.6%) was low. By pulsed field gel electrophoresis the strains were grouped into 109 pulsotypes, with no groups directly related to the resistance profile. The strains were grouped into higher frequency, according to the animal and farm of origin. In Brazil, the use of avoparcin in swine production was not very intensive, which probably contribute to the low selection of vancomycin-resistant strains, however, resistance to high levels of gentamicin and streptomycin is alarming, and because of the importance of these antimicrobials in treatment of human infections caused by *Enterococcus*, these resistance levels should be monitored in isolates of animal and environmental origin.

Key words: Swine. *Enterococcus*. Aminoglycosides. PFGE. MIC

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3	JUSTIFICATIVA.....	20
4	OBJETIVOS.....	21
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	22
5.1	MATERIAL.....	22
5.2	ISOLAMENTO BACTERIANO.....	22
5.3	EXTRAÇÃO DE DNA E REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE.....	23
5.4	PERFIL DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS.....	24
5.5	MICRO DILUIÇÃO EM PLACA.....	24
5.6	ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO (PFGE).....	25
5.7	DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DESCRIMINATORIO (ID).....	25
5.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS.....	26
6	RESULTADOS.....	27
7	DISCUSSÃO.....	33
8	CONCLUSÕES.....	38
	REFERENCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Enterococcus* são conhecidas há mais de um século por seu papel como causa de endocardite em seres humanos, um quadro fatal, se não for tratado com antimicrobianos eficazes. *Enterococcus* são cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos que formam cadeias de vários tamanhos, são robustos e versáteis, com habilidade de sobreviver sob condições severas (incluindo altas concentrações de NaCL) e em uma ampla gama de temperaturas (de 10°C a >45°C). A primeira descrição de infecção por *Enterococcus* data de 1899, e subsequentemente o agente foi descrito em uma variedade de quadros infecciosos, incluindo infecções pélvicas, neonatais, do trato urinário, pneumonias, assim como nas endocardites. Apesar de seu potencial patogênico, os membros do gênero *Enterococcus* geralmente apresentam um baixo potencial de virulência, o que é evidenciado pela sua presença como colonizadores naturais do trato gastro-intestinal da maioria dos seres humanos e animais e pelo fato de estes agentes serem utilizados de forma segura há décadas como probióticos em humanos e animais de produção ou companhia (ARIAS; MURRAY, 2012).

Fatores relacionados ao microrganismo e aos hospedeiros devem ter contribuído para que um patógeno de segunda classe se transformasse em um problema clínico de primeira grandeza. No caso do gênero *Enterococcus* estes fatores parecem incluir sua resistência intrínseca a alguns antimicrobianos, sua capacidade de adquirir e disseminar genes de resistência a antimicrobianos, e seu genoma maleável, que pode contribuir para sua adaptação a ambientes inóspitos (incluindo hospitais) e ao aumento da habilidade de certas linhagens em colonizar o trato gastro-intestinal e se disseminar no intestino. Além disso, o crescimento no número de pessoas internadas em unidades de terapia intensiva, imunossuprimidas, mecanicamente comprometidas (usando cateteres, respiradores e etc), e recebendo múltiplos antimicrobianos, favorece a habilidade de agentes multirresistentes como os *Enterococcus* em causar doença (ARIAS; MURRAY, 2012).

As diferentes espécies do gênero *Enterococcus* são frequentemente associadas ao trato gastro-intestinal de mamíferos e aves, mas estão presentes também em água e vegetais, e podem ser encontradas com frequência em alimentos de origem animal como leite e carne, através da contaminação cruzada a partir de conteúdo intestinal

ou ambiente contaminado. As cepas de *Enterococcus* carreando genes de virulência e capazes de transferir genes de resistência a antimicrobianos, antes isoladas apenas em ambientes hospitalares, hoje são descritas colonizando intestino de animais de produção e isoladas de alimentos de origem animal (SPARO et al., 2012).

Considerando-se a sua importância em saúde pública, dentre as 36 espécies descritas, observa-se que *E. faecalis* é a espécie mais frequente em infecções hospitalares, *E. faecium* tem apresentado resistência ao maior número de antimicrobianos, e as espécies *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. gallinarum* e *E. raffinosus* já foram isoladas de pacientes com infecção pelo agente (BYAPPANAHALLI et al., 2012; CASTILLO-ROJAS et al., 2013).

2 REVISÃO DE LITERATURA

Organismos pertencentes ao gênero *Enterococcus* são anaeróbios facultativos, Gram-positivos, não esporulados com formato, geralmente, oval, organizados em pequenas cadeias, pares ou células individualizadas (MURRAY, 1990). Os membros do gênero *Enterococcus* são catalase negativos, crescem em 6,5% de NaCl, 40% de sais de bile, e 0,1% de azul de metileno e em pH 9,6 e resistem por 30 minutos a 60°C. Estes critérios são descritos para diferenciar *Enterococcus* spp. de *Streptococcus* spp. Ambos os gêneros já foram claramente distintos através de hibridização DNA-DNA e DNA-rRNA e sequenciamento do 16S RNA. Quando cultivados em Agar sangue de carneiro produzem, usualmente, alfa-hemólise, gama-hemólise e beta hemólise, com menor frequência (MURRAY, 1990; MANERO; BLANCH, 1999).

Métodos bioquímicos clássicos podem ser utilizados para diferenciar as espécies dentro desse gênero. Manero e Blanch (1999) descrevem doze provas bioquímicas chaves para diferenciação de diversas espécies do gênero, no entanto, desde a realização do referido estudo as espécies descritas no gênero passaram de dezenove para trinta e seis (BYAPPANAHALLI et al., 2012). Levando em consideração a ampla gama de espécies recentemente descritas as técnicas moleculares tem ganhado cada vez mais importância na identificação e discriminação do agente. Destaca-se nesta área reação em cadeia pela polimerase para sob a forma de multiplex, o sequenciamento do gene 16S rDNA, e até mais recentemente o sequenciamento do genoma completo através das técnicas de sequenciamento de nova geração (HASMAN et al., 2013).

A discriminação de linhagens e perfis genotípicos dentre isolados de mesma espécie tem sido realizada há muitos anos no intuito de caracterizar a disseminação cepas clonais de *Enterococcus* carreando genes de resistência a antimicrobianos em surtos de infecções hospitalares e posteriormente em estudos envolvendo isolados de origem animal, de alimentos, água e outros ambientes. As técnicas utilizadas para este fim incluem ribotipagem, sequências palindrômicas extragênicas repetidas (REP-PCR), eletroforese em campo pulsado (PFGE), tipagem por sequenciamento de múltiplos loci (MLST) (BYAPPANAHALLI et al., 2012).

