



UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos

CÁTIA GIRALDI

***ENTEROCOCCUS* ISOLADOS DE ALIMENTOS: CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR E PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS**

DISSERTAÇÃO

MEDIANEIRA

2014

CÁTIA GIRALDI

***ENTEROCOCCUS* ISOLADOS DE ALIMENTOS: CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR E PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós
Graduação em Tecnologia de Alimentos da
Universidade Tecnológica Federal do Paraná,
como parte dos requisitos para obtenção do título
de mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Furlaneto Maia
Co-orientador: Prof. Dr. Valdemar Padilha Feltrin

MEDIANEIRA

2014

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar sempre ao meu lado guiando e iluminando meus passos.

A professora Dra. Luciana Furlaneto Maia, pela orientação desta pesquisa, ensinamentos e compreensão e ao professor Dr. Valdemar Padilha Feltrin pelo incentivo e apoio prestados.

Aos meus pais, Aristeu e Noeli, e meus irmãos, Thiago, Catiucia e Daiana, pelo amor incondicional e pelo apoio, em especial de minha irmã Catiucia.

Ao meu noivo, Anderson, pelo amor, incentivo, companheirismo e suporte emocional.

A professora Dra. Marcia Cristina Furlaneto e aos alunos Márcia Terra e Thiago Saito, da Universidade Estadual de Londrina, que contribuíram para a realização desse trabalho.

A todos os professores do programa do mestrado e colegas de turma, gostaria de estender meus agradecimentos pelo apoio oferecido ao decorrer de toda a pesquisa.

Obrigada a Fundação Araucária e ao CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

Os enterococos são patógenos com considerável capacidade de expressar resistência a vários antimicrobianos e com abundante representatividade em alimentos. Este estudo teve por finalidade realizar o isolamento de cepas do gênero *Enterococcus* em alimentos, representados por carne de frango e carne suína (crua e processada), analisar o perfil de resistência antimicrobiana através do método de disco-difusão e identificar através de técnicas moleculares as espécies dos isolados e os genes codificadores de resistência para vancomicina e tetraciclina. Foram analisadas 36 amostras, totalizando 54 cepas isoladas pertencentes ao gênero *Enterococcus*. A espécie detectada em maior ocorrência nos isolados de carne crua de frango (40%) e carne crua suína (29%) foi *E. faecalis* e nos isolados de produtos cárneos processados (100%) *E. faecium*. *E. casseliflavus*/*E. flavencens* teve seu isolamento apenas em produto processado. A espécie *E. gallinarum* não foi confirmada entre as amostras de alimentos analisadas. As espécies *E. faecalis* e *E. faecium* isoladas a partir de carne crua de frango foram significativamente mais resistentes que as isoladas das demais amostras, apresentando altos percentuais de resistência para: estreptomicina, ciprofloxacina, norfloxacina, eritromicina, vancomicina e tetraciclina. Isolados de carne crua de frango e suína apresentaram gene de resistência para tetraciclina e vancomicina. Portanto, sugere-se que, alimentos de origem animal possam desempenhar um papel importante na disseminação e transferência de enterococos resistentes e/ou genes de resistência aos seres humanos.

Palavras-chave: Espécies. Isolados. Genes.

ABSTRACT

Enterococci are pathogens with considerable ability to express resistance to multiple antimicrobials and abundant representation in foods. This study aimed to carry out the isolation of strains of the genus *Enterococcus* in food, represented by chicken and pork (raw and processed), to analyze the profile of antimicrobial resistance by the disk diffusion method and by molecular techniques to identify species isolates and genes encoding resistance to vancomycin and tetracycline. 36 samples, totaling 54 strains belonging to the genus *Enterococcus* were analyzed. The species detected in most occurred in isolates from raw chicken meat (40 %) and raw pork (29%) was isolated in *E. faecalis* and processed meat products (100%) *E. faecium*. *E. casseliflavus* / *E. flavescens* had its isolation only in the processed product. The species *E. gallinarum* was confirmed between food samples surveyed. *E. faecalis* and *E. faecium* isolates from raw chicken meat isolated were significantly more resistant than the other samples, showing high percentage of resistance to: streptomycin, ciprofloxacin, norfloxacin, erythromycin, vancomycin and tetracycline. The isolated raw poultry and swine gene showed resistance to tetracycline and vancomycin. Therefore, it is suggested that food of animal origin may play an important role in the dissemination and transfer resistant enterococci and / or resistance genes to humans.

Keywords: Species. Isolated. Genes.

LISTA DE TABELAS

Parte 1:

TABELA 1 - OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES EMPREGADOS PARA CONFIRMAÇÃO DO GÊNERO, IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES E GENES DE RESISTÊNCIA A VANCOMICINA E TETRACICLINA EM <i>ENTEROCOCCUS</i> SP.....	24
---	----

Parte 2:

TABELA 1 - OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES EMPREGADOS PARA CONFIRMAÇÃO DO GÊNERO, IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES E GENES DE RESISTÊNCIA A VANCOMICINA E TETRACICLINA EM <i>ENTEROCOCCUS</i> SP.....	36
TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO DOS PERFIS DE MULTIRRESISTÊNCIA ENTRE AS CEPAS DE <i>ENTEROCOCCUS</i> ISOLADAS DE CARNE CRUA DE FRANGO	40
TABELA 3 - DISTRIBUIÇÃO DOS GENES CODIFICADORES DE RESISTÊNCIA À TETRACICLINA E VANCOMICINA DETECTADA PELA TÉCNICA DE PCR EM AMOSTRAS DE <i>ENTEROCOCCUS</i> SP ISOLADOS DE CARNE CRUA DE FRANGO E SUÍNA.....	42

LISTA DE FIGURAS

Parte 1:

- FIGURA 1 - GEL ILUSTRATIVO DA AMPLIFICAÇÃO PELA PCR DO GENE *tuf*
ESPECÍFICO PARA A CONFIRMAÇÃO DO GÊNERO *ENTEROCOCCUS*
M: MARCADOR DE PESO MOLECULAR (100 pb).....38

LISTA DE GRÁFICOS

Parte 1:

GRÁFICO 1: DISTRIBUIÇÃO DO GÊNERO E DAS ESPÉCIES E FONTES DE ISOLAMENTO DE <i>ENTEROCOCCUS</i> PROVENIENTES DE ALIMENTOS.....	38
---	----

LISTA DE SIGLAS

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC *American Type Culture Collection*

BHI *Brain Heart Infusion Broth*

CLSI *Clinical and Laboratory Standard Institute*

CMI Concentração Mínima Inibitória

CQ Controle de Qualidade

DNA Ácido Desoxiribonucleico

KEA Agar Canamicina Esculina Sódica

NaCl Cloreto de Sódio

MHA *Muller-Hinton*

pb Pares de Base

PCR Reação em Cadeia da Polimerase

PM Peso Molecular

RNA Ácido Ribonucleico

UV Ultra Violeta

V *Volts*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	11
2.1 GERAL.....	11
2.2 ESPECÍFICOS	11
3 REFERENCIAL TEÓRICO	12
3.1 CARACTERÍSTICAS DOS ENTEROCOCOS.....	12
3.2 ENTEROCOCOS EM ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL.....	13
3.3 PATOGENICIDADE	14
3.4 FATORES DE VIRULÊNCIA.....	15
3.5 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA	16
3.5.1 Resistência aos aminoglicosídeos.....	18
3.5.2 Resistência aos glicopeptídeos	18
3.5.3 Resistência aos β -lactâmicos	19
3.5.4 Resistência as quinolonas	20
3.5.5 Resistência à tetraciclina	20
3.5.6 Resistência ao cloranfenicol	21
3.5.7 Resistência aos macrolídeos	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1 AMOSTRAGEM.....	22
4.2 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE <i>ENTEROCOCCUS</i> SPP A PARTIR DE AMOSTRAS DE CARNE.....	23
4.3 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO	24
4.4 IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA	24
4.5 DETERMINAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS.....	25
REFERÊNCIAS	26
APRESENTAÇÃO DO ARTIGO.....	33
INTRODUÇÃO	35
MATERIAIS E MÉTODOS	36
RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
CONCLUSÃO.....	44
AGRADECIMENTOS.....	44
REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Enterococcus* compreende um grupo bastante complexo e importante de micro-organismos, especialmente, no que se refere a sua interação com os seres humanos (FACKLAM et al., 2002). Essa bactéria faz parte da microbiota natural do trato gastrointestinal de animais e seres humanos, contudo, têm surgido como importante patógeno oportunista e está associado com uma grande diversidade de infecções humanas, afetando principalmente pessoas imunocomprometidas e em terapia intensiva (KLARE et al., 2003; LÓPEZ et al., 2009, GIRAFFA, 2002).

Enterococcus spp apresentam notável capacidade de expressar resistência a vários agentes antimicrobianos, principalmente, os de relevância clínica, limitando assim, o número de opções terapêuticas.

A resistência antimicrobiana pode apresentar-se de dois tipos: intrínseca que é própria da espécie, e seus genes determinantes se encontram no cromossomo (ASLANGUL et al., 2005), ou resistência adquirida, que segundo Aslangul et al. (2005) pode ser consequência de uma mutação no DNA original ou pela aquisição de material genético externo a célula bacteriana.

Estudos apontam que micro-organismos resistentes aos antimicrobianos estão presentes desde o ambiente hospitalar até a microbiota natural de diversos animais e seres humanos (SCHWARZ; KEHRENBURG; WALSH, 2001).

Na produção animal, o uso de antimicrobianos para promover o crescimento dos animais ou para tratamento e controle de doenças acelera o aparecimento de bactérias resistentes aos antimicrobianos, podendo ser transferidas aos humanos através da cadeia alimentar ou contato direto com esses animais (AARESTRUP et al., 2001; VIGNAROLI et al. 2011).