Resistência a antimicrobianos

O crescimento da prevalência de infecções em humanos é, entre outros fatores, reflexo da capacidade dos *Enterococcus* de escaparem da ação dos antimicrobianos frequentemente utilizados. A resistência a antimicrobianos neste gênero ocorre de forma intrínseca, universalmente disseminada no genoma das espécies, ou adquirida, através da aquisição de novos elementos genéticos ou através de mutações esporádicas nos genes intrínsecos (BYAPPANAHALLI et al., 2012).

Resistência a glicopeptídeos

Em 1988 as primeiras cepas de *Enterococcus* resistentes aos glicopeptídeos foram identificadas, e por mais de duas décadas, discussões à respeito se repetem. Atualmente são conhecidos dois mecanismos intrínsecos de resistência e seis mecanismos adquiridos (KLARE et al., 2003)

O mecanismo de ação desse grupo de antibióticos consiste na inibição da síntese do peptídeoglicano em sua última fase. A transglicosilação e transpeptidação das unidades de pentapeptídeos (d-alanil-d-alanina). Os genótipos de *Enterococcus* resistentes aos glicopeptídeos recebem classificações baseando-se neste princípio. Agrupados de acordo com a atividade de suas ligases *D-lac* e *D-ser* podemos separar os enterococcus em dois grupos genotípicos: de grande resistência - *VanA*, *VanB*, *VanD*, *VanM*, ou seja, concentração inibitória mínima (CIM) >256 µg/ml, e de baixa resistência - *VanC*, *VanE*, *VanG*, *VanL* e *VanN*, com MIC variando de 8-16 µg/ml. Entre todos os genótipos de resistência a glicopeptídeos o *VanA* é o mais importante do ponto de vista clínico e juntamente com *VanB* são os mais prevalentes em infecções humanas (HOLLENBECK; RICE, 2012).

Resistência a β - lactâmicos

A formação da parede celular depende da ligação cruzada das cadeias peptídicas acopladas ao arcabouço do peptidoglicano. Essa, por sua vez, depende de enzimas denominadas proteínas de ligação a penicilina (PBP). Os β - lactâmicos com suas estruturas análogas aos precursores do peptidoglicano se acoplam às proteínas de ligação da penicilina, o que compromete a formação da parede celular. Os *Enterococcus* expressam proteínas de baixa afinidade que ligam a antimicrobianos β - lactâmicos fracamente. Como resultado os valores de MIC para penicilinas são tipicamente 2-8 $\mu\text{g/ml}$ para *E. faecalis* e 8–16 $\mu\text{g/ml}$ para *E. faecium*. Ou seja, muito superiores que os observados para *Streptococcus* spp. e outros microrganismos Gram-positivos que não possuem os genes de PBP em seu cromossomo (HOLLENBECK; RICE, 2012).

Resistência a aminoglicosídeos

Enterococcus são considerados resistentes a essa classe de antibióticos quando apresentam valores de concentração inibitória mínima (CIM) maior ou igual a 500 $\mu\text{g/ml}$ para gentamicina ou maior ou igual a 2000 $\mu\text{g/ml}$ para estreptomicina. Esta resistência é preponderante para clínica médica, já que impede o uso desses antibióticos com efeito sinérgico. A emergência de *E. faecalis* e *E. faecium* resistentes a estas drogas foi notada pela primeira vez por Mederski-Samoraj et al. (1983).

A resistência à gentamicina é originada intrinsecamente por sua incapacidade ultrapassar a barreira da parede celular, porém este nível de resistência é baixo, se comparado ao adquirido por elementos genéticos moveis, entre eles os genes *aph(2'')-Ic*, *aph(2'')Id*, *aph(2'')Ib* e *aph(2'')-Ia-aac(6')-1e*, sendo este último com maior importância. Igualmente, a resistência genética adquirida à estreptomicina pode ocorrer. Uma única alteração ribossomal pode elevar os valores de MIC a 128,000 $\mu\text{g/ml}$, alterações enzimáticas também são registradas, sendo as mais descritas correspondem as adenil-transferases, *Ant(6')-Ia* e *Ant(3'')e-Ia*, nas quais o valor de MIC varia de 4,000 à 16,000 $\mu\text{g/ml}$ (HOLLENBECK; RICE, 2012).

Resistência a estreptograminas

A combinação quinupristina-dalfopristina é uma das aprovadas pelo FDA (Food and Drug Administration- EUA) para o tratamento de infecções causadas por *E. faecium* resistente a vancomicina, uma vez que *E. faecalis* apresentam resistência intrínseca a estreptograminas. A maioria dos genes que conferem resistência transferível a estes princípios tem sido isolados a partir de cepas de *E. faecium*. Existem três mecanismos pelos quais os elementos genéticos adquiridos causam resistência estreptograminas: acetilação do antimicrobiano, efluxo do antimicrobiano, e dimetilação do local alvo no 23S rRNA. Até o momento doze genes de resistência a estreptograminas foram descritos em enterococos. O uso generalizado de virginamicina, uma estreptogramina de uso veterinário, foi associada a ampla resistência em *Enterococcus* isolados de animais de produção e de esgoto agrícola, consequentemente a resistência a quinupristin-dalfopristina é mais comum em isolados de origem ambiental e animal, embora esteja crescendo também em ambientes hospitalares (HOLLENBECK; RICE, 2012).

Resistência a linezolida

Linezolida é um antimicrobiano da classe oxazolidinona, inteiramente sintético, atuando no início do processo da síntese proteica, uma vez que não permite a formação do complexo 70S (essencial no processo de transcrição). A resistência a este antimicrobiano ainda não é comum, pois necessita da ocorrência de mutações pontuais nos genes codificador do 23S rRNA e os *Enterococcus* possuem várias cópias deste gene, sendo que a mutação em apenas uma das cópias mascara a resistência. Nos isolados clínicos, uma mutação em uma cópia do gene de 23S rRNA de *E. faecium* levaria a valores de MIC de 8-16 µg/ml. A mesma mutação em três cópias do gene confere valores de MIC entre 64-128 µg/ml. Em 2006, um gene transferível que codifica um rRNA metiltransferase que modifica a adenosina na região de ligação da linezolida e estreptograminas, no 23S rRNA, foi identificada em *S. aureus*. Este gene já foi descrito em *E. faecalis* de origem animal

e em *E. faecallis* e *E. faecium* de origem human, no entanto cepas resistentes a este antimicrobiano são bastante raras (HOLLENBECK; RICE, 2012).