No Brasil, ainda há poucos estudos a respeito da ocorrência de cepas de enterococos resistentes em alimentos de origem animal. Portanto, considera-se necessário e importante a intensificação de estudos em busca de uma melhor compreensão e entendimento sobre a representatividade da cadeia alimentar como veículo de disseminação para esses micro-organismos resistentes.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Caracterizar fenotipicamente e genotipicamente o gênero e as espécies de *Enterococcus* isolados de alimentos cárneos e avaliar o perfil de resistência a antimicrobianos.

2.2 ESPECÍFICO

-Isolar e proceder à identificação fenotípica do gênero *Enterococcus* em amostras de carne de frango e suína (crua e processada);

-Determinar, por técnicas moleculares, o gênero e as espécies de enterococos prevalentes nas amostras de alimentos;

-Determinar a ocorrência da resistência aos antimicrobianos pertencentes à classe dos aminoglicosídeos, β -lactâmicos, quinolonas, glicopeptídeos, macrolídeos, e ainda, tetraciclina e cloranfenicol;

-Verificar a presença dos genes que codificam resistência a tetraciclina (*tet(L)*) e vancomicina (*vanA* e *vanB*) nos isolados.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 CARACTERÍSTICAS DOS ENTEROCOCOS

Os enterococos foram classificados inicialmente como estreptococos do grupo D, por possuírem o antígeno da parede celular desse grupo, um ácido teicoico glicerol associado à membrana citoplasmática (MURRAY, 1990). Em 1984 foram reclassificados em um novo gênero, os *Enterococcus* (SILVA, 2007).

Os enterococos possuem necessidades nutricionais complexas, sendo catalase negativa (KAÇMAZ; AKSOY, 2005), são cocos Gram-positivos, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos que ocorrem isoladamente, em pares ou cadeias (MORENO et al., 2006). Crescem em uma ampla faixa de temperatura entre 10°C a 45°C e pH entre 5,0 a 9,6 (MURRAY, 1990). Apresentam temperatura ótima de crescimento a 35°C e são capazes de crescer em meio contendo 6,5% de NaCl e possuem tolerância de até 40% aos sais biliares (LEVINSON; JAWETZ, 2005).

Existem mais de 37 espécies reconhecidas de *Enterococcus*, porém as espécies *E. faecalis* e *E. faecium* são as mais frequentemente encontradas devido à ampla distribuição no meio ambiente (FACKLAN, 2002; KUHN et al., 2000).

O principal habitat desse micro-organismo é o trato gastrointestinal de seres humanos e animais (AARESTRUP, 2002). São encontrados principalmente, em mamíferos, pássaros, répteis e insetos, estando presentes no solo, plantas e água, sendo normalmente considerados contaminantes fecais (FACKLAN, 2002). Esta diversidade de ambientes é provavelmente devido à sua disseminação pelas fezes de animais de sangue quente e por sua habilidade em crescer e sobreviver numa grande variedade de condições ambientais (HARDIE; WHILEY, 1997).

Uma característica importante desse grupo é a resistência ao estresse químico e físico, sendo capazes de sobreviver por longos períodos fora do ambiente intestinal de seu hospedeiro (KUHN et al., 2000). Podem apresentar uma sobrevivência maior do que os enteropatógenos, no solo, vegetais e em alimentos, principalmente entre os submetidos à desidratação, ação de desinfetantes e alterações de temperatura. (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Os enterococos são resistentes a temperaturas de pasteurização, possuem capacidade de adaptação a diferentes substratos e condições de crescimento (temperatura baixa e alta, pH extremo e salinidade) (MORENO et al., 2006), essas características implicam que os mesmos podem ser encontrados em qualquer alimento de origem animal, tanto processados, crus ou que tenham sido submetidos a tratamento térmico (VIGNAROLI et al., 2011). Em muitos casos, se a contagem de enterococos for elevada, são capazes de sobreviver em alimentos submetidos ao cozimento (FRANZ; HOLZAPFEL; STILES, 1999). Gordon e Ahmad (1991) afirmam que cepas de *E. faecium* têm sido capazes de sobreviver a 68°C durante 30 min.

3.2 ENTEROCOCOS EM ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL

A produção brasileira de carne suína e de frango vem crescendo anualmente, segundo a UBABEF (2014) em 2013 a produção de carne de frango totalizou 12,308 milhões de toneladas e a produção de carne suína totalizou 3,417 milhões de toneladas (ABIPECS, 2014). Para que a avicultura e a suinocultura mantenham o sucesso do crescimento produtivo é preciso ter cuidado com a sanidade dos animais, o que implica na utilização cada vez maior dos antimicrobianos durante todas as fases de produção.

No sistema de criação de frangos e suínos drogas antimicrobianas podem ser usadas como agentes terapêuticos e/ou promotores de crescimento, promovendo a seleção de enterococos resistentes, que constituem uma grande parte das bactérias autóctones associadas ao trato gastrointestinal de animais (OLIVEIRA, et al., 2010, VIGNAROLI et al., 2011, GIRAFFA, 2002).

A carne tem sido uma das principais fontes de infecções alimentares, e bactérias resistentes nesses produtos têm sido implicadas em surtos ou em casos esporádicos (MOLBAK, et al., 1999; SMITH, et al., 1999; HELMS, et al., 2002).

Segundo Tiecco (1992) a contaminação pelos enterococos em alimentos de origem animal pode ser endógena ou exógena, dependendo se a origem das bactérias for do próprio animal ou do meio ambiente. Estudos realizados com aves demonstraram que a contaminação detectada nos animais sacrificados, nas condições conhecidas nos abatedouros, se origina, principalmente, da flora endógena e que este tipo de contaminação pode ocorrer durante o

processo de evisceração, devido ao extravasamento do conteúdo gastrointestinal e posterior contaminação da carne (TURTURA e LORENZELLI, 1994).

No Brasil o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento preconiza através da Circular nº 175/2005/CGPE/DIPOA os procedimentos para o controle sanitário dos alimentos, estabelece através da legislação referida que, no abate a fim de evitar a contaminação da carne, os operários devem ser treinados para a realização das operações e os utensílios utilizados devem ser lavados e sanificados (através da imersão em esterilizadores 82°C por 20 segundos) após cada operação, também, durante os trabalhos pode ocorrer uma contaminação mais extensa, por conteúdo gastrointestinal durante a evisceração, nesse caso, os equipamentos/instrumentos envolvidos devem ser submetidos a uma limpeza e sanitização mais completa e eficiente.

É imprescindível que todos os cuidados sejam tomados durante as operações de abate, pois uma bactéria resistente que contamina uma carcaça e resiste às barreiras existentes durante a produção dos alimentos nas indústrias e/ou durante o preparo doméstico, pode chegar até o trato gastrointestinal do consumidor e modificar o perfil de resistência de sua microbiota intestinal (VIGNAROLI et al., 2011).

3.3 PATOGENICIDADE

Os enterococos não possuem os potentes fatores de virulência encontrados em outras bactérias, como *Staphylococcus aureus*, mas possuem importantes características diferenciais, que podem contribuir para sua virulência e torná-los efetivos patógenos (GIRRAFA, 2000). São capazes de atravessar o trato gastrointestinal intacto de animais, e posteriormente disseminar-se para outros órgãos (MURRAY et al., 1998).

Os enterococos tornaram-se patógenos emergentes tanto nas infecções hospitalares como nas adquiridas na comunidade (LOW et al., 2001). Kunh et al. (2000) afirmam que os enterococos estão entre os micro-organismos mais comumente encontrados em infecções hospitalares em todo o mundo. Mais de 90% das infecções humanas enterocócicas são causadas por *E. faecalis* seguidas por *E. faecium* (KAYAOGLU; ORSTAVIK, 2004).

A infecção enterocócica humana mais comum é a do trato urinário, seguida pela infecção intra-abdominal e pélvica, bacteremia, endocardite e infecção neonatal (FACKLAN, 2002).

Para iniciar e desenvolver um processo infeccioso o patógeno precisa invadir os tecidos do hospedeiro, resistir aos mecanismos de defesa, e produzir alterações patológicas diretamente através da produção de toxinas ou indiretamente através da promoção de respostas (FRANZ, 2003).

Segundo Murray et al. (1998) as infecções por esse micro-organismo podem se originar principalmente, da microbiota normal do paciente, da transferência de micro-organismos de paciente para paciente e/ou através da equipe médico hospitalar ou da aquisição de patógenos através do consumo de água ou alimentos contaminados.

3.4 FATORES DE VIRULÊNCIA

Um fator de virulência é uma molécula efetora que aumenta a habilidade de um micro-organismo causar doença (MUNDY et al., 2000). Dentre os fatores de virulência dos enterococos reconhecidos é importante destacar: a citolisina, a substância de agregação, a gelatinase, a proteína de superfície Esp e a hialuronidase.

A citolisina é uma toxina hemolítica expressa por aproximadamente 60% das cepas de *E. faecalis* (HANCOCKE e GILMORE, 2000). É capaz de lisar uma gama de células eucarióticas e procarióticas aumentando a virulência dos *E. faecalis* em modelo animal.

A produção de uma adesina denominada substância de agregação (AS) contribui para a formação de agregados celulares, facilitando a troca de materiais genéticos entre as células bacterianas (FRANZ et al., 2001).

A gelatinase é uma protease responsável pela hidrólise de gelatina, colágeno, hemoglobina e outros peptídeos bioativos. Alguns pesquisadores relacionam a produção de gelatinase com a indução de processos inflamatórios (HICKEY et al., 2003).

A proteína de superfície apresenta várias regiões, características de proteínas de superfície, reconhecidas e envolvidas no processo de adesão as células eucarióticas e evasão da resposta imune (FRANZ et al., 2001).

A hialuronidase é uma enzima extra-celular codificada pelo gene *hyl* localizado no cromossomo, e tem papel importante na doença invasiva facilitando a propagação do micro-organismo (HICKEY et al., 2003).

Os fatores de virulência enterocócicos estão presentes tanto em amostras de origem clínica, como naquelas isoladas de alimentos (EATON, GASSON, 2001).

A facilidade com que esses micro-organismos adquirem e transferem genes de resistência e/ou de virulência tem sido apontada como um importante fator de virulência dessas bactérias (MURRAY, 1998).

3.5 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

Nas últimas décadas o sucesso do tratamento das infecções humanas tem sido ameaçado pela aquisição de resistência bacteriana resultante do uso incorreto e abusivo dos antimicrobianos (KTUSUNUMA, 2008). Segundo Arias e Murray (2012) os enterococos demonstram a capacidade de desenvolver resistência a todos os antimicrobianos empregados contra eles.

A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno genético, relacionado à existência de genes contidos no micro-organismo que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação das drogas (TAVARES, 2000).

Existem dois tipos de resistência, a resistência inerente ou intrínseca, que é própria da espécie, pode decorrer de um fator inerente estrutural ou funcional e esta baseada em genes que se encontram no cromossomo (ASLANGUL et al., 2005). Segundo Oliveira e Silva (2008), um micro-organismo pode ser resistente devido a uma característica intrínseca, como a falta de um sítio de ligação para um dado antibiótico.

Outro tipo de resistência é a adquirida (transferível) resultante de alterações genéticas no genoma bacteriano e que podem ser consequência de mutações no DNA cromossômico ou da aquisição de uma nova molécula de DNA, como os plasmídeos e os transposons (MURRAY, 1990). O micro-organismo pode adquirir genes de resistência pela captura de DNA (transformação), via bacteriófagos (transdução) ou pela transferência de célula para célula (conjugação), este último é o mais importante, devido ao seu amplo espectro de hospedeiros e a localização frequente de genes de resistência em elementos

genéticos móveis como plasmídeos e transposons (CENTIKAYA, FALK e MAYHALL, 2000; TEIXEIRA e FACKLAM, 2003).

Em isolados multirresistentes (resistência a dois ou mais antimicrobianos diferentes), podem ser encontrados três diferentes sistemas de conjugação (MURRAY, 1998). No primeiro, a transferência do plasmídeo conjugativo envolve a presença de feromônios (oligopeptídeos) secretados por células receptoras e doadoras contendo plasmídeos, que geralmente contém genes de virulência e/ou de resistência aos antimicrobianos, que promovem a transferência conjugativa de DNA plasmidial entre cepas do mesmo gênero (MURRAY, 1998).

Outro sistema de conjugação envolve transferência de plasmídeos entre espécies diferentes de enterococos ou outros micro-organismos Gram-positivos (JETT et al., 1994). E finalmente, um terceiro tipo de troca genética pode ocorrer através de transposons conjugativos entre enterococos e micro-organismos de diferentes espécies bacterianas inclusive as Gram-negativas (JETT, HUYCKE e GILMORE, 1994).

Entre os mecanismos bioquímicos que impedem a ação dos antimicrobianos, quatro são classificados como principais: o antimicrobiano pode ser impedido de atingir seu alvo em razão de sua baixa capacidade de penetração na célula bacteriana; bombas de efluxo, gerais ou específicas, podem expulsar o antimicrobiano das células; o antimicrobiano pode ser inativado por meio de modificação ou degradação, antes ou depois da penetração na célula e o alvo do antimicrobiano pode ser modificado ou a ativação de uma via alternativa pode suprir o alvo indispensável (BOERLIN; WHITE, 2010). Para que o antimicrobiano exerça sua atividade, primeiramente deverá atingir concentração ideal no local da infecção, ser capaz de atravessar, de forma passiva ou ativa, a parede celular, apresentar afinidade pelo sítio de ligação no interior da bactéria e permanecer tempo suficiente para exercer seu efeito inibitório.

Os níveis de resistência aos antimicrobianos têm aumentado e, com eles, os problemas para a terapia convencional, não somente entre as bactérias patogênicas como também entre as comensais, que constituem importantes reservatórios de genes de resistência potencialmente transferíveis para bactérias patogênicas (VAN DEN BOGAARD et al., 2000).

3.5.1 Resistência aos aminoglicosídeos

Aminoglicosídeos são antimicrobianos de amplo uso clínico, em função de sua eficácia contra bacilos Gram-negativos e de seu sinergismo positivo com outros antimicrobianos no tratamento de infecções por agentes Gram-positivos (OLIVEIRA; CIPULLO; BURDMANN, 2006).

O grupo dos aminoglicosídeos inclui os antimicrobianos: gentamicina, tobramicina, ampicacina, netilmicina, canamicina, estreptomicina, dibenkacina e a neomicina (HERNÁNDEZ, 1998).

Os aminoglicosídeos só apresentam efeito sinérgico quando associados aos antimicrobianos β -lactâmicos ou glicopeptídeos (ZARRILI et al., 2005). Exercem seu papel bactericida por interferirem na síntese de proteínas pela ligação a porção 16S rRNA da subunidade 30S do RNARr (HERNÁNDEZ, 1998).

Os enterococos apresentam resistência adquirida aos antimicrobianos aminoglicosídeos (FURTADO et al., 2005). Resistência a elevadas concentrações devido à presença de enzimas modificadoras destes antibióticos, é extremamente difundida entre os enterococos (CENTINKAYA; FALK; MAYHALL, 2000). Essas enzimas através da modificação fazem com que o antibiótico fique inativado, tais enzimas podem ser: fosfotransferases, acetiltransferases ou nucleotidiltransferases (FURTADO et al., 2005).

3.5.2 Resistência aos glicopeptídeos

Vancomicina ou teicoplanina são importantes alternativas terapêuticas contra enterococos resistentes a determinados antimicrobianos (KLARE et al., 2003) e a resistência a este tipo de antimicrobiano é preocupante (LÓPEZ et al., 2009).

Casos de enterococos resistentes à vancomicina (VRE) foram relatados pela primeira vez em infecções humanas no final da década de 1980 na França e Reino Unido e, desde então, VRE foram encontrados no mundo todo (LÓPEZ et al., 2009). No Brasil, os primeiros relatos de VRE ocorreram em Curitiba em 1996 (DALLA et al., 1998).

Os glicopeptídeos inibem a síntese da parede celular de bactérias sensíveis através de sua ligação de alta afinidade e extremidade terminal da D-alanina-D-alanina de unidades precursoras da parede celular (REMONATTO et al., 2005). A resistência resulta de uma alteração do alvo D-alanil-D-alanina em D-alanil-D-lactato, que apresentam baixa afinidade com os glicopeptídeos, devido à ausência de um local crítico para a ponte de hidrogênio (GAMA, 2008).

A resistência aos glicopeptídeos é induzível e transferível, situando-se os genes de resistência no cromossomo, em plasmídeos e transposons, e o mecanismo bioquímico desta resistência consistem em modificações na estrutura da parede celular (HOUBEN, 2003).

Segundo Arthur, Molinas e Depardieu (1993) a resistência dos enterococos a teicoplanina e vancomicina está relacionada à presença do gene *vanA* que é adquirido através do transposon Tn1546 ou Tn3. A resistência à vancomicina e não a teicoplanina esta relacionada à presença do gene *vanB*, normalmente localizado no cromossomo bacteriano ou carregado por plasmídeos (REMONATTO et al., 2005). Os genes *vanA* e *vanB* são clinicamente importantes entre as espécies *E. faecalis* e *E. faecium*, sendo que *vanA* é o tipo mais encontrado. O baixo nível de resistência a vancomicina e a teicoplanina esta relacionado aos genes *vanC1*, *vanC2* e *vanC3* e o nível intermediário ao gene *vanD* (HOUBEN, 2003).

Promotores de crescimento como o glicopeptídeo avoparcina, podem ser um grave problema para a saúde humana, uma vez que podem desenvolver resistência antimicrobiana a outros glicopeptídeos, como a vancomicina. O uso de avoparcina no Brasil destinado a alimentação animal foi suspenso em 1998 (BRASIL, 1998). Bogaard e Stobberingh (2000) relatam que desde a proibição de avoparcina nos países da União Européia (UE) em 1997, houve uma diminuição significativa na prevalência de enterococos resistentes a vancomicina em produtos cárneos.

3.5.3 Resistência aos β -lactâmicos

Os antimicrobianos β -lactâmicos correspondem às penicilinas, aminopenicilinas (amoxicilina), cefalosporinas, carbapenens (imipenen) e monobactâmicos (aztreonan) (ROSÁRIO; GRUMACH, 2006). As penicilinas têm uma maior atividade contra os

enterococos, seguido de carbapenens, as cefalosporinas são os antimicrobianos que têm menor efeito contra os enterococos (CERCENADO, 2011).

Esse grupo de antimicrobianos inibe enzimas importantes que intervêm na formação do peptidoglicano (as transpeptidases, carboxipeptidases e transglicosidases), diminuindo a força da parede celular até provocar a morte da bactéria (POETA et al., 2006).

A resistência dos enterococos aos antimicrobianos pertencentes à classe dos β -lactâmicos é do tipo intrínseca. A resistência pode ocorrer devido a alterações das proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs) e através da produção de enzimas β -lactamases que hidrolisam as penicilinas e cefalosporinas. (ASLANGUL et al., 2005).