Resistência a daptomicina

Daptomicina é uma lipoproteína com atividade bactericida contra *Enterococcus*. A epidemiologia da resistência a daptomicina em *Enterococcus*, cujo ponto de corte é definido como MIC > 4 µg/mL foi recentemente avaliada por Kelesidis et al. (2011). Taxas de resistência a este princípio no referido estudo foram de 0,6%, ou seja, 111 cepas resistentes em 17.084 isolados de *Enterococcus* avaliados. De forma geral, *E. faecium* foi mais sujeito a apresentar resistência que *E. faecallis*, apesar de cepas resistentes terem sido descritas em ambas as espécies. As cepas resistentes a este antimicrobiano apresentaram mutações em diferentes genes, não havendo até o momento a descrição de elementos móveis capazes de disseminar este mecanismo de resistência (HOLLENBECK; RICE, 2012).

Resistência a tigeciclina

É um novo antimicrobiano da classe das gliciliclinas. Estruturalmente similar às tetraciclina, apresenta um esqueleto central de quatro anéis carbocíclicos, derivando directamente da minociclina. Tigeciclina tem uma substituição na posição D-9 que lhe confiere um amplo espectro de atividade. Inibe a síntese proteica por união à subunidade do ribossomo bacteriano 30S e é bacteriostático. O MIC da tigeciclina para enterococcus varia de 0.125 µg/ml a 0.25 µg/ml, sendo que cepas com valores de MIC > 0.5 µg/ml são considerados resistentes. Pouquíssimos casos de resistência a tigeciclina em *Enterococcus* forma descritos até o momento (HOLLENBECK; RICE, 2012).

Resistência a quinolonas

Principalmente Ciprofloxacina e Moxifloxacina são utilizadas em associação com outros antibióticos para a supressão de infecções por *Enterococcus*. O isolamento de cepas mutantes durante a terapia e a ineficácia em alguns modelos animais tornam as quinolonas pouco atraentes para o tratamento, já que na maioria dos casos apresentam alto nível resistência. Talvez esses medicamentos possam desempenhar um papel importante em terapias de longa duração, no caso de infecções endovenosas, se combinadas com amoxiciclina. O mecanismo de resistência dos *Enterococcus* à esta classe de antibióticos se baseia em mutações nos genes *gyrA* (girase) e *parC* (topoisomerase) (HOLLENBECK; RICE, 2012).

Resistência a tetraciclina

Mecanismos de resistência podem ser encontrados com frequência, através da expressão de diferentes genes *tet* responsáveis pela proteção do ribossomo ou através de mecanismos de efluxo. As Tetraciclina são utilizadas esporadicamente contra os *Enterococcus*, como monoterapia ou associadas a outros antimicrobianos. (AARESTRUP et al., 2000).

Resistência a clorofenicol e florfenicol

A resistência dos *Enterococcus* ao cloranfenicol é modulada pelo gene *cat* de origem plasmidial. Este gene não está envolvido na resistência ao florfenicol, amplamente utilizado em veterinária, até o momento os genes relacionados à resistência ao florfenicol são melhores descritos em Gram-negativos que em Gram-positivos (KLARE et al., 2003).

3 JUSTIFICATIVA

Os *Enterococcus* desenvolveram mecanismos de adaptação ao trato intestinal de seus hospedeiros, mesmo sofrendo uma maciça concorrência de outros comensais, predominantemente, anaeróbicos que os superam de modo quantitativo. Assim, esse microrganismo parece desenvolver uma relação simbiótica com o sistema imune do hospedeiro e outras bactérias (LEY; PETERSON; GORDON, 2006). Sua sobrevivência extra-intestinal por longos períodos garante que os *Enterococcus* colonizem uma variedade de ambientes: água, solo, plantas e alimentos. O *E. faecalis*, em especial, pode representar riscos saúde pública, sendo veiculado através da contaminação cruzada no momento do abate de animais de produção ou através da água e dos alimentos contaminados por efluentes agrícolas (MANGALAPPALLI-ILLATHU et al., 2010).

Considerando o potencial zoonótico dos membros do gênero *Enterococcus* e seu papel na disseminação de genes codificadores de mecanismos de resistência, o presente estudo tem por objetivos a avaliação da presença de *Enterococcus faecalis* resistentes a vancomicina ou a altas concentrações de aminoglicosídeos em suínos provenientes de granjas comerciais no Brasil, e a caracterização destas cepas quanto ao perfil de resistência a antimicrobianos e através da eletroforese em campo pulsado (PFGE).

4 OBJETIVOS

- 1) Isolar *Enterococcus* spp. resistentes a vancomicina ou a altas concentrações de aminoglicosídeos a partir de fezes de suínos provenientes de criações comerciais de diferentes Estados do Brasil;
- 2) Identificar as espécies isoladas através da reação em cadeia pela polimerase;
- 3) Caracterizar as cepas de *Enterococcus* spp. através da determinação do perfil de resistência a antimicrobianos;
- 4) Caracterizar a cepas através da eletroforese em campo pulsado (PFGE)
- 5) Confrontar os perfis genotípicos com os dados epidemiológicos.

5 MATERIAL E METODO

5.1 MATERIAL

Foram avaliados 310 animais em fase de creche provenientes de 31 granjas de suínos dos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Mato Grosso e Distrito Federal. De cada granja foram coletados 10 suabes retais de 10 suínos aleatoriamente. Os suabes foram mantidos em meio de transporte Stuart até a chegada ao laboratório de sanidade suína e Virologia-VPS- FMVZ-USP.

Como controle para os testes de resistência a antimicrobianos foram empregadas as cepas de *E. faecalis* (EF 2998) e *E. faecium* (EF 97/98) provenientes do Instituto Adolfo Lutz, *E. faecalis* ATCC 29212 e *S. aureus* ATCC 29213..

5.2 ISOLAMENTO BACTERIANO

Os suabes de fezes foram semeados em água peptonada (Difco-BBL, Detroit, MI /USA) por 16h a 37° C. Uma alíquota de 10 µL da cultura foi semeada em três placas de CHROMagar™ VRE (CHROMagar, Paris, França) contendo diferentes concentrações de antimicrobianos. As placas foram preparadas com 6 µg/mL de vancomicina, 1000 µg/mL de estreptomicina e 125 µg/mL de gentamicina e após serem semeadas foram incubadas por 24 h a 37° C.