3.5.4 Resistência as quinolonas

As quinolonas, onde se insere a ciprofloxacina e a norfloxacina, são uma classe de antimicrobianos com atividade tipicamente bactericida, frente a um grande número de espécies bacterianas (TRUCCO, 2000). Entre 2 a 4 horas após a sua administração oral, caso sejam ingeridos produtos que contenham cátions do tipo cálcio, magnésio, ferro e zinco, a concentração sérica das quinolonas pode ser reduzida entre 25-90% (ALÓS, 2009). Atuam sobre as enzimas topoisomerase II e IV (Gram-positivos) e DNA girase (Gram-negativos) dos micro-organismos (KOLLAR et al., 2006).

A topoisomerase atua na síntese do DNA (ALÓS, 2009), comprometendo a replicação do DNA, que culmina na morte celular (MARTÍNEZ, 2005). O mecanismo de resistência dos enterococos a esses antimicrobianos ocorre basicamente por mutações nos genes *parC* e *gyrA* do DNA bacteriano (KOLAR et al., 2006).

3.5.5 Resistência à tetraciclina

Tetraciclina são moléculas naturais ou semi-sintéticas com um núcleo hidronaftaceno, que contem 4 anéis fundidos ao qual podem unir-se distintos radicais que darão lugar a diferentes tetraciclinas (CALVO, MARTÍNEZ, 2009).

As tetraciclinas têm efeito bacteriostático devido a sua associação reversível entre o antimicrobiano e o ribossomo, atua unindo-se a subunidade 30S do ribossomo da bactéria, durante a fase inicial da síntese de proteínas (MARTINEZ et al., 2005). Estes compostos podem também unir-se aos ribossomos 80S das células humanas e efetuar a mesma ação, no entanto, necessitam de meios de transportes específicos da membrana bacteriana (CALVO, MARTÍNEZ, 2009).

Entre os micro-organismos deste gênero são reconhecidos dois grandes grupos de genes associados à resistência à tetraciclina (genes *tet*) (CHOPRA e ROBERTS, 2001). O primeiro grupo inclui os genes *tetM*, *tetO* e *tetS*, e confere resistência através da proteção ribossômica detectada no gênero *Enterococcus*. Um segundo grupo que atua por um mecanismo de efluxo da tetraciclina das células, dependente de energia, é representado nos enterococos pelos genes *tetK* e *tetL* (RIDENHOUR et al., 1996).

A resistência a tetraciclina, é um dos fenótipos de resistência adquirida de maior ocorrência, encontrados em 65% do *Enterococcus* isolados de alimentos em estudo realizado por Roberts et al. (2003).

3.5.6 Resistência ao cloranfenicol

O cloranfenicol é um agente terapêutico ativo contra enterococos (DESHPANDE et al., 2007). Atua inibindo a síntese de proteínas nas bactérias através de uma ligação reversível a subunidade ribossômica 50S (LAZO; BRUNTON; PARKER, 2006). A resistência adquirida se deve a produção bacteriana da enzima cloranfenicol acetiltransferase, que acetila a molécula do antimicrobiano impedindo a união deste com os ribossomos (DESHPANDE et al., 2007).

3.5.7 Resistência aos macrolídeos

Os macrolídeos são antimicrobianos bacteriostáticos que inibem a síntese de proteínas através de suas ligações reversíveis a subunidades ribossômicas 50S, dentro dessa

classe destaca-se o antimicrobiano eritromicina (LAZO; BRUNTON; PARKER, 2006). O principal mecanismo de resistência adquirida aos macrolídeos entre os enterococos é a alteração do sítio de ligação atribuída por uma enzima que metila um resíduo de adenina na porção 23S da subunidade 50S do RNA ribossomal, dificultando a ligação do antimicrobiano ao ribossomo (ROBERTS et al., 1999).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAGEM

Foram analisadas 36 amostras de alimentos, sendo 16 amostras provenientes de carne crua de frango (cortes resfriados), 10 de carne crua suína (cortes resfriados), 6 amostras de produtos processados preparados à base de carne suína (apresentado, presunto, salsicha, mortadela, linguiça cozida e frescal) e 4 amostras a base de carne de frango (salsicha, patê, empanado e mortadela).

As amostras pertenciam a diversas marcas e estavam dentro do prazo de validade, sendo adquiridas simulando a situação real de compra pelo consumidor no comércio das cidades de Medianeira e Londrina/PR, no período de junho de 2012 a abril de 2013.

As amostras estavam dispostas à venda em balcões frigoríficos nas embalagens originais, constituídas por bandejas de poliestireno expandido (cortes), polietileno de baixa densidade e *nylon poly* (produtos cárneos processados) e foram transportadas para o laboratório nas condições normais de aquisição (transporte sem refrigeração), posteriormente foram mantidas sob refrigeração até serem submetidas às análises microbiológicas, respeitando-se os prazos para consumo dos produtos.

As embalagens foram limpas e desinfetadas com álcool 70% em toda a superfície externa. A retirada das peças ocorreu observando-se os cuidados de assepsia necessários para a manipulação dos produtos.

4.2 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE *ENTEROCOCCUS* SPP A PARTIR DE AMOSTRAS DE CARNE

Para o isolamento de *Enterococcus* spp a partir de amostras de carne, foi realizada uma etapa de pré-cultivo. Para tanto, 10 gramas de cada amostra foram retiradas de várias partes do produto e foram depositadas em frascos contendo 90 mL de água peptonada a 0,1%, seguida de incubação a 37°C sob agitação constante de 120 rpm por 16-18 h. Após o período de incubação, procedeu-se diluições seriadas até a diluição 10^{-5} e 0,1 mL de cada diluição foi semeada na superfície de ágar KEA (kanamicina esculina ázida). As placas foram incubadas a 37°C por 24-48 h.

Seis colônias negras sugestivas de enterococos foram coletadas aleatoriamente de cada placa e transferidas para tubos contendo 0,5 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion Broth*) e incubadas a 37°C por um período de 24 h, com o objetivo de permitir o crescimento do micro-organismo em um meio de cultura sem os inibidores presentes na cultura primária. Esta cultura foi utilizada nos testes de identificação fenotípica e genotípica.

As amostras bacterianas foram submetidas aos testes fenotípicos convencionais com base nas metodologias descritas por Facklam et al. (1999). As colônias foram submetidas aos testes: observação da característica morfotintorial pela técnica da coloração de Gram; produção da enzima catalase; crescimento em presença de 6,5% de NaCl; crescimento em pH 9,6 e crescimento em temperatura de 10°C e 45°C.

As colônias provenientes das amostras de carne crua de frango foram denominadas pela letra F, seguida pelo número do produto adquirido de 1 a 16 e pela letra C (colônia), seguida do número 1 a 6. As amostras de carne crua suína foram designadas pela letra S seguida do número 1 a 10 e letra C acompanhada do número 1 a 6, as amostras de produtos industrializados foram denominadas pelas letras iniciais dos respectivos produtos, seguido do número 1 a 6.

Os isolados bacterianos que se apresentaram como cocos Gram-positivos, catalase negativos, com crescimento positivo em caldo de NaCl 6,5%, em caldo com pH 9,6 e em temperatura de 10°C e 45°C, foram considerados como pertencentes, presuntivamente, ao gênero *Enterococcus* e foram submetidos aos testes de identificação genotípica.

4.3 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

O DNA de cada isolado foi obtido pela técnica da fervura, seguindo recomendações descritas por Marques e Suzart (2004). Para tanto, as bactérias foram cultivadas em meio BHI, incubadas a 37°C sob agitação constante (180 rpm) por 18 h. Após este período, as bactérias foram centrifugadas por 10 min a 10.000 rpm, no qual o sedimento foi ressuspenso em 0,3 mL de água ultrapura esterilizada. A suspensão de células foi submetida ao aquecimento a 100°C por 30 min. Em seguida foram novamente centrifugadas, nas mesmas condições descritas acima, e por fim 0,15 mL do sobrenadante contendo DNA foram retirados e armazenados em *freezer* a -20°C.

4.4 IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA

Todos os isolados de enterococos foram submetidos à técnica molecular da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para confirmação do gênero *Enterococcus* spp, identificação das espécies e genes de resistência à vancomicina e tetraciclina (tabela 1).

Tabela 1 – Oligonucleotídeos iniciadores empregados para confirmação do gênero, identificação das espécies e genes de resistência a vancomicina e tetraciclina em *Enterococcus* sp

	Gene	Sequência Nucleotídica (5' - 3')	Produto (pb)
<i>Enterococcus</i> spp	<i>tuf</i>	TACTGACAAACCATTTCATGATG AACTTCGTCAACCAACGCGAAC	112
<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC-1</i>	GGTATCAAGGAAACCTC CTTCCGCCATCATAGCT	822
<i>E. casseliflavus</i> / <i>E. flavencens</i>	<i>vanC-2/vanC-3</i>	CTCCTACGATTCTCTTG CGAGCAAGACCTTTAAG	439
<i>E. faecalis</i>	<i>ddl_{E.faecalis}</i>	ATCAAGTACAGTTAGTCT ACGATTCAAAGCTAACTG	941
<i>E. faecium</i>	<i>ddl_{E.faecium}</i>	TAGAGACATTGAATATGCC TCGAATGTGCTACAATC	550
Vancomicina	<i>vanA</i>	GTAGGCTGCGATATTCAAAGC CGATTCAATTGCGTAGTCCAA	231

	<i>vanB</i>	GCCGACAATCAAATCATCCTC GCCGACAATCAAATCATCCTC	330
Tetraciclina	<i>tet(L)</i>	GTMGTTGCGCGCTATATTCC GTGAAMGRWAGCCACCTAA	696

Fonte: Dutka-Malen; Evers e Courvalin (1995); Bell; James e John (1998); Gevers et al. (2003).