As colônias com morfologia sugestiva de *Enterococcus* spp. (rosa pink) foram selecionadas e semeadas em CHROMagar™ Orientation para verificação da pureza (colônias azuis de aspecto metálico). As colônias isoladas foram então semeadas em caldo BHI para estoque e para extração do DNA bacteriano. As colônias foram estocadas a -86° C em caldo BHI com 30% de glicerol para posterior realização da PFGE e da determinação da concentração inibitória mínima.

5.3 EXTRAÇÃO DE DNA E REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE

As colônias com características sugestivas de *Enterococcus* spp. foram submetidas à extração do DNA genômico segundo descrito por Pitcher, Sanders e Owen (1989).

A PCR para identificação das espécies foi realizado utilizando-se 5 µl do DNA bacteriano, 1.5 mM de MgCl₂, 10 pmoles de cada primer (quadro1), 1.0 U de Taq DNA polimerase, 1 X tampão de PCR e água até o volume final de 50 µl. Os parâmetros das reações foram ajustados segundo o descrito pelos autores (LAYTON et al., 2010).

A detecção dos produtos de amplificação (10 µl produto e 2µl de tampão de corrida 6X) foi realizada através da eletroforese em gel de agarose 1,5%, utilizando-se tampão TAE (0,04 M tris-acetato [pH 8,5], 0,002 M de EDTA).

Os fragmentos amplificados foram visualizadas em sistema de fotodocumentação, sendo os mesmos corados com BlueGreen. ® (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brazil) e comparados ao marcador 100 pb DNA Ladder (New England BioLabs Inc., Ipswich, MA/USA).

Quadro 1 - Sequência dos oligonucleotídeos que serão empregados na identificação das espécies de *Enterobacter* spp.

Primer	Sequencia	Espécie	Produto
FL1 FL2	ACT TAT GTG ACT AAC TTA ACC TAA TGG TGA ATC TTG GTT TGG	<i>Enterococcus faecalis</i>	360 bp
E1 E2	TCA ACC GGG GAG GGT ATT ACT AGC GAT TCC GG	<i>Enterococcus spp</i>	730bp

5.4 PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA

Os perfis de sensibilidade antimicrobiana dos isolados foram analisados por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo teste de microdiluição em placa conforme padrões definidos no documento M31-A3 do CLSI (2008).

5.5 MICRODILUIÇÃO EM PLACA

A determinação da concentração inibitória mínima foi realizada utilizando-se o painel Sensititre Gram Positive Narms Plate Format (CMV3AGPF – Trek Diagnostics Systems, Ohio/ EUA). Os princípios testados serão: tigeciclina, tetraciclina, cloranfenicol, daptomicina, estreptomicina, tilosina, quinupristina/dalfopristina, linezolida, nitrofurantoina, penicillina, kanamicina, eritromicina, ciprofloxacina, vancomicina, lincomicina e gentamicina.

O inóculo bacteriano utilizado no teste de concentração inibitória mínima foi preparado a partir de um cultivo puro de *Enterococcus* spp. em caldo cérebro-coração (BHI) de 18-24 horas. A turbidez do cultivo em caldo foi ajustada com solução salina estéril a 0,9 %, de modo a obter uma turbidez óptica comparável à da solução padrão 0,5 McFarland. Esta suspensão bacteriana ajustada continha aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UFC/mL.

Uma vez ajustada, a suspensão bacteriana foi diluída na ordem de 1:1000 no caldo Muller Hinton II (Difco-BBL, Detroit, MI/USA) de maneira a obter uma concentração final de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL que foi então, distribuída nos poços da placa. Após distribuição do inóculo na placa, esta foi selada com adesivo fornecido pelo próprio fabricante e incubada a 37 °C por 18 horas.

O resultado do teste de microdiluição fornece a concentração inibitória mínima, que pode ser traduzida como a menor concentração de agente antimicrobiano que inibe completamente o crescimento do microrganismo nos poços da microplaca. O crescimento pode ser detectado pela visualização a olho nu de um

“botão” no fundo do poço em “u” da placa, denotando o crescimento e a consequente precipitação das células bacterianas ao fundo.

No teste de microdiluição foram utilizados como controle as cepas padrão *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *E. faecalis* ATCC 29212 como preconizado pelo manual do CLSI (CLSI, 2008).

5.6 ELETROFORESE EM CAMPO PULSADO - PFGE

As cepas foram submetidas ao perfil de macrorestrição através de ensaios de PFGE utilizando o sistema de eletroforese CHEF DR III Chiller System (Bio-Rad). Em resumo, uma alíquota do cultivo bacteriano padronizada na diluição 1×10^9 foi incorporada em agarose de baixo ponto de fusão e, após homogeneização, transferidas para moldes plásticos. Os plugs de agarose resultantes contendo o material genético foram então submetidos ao processo de lise in situ e, posteriormente, estocados em tampão Tris-EDTA até o momento da eletroforese. Uma fração do plug foi submetida à digestão com a enzima de restrição *Sma*I e posteriormente adicionada ao gel de agarose 1% seaKem Gold (Cambrex Bio Science Rockland, Inc., East Rutherford, NJ/ USA). A eletroforese foi conduzida num período de 22h a 6V/cm, ângulo fixo de 120°, com pulso inicial de 5 s e final de 35 s.

Os géis foram corados por 40min em uma solução de Syber Safe® (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA/USA) e a visualização dos fragmentos foi realizada sob iluminação ultra-violeta em sistema de fotodocumentação Gel Doc XR (Bio-Rad Laboratories, California, USA). Os fragmentos foram identificados com base na utilização do marcador de alto peso molecular Lambda PFG Marker (New England BioLabs Inc., Ipswich, MA/USA).

5.7 DETERMINAÇÃO DE ÍNDICE DESCRIMINATÓRIO (ID)

Os resultados obtidos através da caracterização genotípica foram analisados segundo o método numérico descrito por Hunter e Gaston (1988).

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS

Para análise estatística dos fragmentos gerados foi utilizado o programa Bionumerics (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgica). A similaridade das amostras foi estimada por meio do coeficiente de Dice. Com a matriz de similaridade gerada foi possível determinar os grupos pelo método de "Unweighthed Pair-Group Method Using Arithmetic Average" (UPGMA). Para análise do PFGE foram considerados como diferentes pulsotipos cepas que apresentaram diferença de quatro ou mais bandas. (VAN BELKUM et al., 2007).

6 RESULTADOS

A partir dos 310 suabes de fezes avaliados foram isoladas colônias com morfologia e coloração característica de *Enterococcus* spp. em 171 animais. Foram selecionadas 364 colônias, e estas foram submetidas a identificação através da PCR para o gênero e espécie, sendo 245 identificadas como *E. faecalis* e incluídas nos testes propostos.

As 245 cepas foram avaliadas quanto ao perfil de resistência a antimicrobianos através da determinação da concentração inibitória frente a 16 antimicrobianos de uso em medicina veterinária e medicina humana. Os resultados obtidos permitiram a caracterização das cepas em 52 perfis de resistência, sendo os perfis P1 e P2 os mais frequentes, representando 57% das cepas estudadas. O quadro 2 apresenta os perfis de P1 a P14, os quais reúnem duas ou mais cepas.

As maiores taxas de resistência observadas foram contra a tilosina (98,7%) e lincomicina (98,7%), seguidas pela tetraciclina (97,1%), eritromicina (96,7%), estreptomicina (96,3%), combinação quinupristina-dalfopristina (95,5%), kanamicina (93,8%), gentamicina (85,3%), ciprofloxacina (76,7%) e cloranfenicol (71,8%). Não foram identificadas cepas resistentes a vancomicina e a taxa de resistência a princípios como daptomicina (0,4%), nitrofurantoína (1,2%) e tigeciclina (1,6%) foram pouco frequentes.

Os valores de CIM identificados para os antimicrobianos testados e as concentrações capazes de inibir o crescimento de 50% e 90% das cepas são apresentados na tabela 1.

Quadro 2 - Perfis de resistência mais frequentes a partir da determinação da concentração inibitória mínima de antimicrobianos frente às cepas de *E. faecalis* isolados de suínos

Perfil de Resistencia	Número de cepas	Antimicrobianos
P1	121	TET, CHL, STR, TYLT, SYN, ERY, CIP, GEN, LIN, KAN
P2	19	TET, STR, TYLT, SYN, ERY, GEN, LIN, KAN
P3	13	TET, STR, TYLT, SYN, ERY, CIP, GEN, LIN, KAN
P4	12	TET, CHL, STR, TYLT, SYN, ERY, GEN, LIN, KAN
P5	7	TET, CHL, STR, TYLT, SYN, LZD, ERY, CIP, GEN, LIN, KAN
P6	7	TET, CHL, STR, TYLT, SYN, ERY, CIP, LIN, KAN
P7	5	TET, STR, TYLT, SYN, ERY, CIP, LIN, KAN
P8	5	TET, CHL, TYLT, SYN, ERY, CIP, GEN, LIN, KAN
P9	2	TET, CHL, DAP, STR, TYLT, SYN, ERY, CIP, GEN, LIN, KAN
P10	3	TET, CHL, STR, TYLT, SYN, ERY, CIP, PEN, GEN, LIN, KAN
P11	3	TET, STR, TYLT, SYN, ERY, CIP, PEN, GEN, LIN, KAN
P12	2	TET, CHL, STR, TYLT, SYN, ERY, LIN
P13	2	TET, DAP, STR, TYLT, SYN, ERY, LIN, KAN
P14	2	TET, DAP, STR, TYLT, SYN, ERY, GEN, LIN, KAN

Tabela 1 - Resultados obtidos a partir da determinação da concentração inibitória mínima de antimicrobianos frente as cepas de *E. faecalis* isolados de suínos

Antimicrobianos		Número de cepas								CIM*50 (µg/ml)	CIM*90 (µg/ml)	Res %	
CIM (µg/ml)	≤0,015	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	>0,5					
Tigeciclina- TGC	0	0	0	4	185	52	0	4		0,12	0,25	1,6	
CIM (µg/ml)	≤0,12	0,12	0,25	0,5	1	2	4	>4					
Ciprofloxacina – CIP	0	0	0	0	10	47	23	165		>4	>4	76,7	
CIM (µg/ml)	≤0,25	0,25	0,5	1	2	4	8	16	>16				
Daptomicin- DAP	6	0	12	98	117	11	1	0	0	2	2	0,4	
CIM (µg/ml)	≤0,25	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	>32			
Vancomicina- VAN	1	0	0	175	66	3	0	0	0	1	2	0,0	
CIM (µg/ml)	≤0,25	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	>32			
Tilosina- TYLT	0	0	0	0	0	1	0	2	2	240	>32	>32	98,7
CIM (µg/ml)	≤0,25	0,25	0,5	1	2	4	8	16	>16				
Penicilina- PEN	0	0	0	2	158	71	5	3	6	2	4	3,7	
CIM (µg/ml)	≤0,25	0,25	0,5	1	2	4	8	>8					
Eritromicina - ERY	0	0	1	1	4	2	1	236		>8	>8	96,7	
CIM (µg/ml)	≤0,5	0,5	1	2	4	8	16	32	>32				
Quin./ dalf.-SYN	2	0	0	4	5	14	154	52	14	16	32	95,5	
CIM (µg/ml)	≤0,5	0,5	1	2	4	8	>8						
Linezolida- LZD	1	0	4	97	127	11	5			4	4	6,5	
CIM (µg/ml)	≤1	1	2	4	8	>8							
Lincomicina- LIN	3	0	0	0	2	240				>8	>8	98,7	
CIM (µg/ml)	≤1	1	2	4	8	16	32	>32					
Tetraciclina - TET	2	0	0	0	5	5	3	230		>32	>32	97,1	
CIM (µg/ml)	≤2	2	4	8	16	32	>32						
Cloranfenicol- CHL	0	0	1	26	42	26	150			>32	>32	71,8	
CIM (µg/ml)	≤2	2	4	8	16	32	64	>64					
Nitrofurantoína- NIT	0	2	2	122	98	14	4	3		8	16	1,2	
CIM (µg/ml)	≤128	128	256	512	1024	>1024							
Gentamicina - GEN	33	1	1	1	5	204				>1024	>1024	85,3	
CIM (µg/ml)	≤128	128	256	512	1024	>1024							
Kanamicina- KAN	13	0	2	0	0	230				>1024	>1024	93,8	
CIM (µg/ml)	≤512	512	1024	2048	>2048								
Estreptomicina – STR	8	0	1	8	228					>2048	>2048	96,3	

Todas as 245 cepas de *E. faecalis* apresentaram perfil de restrição através da eletroforese em campo pulsado com a enzima *Sma*I, resultando em bandas com tamanho entre 20 kb e 1000 kb (Figura 1). A partir desta avaliação foram observados 109 pulsotipos identificados de P1 a P109, agrupando de 1 a 22 cepas em cada perfil. O índice discriminatório da PFGE foi 0,98.