A mistura de amplificação foi preparada com 2,0µl de tampão (10x); 1µl de MgCl₂ (25mM); 1,4µl de desoxinucleotídeos (0,17 µM); 1µl de cada iniciador (1 pmol); 0,1µl de Taq DNA Polimerase (1U), 2µl de DNA bacteriano e 13,5µl de água deionizada ultra pura totalizando 20µl da mistura de amplificação. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador, no seguinte programa: desnaturação a 95°C (4 minutos), e 30 ciclos de 95°C (30 segundos), 60°C (1 minuto), 72°C (1 minuto). O amplicon foi separado em gel de agarose a 1,0%, corados com brometo de etídeo e fotodocumentado. O tamanho do produto amplificado foi comparado com o marcador de DNA ladder (*Amersham Pharmacia Biotech*).

4.5 DETERMINAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

A avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos foi realizada pela técnica do teste de disco-difusão em ágar, conforme recomendações do *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2011). Os ensaios foram realizados a partir de cultivos recentes dos isolados em ágar BHI, obtidos após incubação a 37°C por 24 h. Foram preparadas suspensões bacterianas em solução salina a 0,85% esterilizada, com turbidez semelhante à da solução padrão 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente 1×10^8 UFC/ml). As suspensões foram semeadas, com ajuda de “swabs” esterilizados sobre a superfície de placas de petri contendo ágar MHA (*Mueller-Hinton*).

Sobre a superfície dos meios inoculados foram colocados discos de papel de filtro impregnados com os seguintes antimicrobianos testados: Ampicilina-AM (10µg), Ciprofloxacina-CI (5µg), Cloranfenicol-CO (30µg), Eritromicina-ER (15µg), Estreptomicina-ES (300µg), Gentamicina-GE (120µg), Imipenem-IM (10µg), Norfloxacin-NO (10µg), Penicilina-PE (10µg), Tetraciclina-TT (30µg), Teicoplanina-TE (30µg) e Vancomicina-VA (30µg).

As placas foram incubadas por 18-24 h a 37°C e os halos de inibição foram mensurados e interpretados segundo tabelas de sensibilidade a antimicrobianos. Para o controle de qualidade (CQ) dos testes de suscetibilidade foram utilizadas amostras de ATCC 25923 (*American Type Culture Collection*) de *Staphylococcus aureus*. Os isolados de enterococos que tiveram a espécie identificada foram submetidos à técnica de PCR para detecção dos genes *vanA* e *vanB*, que conferem resistência à vancomicina e do gene *tet(L)* envolvido na resistência à tetraciclina (tabela 1). A reação de PCR foi submetida ao seguinte programa: ciclo de desnaturação inicial a 94°C (2 minutos) e 30 ciclos a 94°C (1 minuto), 54°C (1 minuto), 72°C (1 minuto).

REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F.M. et al. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. p. 2054-2059, 2001.

AARESTRUP, F.M. et al. Antimicrobial Resistance among Enterococci from Pigs in Three European Countries. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 8, p. 4127-4129, 2002.

ABIPECS – Associação brasileira da indústria produtora e exportadora da carne suína. **Relatório anual 2012/2013**. Disponível em: <http://www.abipecs.com.br/>. Acesso em: 18 de mar. de 2014.

ALÓS, J. I. Quinolonas. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 27, n. 5, p. 290-297, mar. 2009.

ARIAS, A.C. e MURRAY, B.E. The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. **Reviews**, v. 10, 266-278, abr. 2012.

ARTHUR, M.; MOLINAS, C.; DEPARDIEU, F. Characterization of TN1546, a TN3-related transposon conferring glycopeptides resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. **Journal of bacteriology**, v. 175, n.1, p. 117-121, 1993.

ASLANGUL, E. et al. Relationship between the level of acquired resistance to gentamicin and synergism with amoxicillin in *enterococcus faecalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 10, p. 4144-4148, 2005.

BRASIL. Circular nº 175 publicada em 16 de maio de 2005. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**. Disponível em:
<https://www.google.com.br/#q=ministerio+da+agricultura+circular+175+autocontroles>.
 Acesso em: 19 de mar. de 2014.

BELL, J.M.; JAMES, C.; JOHN, T. Emergence of Vancomycin-Resistant Enterococci in Australia: Phenotypic and Genotypic Characteristics of Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p.2187-2190, 1998.

BOERLIN, P. e WHITE, D. G. Resistência antimicrobiana e sua epidemiologia. In: GIGUÉRE S. et al. **Terapia Antimicrobiana em Medicina Veterinária**, 4ª edição, São Paulo: Roca, 2010.

BOGAARD, V.D.A.E. e STOBBERINGH, E.E. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. **Journal Antimicrobial Agents**, v. 16, p. 327-335, 2000.

BRASIL. Portaria SVS/MS nº 818 publicada em 16 de outubro de 1998. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**. Disponível em:<
<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=abreLegislacaoFederal&chave=50674&tipoLegis=A>>. Acesso em: 24 ago. 2013.

CALVO, L. e MARTINÉZ, L.M. Desarrollo de las resistencias a los antibióticos: causas, consecuencias y su importancia para la salud pública. **Enfermedades Infecciosas Microbiology Clinical**, p. 4-9, 2009.

CENTENO, J.; MENENDEZ, S.; RODRÍGUES, J. Main microbial flora present as natural starters in Cebreiro raw cow`s-milk cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 33, p. 307-313, 1996.

CENTIKAYA, Y.; FALK, P.; MAYHALL, C. G. Vancomycin-resistant enterococci. **Clinical Microbiology Review**, v. 13, p. 686-707, 2000.

CERCENADO, E. *Enterococcus*: resistencias fenotípicas y genotípicas y epidemiologia em España. **Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clínica**, Madrid, v. 29, n. 5, p. 59-65, 2011.

CHOPRA, I e ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiol. Molecular Biology Review**, v. 65, p. 232 – 260, 2001.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE – CLSI / NCCLS, 2011. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty – first informational supplemented. *Clinical and Laboratory Standard Institute*, Wayne, Pa, USA 31.

DALLA, L. M. C. et al. Vancomycin-resistant *enterococcus faecium*: first case in Brazil. **Brazilian Journal Infect**, v. 2, n. 3, p. 3-160, 1998.

DESHPANDE, L. M. et al. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from North America and Europe: a report from the Senti antimicrobial surveillance program. **Diagnostic Microbiology and infectious Disease**, v. 58, p. 163-170, 2007.

DUTKA-MALEN, S.; EVERS, S.; COURVALIN, P. Detection of glycopeptides resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant Enterococci by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p.24-27, 1995.

EATON, T. J. e GASSON, M. J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. **Applied Environmental Microbiology**, v. 67, p. 4385 – 4389, 2001.

FACKLAM, R. What happened to streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 15, p. 613-630, 2002.

FRANCO, B.D.G.M. e LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo. Atheneu, p. 182, 1996.

FRANZ, C.M.A.P; HOLZAPFEL, W.; STILES, M. *Enterococci* at the crossroads of food safety. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 47, p. 1-24, 1999.

FRANZ, C. M. A. P. et al. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among *enterococci* isolated from food. **Applied and Environmental Microbiology**, Ghent, v. 67, p. 4385-4389, set. 2001.

FRANZ, C. M. A. P. et al. *Enterococci* in foods – a conundrum for food safety. **International Journal Food Microbiology**, v. 88, p.105 – 122, 2003.

FREITAS, A. et al. Microbiological characterization of picante da beira baixa cheese. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 59, p.155-160, 1995.

FURTADO, G. H. C. et al. Incidência de *enterococcus* resistente a vancomicina em hospital universitário no Brasil. **Revista Saúde Pública**, v. 39, p. 41-46. 2005.

GEVERS, D.; DANIELSEN, M.; HUYS, G. et al. Molecular characterization of *tet(M)* genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry sausage. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.1270-1275, 2003.

GIRAFFA, G. Enterococci from foods. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 26, p.163-171, 2002.

GORDON, C.L. e AHMAD, M.H. Thermal susceptibility of *Streptococcus faecium* strains isolated from frankfurters. *Canadian Journal of Microbiology*. v.37, p. 609-612, 1991.

HANCOCKE, L. E. e GILMORE, M. S. Pathogenicity of enterococci p. 251 258, In: V. A. Fishetti, R. P., Novick, J. J., Ferreti, D. A. Portnoy & J. I. Road. (ed.), 2000, Gram positive Pathogens. **ASM press**, Washington, D. C.

HARDIE, J.M.; WHILEY, R.A. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus* . **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, p.1-11, 1997.

HELMS, M. et al. Excess mortality associated with antimicrobial drug-resistant *Salmonella* Typhimurium. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v.8, p.490-495, 2002.

HERNÁNDEZ, E. B. **Aminoglucósidos**. *Acta Medica*, v. 8, n.1, p. 48-53, 1998.

HICKEY, R.M. et al. Production of enterolysin a by raw milk enterococcal isolate exhibiting multiple virulence factors. **Microbiology**, v. 149, p. 655-664, 2003.

HOUBEN, J. H. The potential of vancomycin-resistant *enterococci* to persist in fermented and pasteurised meat products. **International Journal of Food Microbiology**, Netherlands, v. 88, p. 11-18, jan. 2003.

HUGAS, M.; Garriga, M.; Aymerich, M. Functionalty of *enterococci* in meat products. **International Journal of Food Microbiolog**, Spain, v. 88, p. 223-233, fev. 2003.

JETT, B. D., HUYCKE, M. M. e GILMORE, M. S. Virulence of *enterococci*. **Clinical Microbiology Review**, v. 7, 462 – 478, 1994.