Apenas 18 dos 109 perfis gerados na PFGE agruparam quatro ou mais isolados, a maioria dos perfis foram formados por cepas isoladas (71 perfis ou 65% dos perfis). Os pulsotipos 1 a 16, agrupados na primeira chave observada na figura 2, reuniram 75 cepas, representando 30,6% das cepas analisadas. Neste cluster podem-se observar cepas provenientes de seis dos sete Estados amostrados, 35 franjas e 62 animais. As outras 170 cepas avaliadas foram pulverizadas nos 93 perfis identificados, com similaridade variando de 95 a 60%.

Figura 1 - Eletroforese em campo pulsado- Colunas 1 e 20- Lambda Ladder PFG Marker, Colunas 2 a 18- Cepas de *Enterococcus faecalis* isoladas de suínos comerciais - São Paulo - Brasil

Fonte: (FILSNER, P. H. N. L, 2013)

Figura 2 - Dendrograma representando os pulsotipos identificados a partir da PFGE de cepas de *Enterococcus faecalis* isoladas de suínos comerciais - São Paulo - Brasil

Fonte: (FILSNER, P. H. N. L., 2013)

7 DISCUSSÃO

O gênero *Enterococcus* é formado atualmente por 36 espécies e faz parte da microbiota normal do trato gastro-intestinal da maioria dos mamíferos e aves. Nos suínos, várias espécies deste gênero já foram descritas, no entanto, a frequência das diferentes espécies entre os indivíduos dentro de uma população e sua quantidade na microbiota são muito variáveis. Alguns estudos descrevem que a espécie *E. faecalis* é a mais frequente e em espécies como suínos, aves comerciais e até em humanos (KIM et al., 2010). A espécie *E. faecalis* e *E. faecium* tem sido as mais amplamente estudadas nos últimos anos devido a seu potencial de causar infecções graves em seres humanos e a suas habilidades em disseminar genes codificadores de mecanismos de resistência a antimicrobianos (MANGALAPPALLI-ILLATHU et al., 2010). No presente estudo foram avaliadas amostras de fezes de 310 animais provenientes de 31 granjas de suínos de diferentes estados do Brasil, com o objetivo principal de selecionar espécies resistentes à vancomicina, estreptomicina e gentamicina. A partir deste propósito inicial observou-se o isolamento em maior frequência de *E. faecalis*, sendo identificadas 245 cepas desta espécie, dentre as 364 colônias isoladas nos meios indicadores e seletivos. As 119 colônias restantes não foram identificadas como pertencentes ao gênero, ou foram posteriormente identificadas como *E. faecium* e não foram incluídas neste estudo. A partir destas considerações, observa-se que não é possível nem esperado frente aos resultados obtidos avaliar a frequência de outras espécies deste gênero.

As 245 cepas caracterizadas como *E. faecalis* foram submetidas a determinação da concentração inibitória mínima frente a 16 antimicrobianos indicados para uso em casos de infecções humanas pelo agente recomendado para teste pelo CLSI (CLSI, 2008).

Não foram identificadas cepas de *E. faecalis* resistentes a vancomicina, considerando-se os pontos de corte propostos pelo CLSI (CLSI, 2008) ou pelo Sistema Nacional de Monitoria de Resistência a Antimicrobianos dos Estados Unidos (National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria - NARMS). Segundo estas instituições as cepas são consideradas sensíveis a vancomicina com CIM ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$ e resistentes quando apresentam CIM ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$.

A vancomicina é o principal membro da classe de antibióticos glicopeptídeos clinicamente importantes. Descoberto pelo laboratório Eli Lilly, a vancomicina foi divulgada pela primeira vez em 1956 e introduzida na clínica em 1958, embora a sua estrutura não tenha sido estabelecida, até cerca de 30 anos mais tarde, em 1983. Com o surgimento dos *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA), a vancomicina tornou-se a droga de escolha para o tratamento de infecções bacterianas hospitalares e passou a ser também para o tratamento de pacientes em diálise, pacientes com alergia aos antibióticos β – lactâmicos, entre outros. Atualmente, mais de 60% das infecções em unidades de terapia intensiva são por de *S. aureus* MRSA. O surgimento de resistência à vancomicina demorou mais para ocorrer que a maioria dos antimicrobianos utilizados. Mesmo após as três primeiras décadas de utilização, não houve relatos notáveis de resistência ao princípio, alguns até especularam que o desenvolvimento de resistência seria impossível (JAMES et al., 2012).

Fenótipos resistentes à vancomicina foram relatadas pela primeira vez em no gênero *Enterococcus* (vancomycin resistant enterococcus VRE), em 1987, e atualmente mais de 30 % das infecções por *E. faecalis* em unidades de terapia intensiva são causadas por cepas VRE. Após o surgimento de resistência em *Enterococcus*, transferível geneticamente de forma vertical, surgiu a preocupação com o aparecimento de cepas de *S. aureus* resistentes à vancomicina (VRSA), agora como resultado da transferência horizontal de genes de *Enterococcus* resistentes. Os primeiros casos de estirpes de *S. aureus* resistentes à vancomicina foram relatados em 2002, sendo que o número de relatos vem crescendo. Um grande número de casos de pacientes infectados por VRSA foi encontrado em pacientes co-infectados com o VRE, indicando que transferência horizontal de genes como o método mais provável para a aquisição de resistência à vancomicina. À medida que a prevalência de VRSA aumenta e à medida que se estabelece a transferência vertical de genes de resistência nesta espécie, será necessário o desenvolvimento de novos antibióticos com a longevidade e segurança da vancomicina para conter o impacto destas infecções (JAMES et al., 2012).

No Brasil não foram encontrados na literatura consultada, relatos de resistência a vancomicina em cepas de origem suína. Os relatos de ocorrência de cepas VRE em suínos são da Dinamarca, Portugal, Estados Unidos e Suíça, sendo na maioria dos casos em cepas de *E. faecium* (FREITAS et al., 2011). A resistência

a vancomicina em animais de produção foi associada a utilização do antimicrobiano avoparcina como facilitador de crescimento. A avoparcina também pertence a classe dos glicopeptídeos e pode levar a seleção de cepas resistentes a vancomicina (resistência cruzada). Seu uso como facilitador de crescimento começou em 1975 em vários países (JAMES et al., 2012). No Brasil, o uso deste antimicrobiano ficou mais restrito a avicultura e talvez por este fato os suínos tenham sido menos expostos a seleção de *Enterococcus* resistentes a glicopeptídeos.

Na Dinamarca, o uso do macrolídeo tilosina como facilitador de crescimento se tornou suspeito de levar ao desenvolvimento de resistência cruzada à vancomicina, uma vez que os genes codificando resistência aos dois antimicrobianos se encontram em muitos casos, no mesmo plasmídeo (JAMES et al., 2012). Em criações de suínos no Brasil, a tilosina foi usada muitos anos como facilitador de crescimento e atualmente continua a ser usada com frequência de forma metafílica ou terapêutica. Observa-se nos resultados obtidos neste estudo que a frequência de resistência a tilosina nas cepas testadas chega a 98,7%, no entanto, este fato não parece ter contribuído para seleção de cepas resistentes a vancomicina.

A combinação de aminoglicosídeos como gentamicina e estreptomicina com agentes que atuam sobre a parede celular (ampicilina, penicilina, ou a vancomicina) tem sido utilizada com frequência para tratar de forma eficaz a infecção por *Enterococcus*. No entanto, o tratamento com estas associações não pode ser aplicado nos casos de infecções causadas por *Enterococcus* resistentes a altos níveis de aminoglicosídeos (HLGR). *Enterococcus faecalis* com este padrão de resistência foi isolado pela primeira vez a partir de pacientes hospitalizados com endocardite em França em 1979 (CHOI; WOO, 2013).

Araoka, Kimura e Yoneyama et al. (2011) descrevem um total de 155 casos de bacteremia por *Enterococcus* identificados entre julho de 2001 e dezembro de 2009 em um hospital no Japão. As cepas resistentes a altos níveis de aminoglicosídeos (HLGR) estavam presentes em 28% dos casos, envolvendo *E. faecalis* em 32% destes e *E. faecium* em 24%.

No presente estudo altas concentrações de gentamicina e estreptomicina foram utilizadas para o isolamento das 245 cepas avaliadas, portanto espera-se que 100% das cepas estudadas apresentem resistência a gentamicina ou a estreptomicina, uma vez que os genes que codificam resistência a estes princípios são diferentes e mesmo dentro de cada princípio ativo, já foram descritos mecanismos de resistência variados. Considerando-se os princípios isoladamente, pode-se observar que a resistência à gentamicina esteve presente em 85,3% das cepas e a estreptomicina em 96,3% das cepas. A presença de cepas HLGR em animais de produção ainda não é muito descrita, tendo sido relatada em maiores detalhes em suínos na Dinamarca, cortes de carne de frango na Coreia, e fezes de bovinos, aves e suíno também na Coreia (LARSEN et al., 2010; HAN; UNNO; JANG, 2011; CHOI; WOO, 2013).

Dentre os antimicrobianos testados vale ressaltar a ocorrência, no presente estudo, de cepas resistentes a daptomicina (0,6%), tigeciclina (1,6%) e linezolida (6,5%). Apesar das baixas taxas observadas, estes achados são importantes tendo em vista que estas drogas representam as opções mais recentes de tratamento em casos de resistência a vancomicina. Segundo o Food and Drug Administration (FDA), órgão regulador americano, a linezolida foi aprovada para uso com este fim em 2000, a tigeciclina em 2005 e a daptomicina, ainda não foi aprovada oficialmente, mas já é utilizada pelos clínicos. Não foram encontrados relatos de isolamento de cepas resistentes a estes princípios em animais de produção, estudos mais aprofundados em relação a estas cepas vão ser conduzidos pelo grupo de pesquisa envolvido no presente estudo.

Considerando a avaliação das cepas através da eletroforese em campo pulsado (PFGE), verifica-se que apesar da formação de alguns grupos mais consistentes, houve grande diversidade entre as cepas. Este fato indica que deve haver também grande variabilidade nos mecanismos de resistência relacionados à resistência a altos níveis de aminoglicosídeos, que é o fenótipo predominante. Os

perfis de resistência obtidos também são bastante variados e não apresentaram associação direta com os grupos formados. A maior parte dos pulsotipos obtidos relaciona cepas de mesmo animal ou de mesma granja.

Os resultados obtidos neste estudo indicam que no Brasil, os suínos comerciais carregam em alta frequência cepas de *E. faecalis* multirresistente a antimicrobianos, resistentes a altos níveis de aminoglicosídeos e a macrolídeos entre outros princípios, no entanto, oferecem baixo risco a disseminação de cepas resistentes a vancomicina. Estudos mais aprofundados direcionados aos genes envolvidos nos padrões de resistência observados e ao potencial de virulência destes isolados deverão ser conduzidos no futuro.

8 CONCLUSÕES

- Os suínos representam baixo risco de transmissão de *Enterococcus* resistentes a vancomicina no Brasil;
- A presença de cepas resistentes a altos níveis de aminoglicosídeos é bastante elevada nos animais avaliados e pode representar risco à saúde pública;
- Observa-se em baixa frequência a presença de cepas resistentes a tigeciclina, daptomicina e linezolida. Fato este que deve ser monitorado no futuro devido à importância destas drogas no controle das infecções pelo agente.