KAÇMAZ, B. e AKSOY, A. Antimicrobial resistance of *enterococci* in Turkey. **International Journal of Antimicrobial Agentes**, Turkey, v. 25, p. 535-538, fev. 2005.

KAYAOGLU G. e ORSTAVIK D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. **Critical Review Oral Biology Medical**, v.15, p. 20-308, 2004.

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

KLEIN G. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of *enterococci* from food and the gastro-intestinal tract. **International Journal of Food Microbiology**, v.88, p. 123-131, 2003.

KOLAR, M. D. The influence of antibiotic use on the occurrence of vancomycin-resistant enterococci. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 31, p. 67-72, feb. 2006.

KUHN, I. et al. Epidemiology and ecology of *enterococci*, with special reference to antibiotic resistant strain, in animals, humans and the environment. Exemple of an on going project within de European research programme. **International Journal of Antimicrobial Agentes**, v. 14, p. 337-342, 2000.

KTUSUNUMA, Y. et al. Comparasion of pulsed-fiel gel electrophoresis patterns of antimicrobial-resistance Escherichia coli and enterococci isolates from the feces of livestock and livestock farmers in Japan. **Journal General Applied Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 39-50, 2008.

LAZO, J. S.; BRUNTON, L. L.; PARKER, K. L. **Goodman e Gilman as bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: Mcgraw Hill, p. 999-1055, 2006.

LEVINSON, W. e JAWETZ, E. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 451, 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.

LOW, D. E. et al. Clinical prevalence, antimicrobial susceptibility, and geographic resistance patterns of *enterococci*: results from the Sentry Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 2, p. 133-45, 2001.

MARQUES, E. B. e SUZART, S. Occurrence of virulence-associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina Brazil. **Journal Medical Microbiology**, v.53, p.1069 -1073, 2004.

MARTÍNEZ, J. M. R. Mecanismos de resistência a quinolonas mediada por plásmidos. **Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 23, n. 1, p. 25-31, jan. 2005.

MOLBAK, K. et al. An outbreak of multidrug-resistant, quinolone-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104. **The New England Journal of Medicine**, v.341, p.1420–1425, 1999.

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

MUNDY, L. M., SAHN., D. F. & GILMORE, M. S. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance in enterococci. **European Journal Clinical Microbiology Infectious Disease**, 9: 90 – 102, 2000.

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

MURRAY, P. et al. **Microbiologia Médica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

OLIVEIRA, J. F. P.; CIPULLO, J. P.; BURDMANN, E. A. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, v. 21, p. 444-452, 2006.

PERDIGON, G. et al. Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milks with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. **Immunology**, v. 63, n. 1, p. 17-23, 1998.

POETA, P. et al. Antimicrobial resistance and the mechanisms implicated in faecal enterococci from healthy humans, poultry and pets in Portugal. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 27, p. 131-137, 2006.

REMONATTO, G.; BOLZAN, V.; ZANCHI, AC.; e DAZEVEDO, P.A. Detecção molecular da resistência bacteriana – ênfase para *Enterococcus* e *Streptococcus*, **NewsLab**, p. 100-112, 2005.

RIDENHOUR, M. B. et al. A novel tetracycline- resistant determinant, *tet(U)*, is encoded on the plasmid pKQ 10 in *Enterococcus faecium*. **Plasmid**, v. 35, p.71 – 80, 1996.

ROBERTS, et al. Characterization of unusual tetracycline-resistant gram-positive bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.35, p.1555-1557, 2003.

ROSÁRIO, N. A. e GRUMACH, A.S. Alergia a beta-lactâmicos na clínica pediátrica: uma abordagem prática. **Jornal de Pediatria**. Rio de Janeiro, p.181-188, 2006.

SCHWARZ, S.; KEHRENBURG, C.; WALSH, T.R. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 17, p. 431-442, 2001.

SILVA, N., et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo. Livraria Varela, 2007.

SMITH, T.L. et al. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **New England Journal Medicine**, v.340, p.493-501, 1999.

TAVARES, V. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do *estafilococo*, do *enterococos* e do *pneumococo* aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, p. 281-301, jun. 2000.

TEIXEIRA, L. M.; FACKALM, R.R. *Enterococcus*. In: **Manual of Clinical Microbiology**. Ed. MURRAY P.R.; BARON E.J.; JORGENSEN J.H.; PFALLER, M.A.; YOLKEN R.H. 8ª edição. ASM Press, Washigton, p. 623-635, 2003.

TIECCO, G. Microbiologia degli alimenti di origine animale. Edagricole –**Edizione Agricole**, Bologna, 51 – 87, 1992.

TURTURA, G. C. & LORENZELLI, P. Gram – positive cocci isolated from slaughtered poultry. **Microbiology Research**, v. 149, p. 203 – 213, 1994.

UBABEF – União Brasileira de Avicultura. **Relatório anual 2012/2013**. Disponível em: <http://www.ubabef.com.br/>. Acesso em: 18 de mar. de 2014.

VAN DEN BOGAARD, A. E., N. BRUINSMA & E. E. STOBBERING. The effect of banning avoparcin on VRE carriage in The Netherlands. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, p. 146 -147. 2000.

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.

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

APRESENTAÇÃO DO ARTIGO

Essa dissertação é composta por um artigo científico.

Revista: Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

Ocorrência de *Enterococcus* sp resistentes a antimicrobianos em carne suína e de frango cruas e processadas.

Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Enterococcus* Species Isolated from Meats

L. F. Maia^{1*}, C. Giraldi¹, V. P. Feltrin¹, M. R. Terra², T. Saito², M. C. Furlaneto².

1 - Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR–PR

2 - Universidade Estadual de Londrina – UEL - PR

* autor correspondência: lucianamaia@utfpr.edu.br

Resumo

Vinte e seis amostras de carnes cruas (frango e suíno) e dez produtos de carnes processadas foram adquiridos de diferentes supermercados no interior do estado do Paraná, para verificar a

presença de *Enterococcus* sp e seu perfil de resistência aos antimicrobianos. Isolados de enterococos foram recuperados em 38,88% de amostras de frango, 19,44% de carne suína e 2,7% de alimentos cárneos processados. A espécie predominante foi *E. faecium* (40%) , seguido por *E. faecalis* (10%) e *E. casseliflavus* /*E. flavencens* (3%). No teste de susceptibilidade antimicrobiana 100% dos isolados de *E. faecium* foram resistentes à estreptomicina, ciprofloxacina, norfloxacina, eritromicina, vancomicina e tetraciclina. *E. casseliflavus*/*E. flavencens* foram resistentes a gentamicina, estreptomicina, ciprofloxacina, norfloxacina, eritromicina e tetraciclina. *E. faecalis* foi resistente a ciprofloxacina, tetraciclina, eritromicina (92%), norfloxacina (83%), vancomicina e estreptomicina (50 %). Todos os isolados foram caracterizadas quanto a presença do gene de resistência *vanA*, *vanB* e *tet(L)* por meio de PCR, sendo que o gene *tet(L)* apareceu com maior frequência. Os resultados sugerem que esses micro-organismos multirresistentes conferem um potencial risco à saúde pública, devido à possível aquisição desses micro-organismos e seus elementos genéticos móveis através da cadeia alimentar e posterior disseminação para outros micro-organismos presentes na microbiota intestinal dos seres humanos.

Palavras-chave: *Enterococcus*. Antimicrobianos. Resistência.

Abstract

Twenty six products of raw meats (chicken and pork) and ten processed meats were acquired from different supermarkets from Paraná state and cultured for the presence of *Enterococcus* sp and profile of antimicrobial resistance. A total of 54 enterococcal isolates were recovered from the samples, with contamination rates ranging from 38.88% of chicken samples, 19.44% of pork and 2.7% boiled meats samples. *Enterococcus faecium* was the predominant species recovered (40%), followed by *E. faecalis* (10%) and *E. casseliflavus*/*E. flavencens* (3%). The antimicrobial susceptibility test showed that the isolates were resistant to at least one antibiotic. The results showed that 100% of *E. faecium* were resistant to streptomycin, ciprofloxacin, norfloxacin, erythromycin, vancomycin and tetracycline. *E. casseliflavus*/*E. flavencens* was resistant to gentamicin, streptomycin, ciprofloxacin, norfloxacin, erythromycin and tetracycline. *E. faecalis* were resistant to ciprofloxacin, tetracycline, erythromycin (92%), norfloxacin (83%), vancomycin and streptomycin (50%). In genotype by PCR, there were detected *vanA*, *van* and *tet(L)* resistance genes, the last one most often verified. The results suggest that these multiresistant microorganisms provide a potential public health risk due to the possible acquisition of these microorganisms and their mobile

genetic elements through the food chain and later spread to other micro-organisms present in the gut microbiota of humans.

Key-word: *Enterococcus*. Antimicrobial. Resistant.

INTRODUÇÃO

Enterococcus sp são organismos comensais da microbiota intestinal do homem e diversos animais, como pássaros, insetos e répteis. Também são facilmente encontrados no solo, plantas e água. Porém a resistência intrínseca a diversos agentes antimicrobianos e a capacidade de adquirir genes de resistência os tornam de grande relevância em ambiente hospitalar, causando severas infecções sistêmicas, bacteremias e endocardites (López *et al.*, 2009; Donabedian *et al.*, 2010). Portanto, não é surpreendente que cepas resistentes de enterococos aos antimicrobianos foram isoladas de carnes, produtos lácteos e alimentos prontos para o consumo (Riboldi *et al.* 2009).

Há diversos fatores ambientais que propiciam a seleção de isolados resistentes, contudo há crescentes evidências, com base científicas e relatos de autoridades internacionais de saúde pública, que sugerem a potencial relação entre a resistência antimicrobiana e as práticas veterinárias (Funk *et al.*, 2006; Rosengren *et al.*, 2009; Efsa, 2010). A administração de antimicrobianos na ração animal é usada para promoção do crescimento, ou a profilaxia e tratamento de infecções podem conduzir a uma seleção de bactérias resistentes, podendo ser transmitidas através da cadeia alimentar (Aarestrup *et al.*, 2001; Vignaroli *et al.*, 2011), ou pela transferência horizontal de genes de resistência para a microflora comensal (McDermott, *et al.*, 2002).

Estudos realizados no Sul do Brasil isolaram enterococos resistentes aos antimicrobianos em vários alimentos de origem animal (Riboldi *et al.*, 2008). No entanto, no Brasil, ainda há poucos levantamentos sobre a ocorrência de cepas de enterococos resistentes em alimentos (Campos *et al.*, 2013). Este trabalho objetivou isolar e verificar o perfil de *Enterococcus* sp presentes em amostras de carne crua e processada.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisadas 36 amostras de alimentos, sendo 16 amostras de carne crua de frango, 10 de carne crua suína, 6 produtos processados preparados à base de carne suína (apresentado, presunto, salsicha, mortadela, linguiça cozida e frescal) e 4 produtos a base de carne de frango (salsicha, patê, empanado e mortadela).

Para o isolamento de *Enterococcus* spp foi realizada a etapa de pré-cultivo, após procedeu-se diluições seriadas e semeadura em ágar KEA (kanamicina esculina ázida) seguida de incubação. Colônias negras sugestivas de enterococos foram transferidas para tubos contendo 0,5 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion Broth*) e incubadas a 37°C por um período de 24 h. As colônias foram submetidas aos testes: característica morfotintorial pela técnica da coloração de Gram; produção da enzima catalase; crescimento em presença de 6,5% de NaCl; crescimento em pH 9,6 e crescimento em temperatura de 10°C e 45°C (Facklam et al., 1999).

O DNA de cada isolado foi obtido pela técnica da fervura, seguindo recomendações descritas por Marques e Suzart (2004). Todos os isolados de enterococos foram submetidos à técnica molecular da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para confirmação do gênero *Enterococcus*, identificação das espécies e genes de resistência à vancomicina e tetraciclina (tab. 1).

Tabela 1 – Oligonucleotídeos iniciadores empregados para confirmação do gênero, identificação das espécies e genes de resistência a vancomicina e tetraciclina em *Enterococcus* spp

	Gene	Sequência Nucleotídica ^a (5' - 3')	Tamanho do produto (pb)
<i>Enterococcus</i> spp	<i>tuf</i>	TACTGACAAACCATTTCATGATG AACTTCGTCACCAACGCGAAC	112
<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC-1</i>	GGTATCAAGGAAACCTC CTTCCGCCATCATAGCT	822
<i>E. casseliflavus</i> / <i>E. flavescens</i>	<i>vanC-2/vanC-3</i>	CTCCTACGATTCTCTTG CGAGCAAGACCTTTAAG	439
<i>E. faecalis</i>	<i>ddl_{E.faecalis}</i>	ATCAAGTACAGTTAGTCT ACGATTCAAAGCTAACTG	941
<i>E. faecium</i>	<i>ddl_{E.faecium}</i>	TAGAGACATTGAATATGCC TCGAATGTGCTACAATC	550

Vancomicina	<i>vanA</i>	GTAGGCTGCGATATTCAAAGC CGATTCAATTGCGTAGTCCAA	231
	<i>vanB</i>	GCCGACAATCAAATCATCCTC GCCGACAATCAAATCATCCTC	330
Tetraciclina	<i>tet(L)</i>	GTMGTTGCGCGCTATATTCC GTGAAMGRWAGCCACCTAA	696

Fonte: Dutka-Malen *et al.* (1995); Bell *et al.* (1998); Gevers *et al.* (2003).

^aAbreviaturas: W = Triptofano; M = Metionina e R = Arginina.

A mistura de amplificação foi preparada com 2,0µl de tampão (10x); 1µl de MgCl₂ (25mM); 1,4µl de desoxinucleotídeos (0,17 µM); 1µl de cada iniciador (1 pmol); 0,1µl de Taq DNA Polimerase (1U), 2µl de DNA bacteriano e 13,5µl de água deionizada ultra pura totalizando 20µl da mistura de amplificação. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador, no seguinte programa: desnaturação a 95°C (4 minutos), e 30 ciclos de 95°C (30 segundos), 60°C (1 minuto), 72°C (1 minuto). O amplicon foi separado em gel de agarose a 1,0%, corados com brometo de etídeo e fotodocumentado. O tamanho do produto amplificado foi comparado com o marcador de DNA ladder (*Amersham Pharmacia Biotech*).

A avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos foi realizada pela técnica do teste de disco-difusão em ágar, conforme recomendações do *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2011). Foram testados os antimicrobianos: Ampicilina-AM (10µg), Ciprofloxacina-CI (5µg), Cloranfenicol-CO (30µg), Eritromicina-ER (15µg), Estreptomicina-ES (300µg), Gentamicina-GE (120µg), Imipenem-IM (10µg), Norfloxacin-NO (10µg), Penicilina-PE (10µg), Tetraciclina-TT (30µg), Teicoplanina-TE (30µg) e Vancomicina-VA (30µg). Após período de incubação das placas os halos de inibição foram mensurados e interpretados segundo tabelas de sensibilidade a antimicrobianos. Para o controle de qualidade (CQ) dos testes de suscetibilidade foram utilizadas amostras de ATCC 25923 (*American Type Culture Collection*) de *Staphylococcus aureus*.

Os isolados de enterococos que tiveram a espécie identificada foram submetidos à técnica de PCR para detecção dos genes *vanA* e *vanB*, que conferem resistência à vancomicina e do gene *tet(L)* envolvido na resistência à tetraciclina (tab. 1). A reação de PCR foi submetida ao seguinte programa: ciclo de desnaturação inicial a 94°C (2 minutos) e 30 ciclos a 94°C (1 minuto), 54°C (1 minuto), 72°C (1 minuto).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De um total de 36 amostras de alimentos, 61% apresentaram-se contaminadas com enterococos, sendo 38,88% em amostras de carne crua de frango, 19,44% de carne crua suína e 2,7 % de produtos cárneos processados. Destas amostras de alimentos foram analisados 54 isolados bacterianos que apresentaram características fenotípicas presuntivas para o gênero *Enterococcus* e foram submetidos à avaliação genotípica pela técnica de PCR.

Foi observada a presença do gene *tuf* que caracteriza o gênero *Enterococcus* em todos os isolados testados, apresentando o tamanho de fragmento esperado após a amplificação que foi de 112 pares de base (pb) (fig. 1). A distribuição das espécies de *Enterococcus* e suas fontes de isolamento estão apresentadas no gráfico 1.

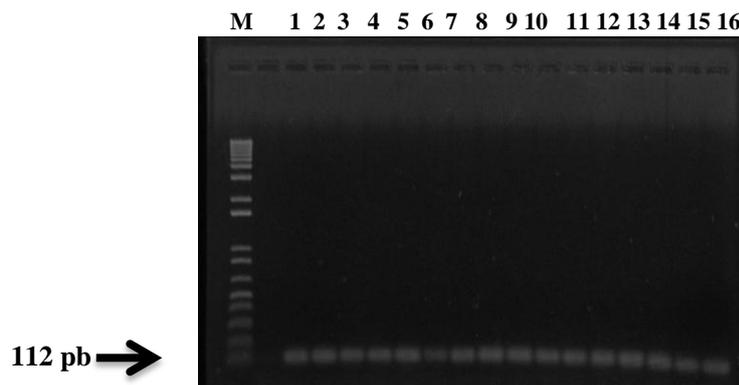


Figura 1. Gel ilustrativo da amplificação pela PCR do gene *tuf* específico para a confirmação do gênero *Enterococcus*. M: marcador de peso molecular (100 pb).

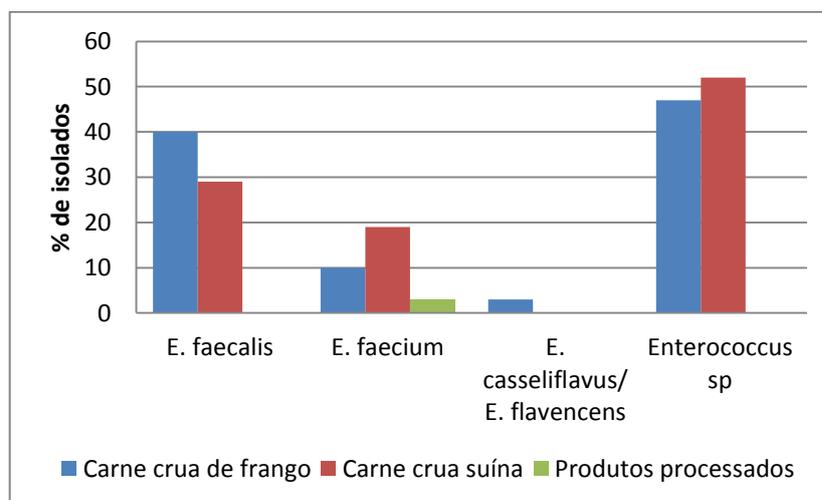


Gráfico 1. Distribuição do gênero e das espécies e fontes de isolamento de *Enterococcus* provenientes de alimentos.