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F. M.; AGERSO, Y.; GERNER-SMIDT, P.; MADSEN, M.; JENSEN, L. B. . Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.37, n. 2, p. 127–37,2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10863107>> Acesso em: 16 abr.2013.
- ARAOA, H.; KIMURA, M.; YONEYAMA, A. A surveillance of high-level gentamicin-resistant enterococcal bacteremia. **Journal of Infection and Chemotherapy : Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy**, v. 17, n. 3, p. 433–4, 2011.
- ARIAS, C.A.; MURRAY, B.E.The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nature Reviews Microbiology*, v.10 n.4, p. 266–278, 2012. doi:10.1038/nrmicro2761. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22421879>>. Acesso em: 12 abr.2013.
- BYAPPANAHALLI, M. N., NEVERS, M. B., KORAJKIC, A., STALEY, Z. R., HARWOOD, V. J. Enterococci in the environment. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v.76, n.4, p. 685–706, 2012 doi:10.1128/MMBR.00023-12 Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23204362>>. Acesso em: 15 abr.2013
- CASTILLO-ROJAS, G.; MAZARI-HIRÍART, M.; PONCE DE LEÓN, S.; AMIEVA-FERNÁNDEZ, R. I.; AGIS-JUÁREZ, R. A.; HUEBNER, J.; LÓPEZ-VIDAL, Y. Comparison of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Strains isolated from water and clinical samples: antimicrobial susceptibility and genetic relationships. **PloS One**, v. 8, n. 4, p. e59491, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0059491. Disponível em: <www.plosone.org>. abr 2013
- CHOI, J.-M.; WOO, G.-J. Molecular characterization of high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* from chicken meat in Korea. **International Journal of Food Microbiology**, v. 165, n. 1, p. 1–6, 2013.
- CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Suceptibility tests for bacteria isolated from animals;- 3 ed. [S.l]:NCCLS, 2008. CLSI document M31-A3.
- HAN, D.; UNNO, T.; JANG, J. The occurrence of virulence traits among high-level aminoglycosides resistant *Enterococcus* isolates obtained from feces of humans, animals, and birds in South Korea. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 3, p. 387–92, 2011.
- HASMAN, H., SAPUTRA, D., SICHERITZ-PONTEN, T., LUND, O., SVENDSEN, C. A., FRIMODT-MØLLER, N., & AARESTRUP, F. M. Rapid whole genome sequencing for the detection and characterization of microorganisms directly from clinical

samples. **Journal of Clinical Microbiology**, 2013. doi:10.1128/JCM.02452-13. Disponivel em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24172157> >. Acesso em: 10 nov.2013

HOLLENBECK, B. L.; RICE, L. B. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. **Virulence**, v.3 n.5, p. 421–33, 2012. doi:10.4161/viru.21282. Disponivel em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3485979>> Acesso em: 10 fev. 2013

HUNTER, P. R.; GASTON, M. A.- Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, v.26, n.11, p.2465-2466, 1988.

JAMES, R. C.; PIERCE, J. G.; OKANO, A.; XIE, J.; BOGER, D. L. Redesign of Glycopeptide Antibiotics: back to the future. **ACS Chemical Biology**, v. 7, n. 5, p. 797–804, 2012. doi: 10.1021/cb300007j. Disponivel em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22330049> > Acesso em: 20 mar.2013.

KLARE I.; KONSTABEL C.; BADSTÜBNER D.; WERNER G.; WITTE W. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*, **International Journal of Food Microbiology** ,v. 88, p. 269–290, 2013.

KELESIDIS, T. ; HUMPHRIES, R. ; USLAN, D. Z. ; PEGUES, D. A. Daptomycin nonsusceptible enterococci: an emerging challenge for clinicians. *Clinical Infectious Diseases*, v.52, n.2, p. 228-234, 2011.

KIM, S.-Y.; LEE, J. E.; LEE, S.; LEE H. T.; HUR H. G.; KO G. Characterization of *Enterococcus* spp. from human and animal feces using 16S rRNA sequences, the *esp* gene, and PFGE for microbial source tracking in Korea. **Environmental Science & Technology**, v. 44, n. 9, p. 3423–8, 2010

LARSEN, J.; SCHØNHEYDER, H. C.; LESTER, C. H.; OLSEN S.S.; PORSBO L. J.; GARCIA-MIGURA L.; JENSEN L. B.; BISGAARD M.; HAMMERUM A. M. Porcine-origin gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* in humans, Denmark. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 4, p. 682–4, 2010.

LAYTON, B. A.; WALTERS, S. P.; LAM, L. H.; BOEHM, A. B. *Enterococcus* species distribution among human and animal hosts using multiplex PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v.109,n.2, p. 539–47,2010. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04675.x. Disponivel em:<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2010.04675.x/full>>. Acesso em: 25 mai. 2012.

LEY, R. E.; PETERSON, D. A.; GORDON, J. I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in human intestine. **Cell**,. v.124,p.837-848, 2006.

MANERO, A.; BLANCH, A. Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.10, p.4425, 1999.Disponivel em: < <http://aem.asm.org/content/65/10/4425.short>>. Acesso em: 01 abr2013

2013 MANGALAPPALLI-ILLATHU, A.; DURIEZ, P.; MASSON, L.; DIARRA, M. S.; SCOTT, A.; TIEN, Y.; ZHANG, Y.; TOPP, E. Dynamics of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus faecalis* during swine manure storage.

Canadian Journal of Microbiology, v.56, n.8, p. 683–91, 2010. doi:10.1139/w10-055. Disponível em: <www.nrcresearchpress.com>. Acesso em: 16 abr 2013

MEDERSKI-SAMORAJ, B. D.; MURRAY, B. E. High-level resistance to gentamicin in clinical isolates in enterococci. **Journal of Infectious Diseases**, v.147, n.4, p.751-757, 1983.

MERQUIOR, V. L. C.; FARIA, A. R. ; ROCHA, F. S. P. DA; MORAIS, J. M.; NEVES, F. P. G.; TEIXEIRA, L. M. Emergence and characterisation of vanB vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 107, n.4, p. 557–60, 2012.

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22666871>>. Acesso em: 01 set. 2012.

MURRAY, B. E., The life and times of *Enterococcus*. *Clinical Microbiology Reviews*, v.3, p.46-65, 1990.

PITCHER, D. G.; SAUNDERS, N. A.; OWEN, R. J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Letters in Applied Microbiology**, v. n. 84, p.151–156, 1989.

SPARO, M.; URBIZU, L.; SOLANA, M. V.; POURCEL, G.; DELPECH, G.; CONFALONIERI, A.; CECI, M.; SANCHEZ BRUNI, S.F. High-level resistance to gentamicin: genetic transfer between *Enterococcus faecalis* isolated from food of animal origin and human microbiota. **Letters in Applied Microbiology**, v.2, n.52, p. 119–25, 2012. doi:10.1111/j.1472-765X.2011.03182.x. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22098378>>. Acesso em: 07 jun. 2012

VAN BELKUM, A.; TASSIOS P.T.; DIJKSHOORN L.; HAEGGMAN S.; COOKSON B.; FRY NK.; FUSSING V.; GREEN J.; FEIL E.; GERNER-SMIDT P.; BRISSE S.; STRUELENS M. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clinical Microbiology Infectious*, v. 13, p.1-46, 2007. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01786.x. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17716294>>. Acesso em: 07 nov. 2012