A espécie encontrada em maior frequência nas amostras de carne crua de frango e suína foi *E. faecalis*, seguida de *E. faecium*, dados estes, que condizem com estudos realizados por Riboldi *et al.* (2009) no Sul do Brasil, onde detectaram a prevalência de *E. faecalis* em carne crua e queijo tipo colonial e estudos feitos por Campos *et al.* (2013) no Distrito Federal, que detectaram a prevalência de *E. faecalis* em carcaças de frango. Diversos trabalhos relatam que a espécie de maior ocorrência nos alimentos é *E. faecalis*, seguida de *E. faecium* (Aarestrup *et al.*, 2002). *E. casseliflavus/E. flavescens* teve seu isolamento apenas em produto processado. A espécie *E. gallinarum* não foi confirmada entre as amostras de alimentos analisadas. Elevado número de isolados foram identificados somente ao nível de gênero. Embora as espécies *E. casseliflavus/E. flavescens* não tenham sido isoladas com elevada frequência e de não ter sido detectado nenhum isolado pertencente a *E. gallinarum* é importante monitorá-las, pois podem estar envolvidas em infecções enterocócicas (Schouten, *et al.*, 2000).

A presença de enterococos em alimentos pode estar associada a práticas sanitárias inadequadas ou exposição do alimento a condições que permitam a multiplicação de microorganismos indesejáveis (Franco e Landgraf, 1996).

O perfil de suscetibilidade que predominou entre os isolados das amostras de carne crua de frango foi o de resistência. Cem por cento dos isolados pertencentes à espécie *E. faecium* apresentaram resistência aos antimicrobianos: estreptomicina, ciprofloxacina, norfloxacina, eritromicina, vancomicina e tetraciclina, e sensibilidade a penicilina e ampicilina. O isolado pertencente à espécie *E. casseliflavus/E. flavescens* apresentou 100% de resistência a gentamicina, estreptomicina, ciprofloxacina, norfloxacina, eritromicina e tetraciclina e sensibilidade a vancomicina, teicoplanina, imipenem, ampicilina e penicilina. Já os isolados *E. faecalis* apresentaram resistência a ciprofloxacina, tetraciclina, eritromicina (92%), norfloxacina (83%), vancomicina e estreptomicina (50%) e sensibilidade aos antimicrobianos imipenem e ampicilina (92%), gentamicina (75%) e penicilina (67%).

Entre os isolados de *Enterococcus* sp foram observados percentuais elevados de resistência para os antimicrobianos: ciprofloxacina (100%), norfloxacina (86%), eritromicina e tetraciclina (93%) e estreptomicina e vancomicina (79%). A sensibilidade foi descrita para imipenem (64%) e ampicilina (50%).

Os maiores índices de resistência intermediária ocorreram nos isolados de *E. casseliflavus*/*E. flavencens* (100%), seguidos de *E. faecium* (67%), *E. faecalis* (50%), e *Enterococcus* sp (28%) frente ao antimicrobiano cloranfenicol. Relatos de resistência intermediária devem ser considerados como um alerta, pois cepas intermediárias podem vir a migrar para o grupo das cepas resistentes, caso o uso de antimicrobianos indevido esteja ocorrendo (Campos *et al.*, 2013). A tab. 2 apresenta o perfil de multirresistência dos isolados de *Enterococcus* frente aos antimicrobianos.

Tabela 2. Distribuição dos perfis de multirresistência entre as cepas de *Enterococcus* isoladas de carne crua de frango

Perfis de multirresistência ^a	Número de isolados de acordo com as espécies e <i>Enterococcus</i> sp			
	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. casseliflavus</i> / <i>E. flavencens</i>	<i>Enterococcus</i> sp
CI VA TT	-	-	-	1
ER TT IM	1	-	-	-
VA TT IM	-	-	-	1
CI VA TE ER	1	-	-	-
CI NO ER TT	-	-	-	2
ES CI NO ER TT	2	-	-	-
CI VA TE ER TT	-	-	-	1
CI NO VA TE CO PE	-	-	-	1
CI VA TE ER PE AM	-	-	-	1
GE ES CI NO ER TT	1	-	-	-
CI NO VA ER TT PE	1	-	-	-
GE ES CI NO ER TT	-	-	1	-
ES CI NO VA ER TT CO	-	1	-	2
GE ES CI NO ER TT CO	-	1	-	-
ES CI NO VA ER TT CO	2	-	-	-
GE ES CI NO TT PE AM	1	-	-	-
GE ES CI NO ER TT CO	1	-	-	-
ES CI NO VA TE ER TT PE	1	-	-	-
CI NO VA TE ER TT CO PE	1	-	-	-
GE ES CI NO VA TE ER TT CO PE	-	1	-	-
GE ES CI NO VA TE ER TT CO PE IM AM	-	-	-	5

^aAgentes antimicrobianos: GE, gentamicina; ES, estreptomicina; CI, ciprofloxacina; NO, norfloxacina; VA, vancomicina; TE, teicoplanina; ER, eritromicina; TT, tetraciclina; CO, cloranfenicol; IM, imipenem; PE, penicilina e AM, ampicilina.

A distribuição de multirresistência foi de 46%, 40%, 10% e 3,3% para *Enterococcus* sp, *E. faecalis*, *E. faecium* e *E. casseliflavus*/*E. flavencens*, respectivamente, isoladas de carne de frango. Todos isolados de *Enterococcus* apresentaram perfis distintos em relação à multirresistência, sendo que 5 isolados (35,7%) apresentaram resistência simultânea aos 12 antimicrobianos testados.

O perfil de suscetibilidade que prevaleceu entre as amostras de carne crua suína foi o perfil da sensibilidade. *Enterococcus* sp, *E. faecalis* e *E. faecium* provenientes de carne crua suína apresentaram 100% de sensibilidade aos antimicrobianos: gentamicina, estreptomicina, vancomicina, teicoplanina, imipenem, penicilina, ampicilina, ciprofloxacina, norfloxacina e cloranfenicol. Entre os isolados de *E. faecalis*, 17% apresentaram resistência a eritromicina e tetraciclina e isolados pertencentes a *E. faecium* mostram-se resistentes a eritromicina (25%). Nos isolados identificados como *Enterococcus* sp não foi detectado o perfil de resistência.

Entre as amostras de *E. faecalis*, 33% apresentaram perfil de resistência intermediária à norfloxacina, seguidos por 17% a ciprofloxacina e cloranfenicol. Em relação à *Enterococcus* sp os percentuais mais elevados de resistência intermediária envolveram norfloxacina e tetraciclina (18%), seguida de ciprofloxacina, eritromicina e cloranfenicol (9%). Nenhum isolado de *E. faecium* apresentou resistência intermediária aos antimicrobianos testados.

Nas amostras de produtos cárneos processados, foram detectados isolados apenas em patê de frango, correspondendo à espécie *E. faecium*, a espécie referida apresentou perfil de sensibilidade a todos os antimicrobianos testados. Entre os isolados de carne crua suína e produtos cárneos processados não foram detectados isolados multirresistentes.

Os dados de multirresistência são extremamente preocupante, principalmente, devido ao risco de aquisição desses micro-organismos e seus elementos genéticos móveis, seja através da cadeia alimentar, contato direto com animais, ou até mesmo, pela contaminação do ambiente (Aarestrup *et al.*, 2000, Aarestrup *et al.*, 2001 e Aslam *et al.*, 2012), dificultando ainda mais as alternativas de tratamentos para as infecções humanas.

Em relação à resistência antimicrobiana, os resultados do estudo demonstraram que os isolados de *Enterococcus* sp, *E. faecalis* e *E. faecium* provenientes das amostras de carne crua de frango, foram mais resistentes aos antimicrobianos testados que os isolados de carne crua suína e produtos cárneos processados. Resultados similares de resistência foram encontrados em alimentos por Franz *et al.*, (2001) e Diarra *et al.*, (2010).

Murray (1990) ressalta que, a ocorrência de enterococos resistentes a antimicrobianos em alimentos pode ser explicada pelo fato de que os genes de resistência estão localizados em plasmídeos ou transposons, facilitando sua disseminação.

Um dos motivos que vem sendo considerado de extrema relevância pelo aumento da incidência de enterococos resistentes é o uso intenso e indiscriminado de antimicrobianos na produção animal e na agricultura (Riboldi *et al.* 2009), aliado ao agravante que, as principais classes de antimicrobianos utilizadas em animais apresentam análogos usados em humanos e, portanto podem ser capazes de induzir resistência cruzada (Campos *et al.*, 2013). Riboldi *et al.*, (2009) relataram estudos que têm demonstrado que o mesmo gene de resistência já foi encontrado simultaneamente em alimentos e pacientes.

Outro fator importante a ser considerado é a permanência no ambiente de alguns antimicrobianos não biodegradáveis (Kummerer, 2004), provocando a seleção de microorganismos resistentes. A redução da resistência em enterococos isolados de alimentos pode ser alcançada quando a pressão seletiva é removida (Aarestrup *et al.*, 2001).

Todos os isolados caracterizados como *Enterococcus* sp, que apresentaram marcadores de resistência e/ou sensibilidade aos antimicrobianos foram submetidos à análise através da técnica de PCR para detecção dos genes que codificam a resistência à vancomicina e tetraciclina.

Na tab. 3 estão apresentados os resultados referentes à pesquisa dos genes codificadores de resistência à tetraciclina e vancomicina entre as espécies de *Enterococcus*.

Tabela 3. Distribuição dos genes codificadores de resistência à tetraciclina e vancomicina detectada pela técnica de PCR em amostras de *Enterococcus* sp isolados de carne crua de frango e suína.

Identificação dos isolados	Espécie	Perfil de resistência à tetraciclina	Perfil de resistência à vancomicina	Presença do gene <i>tet(L)</i>	Presença do gene <i>vanA</i>	Presença do gene <i>vanB</i>
F7C2	<i>E.faecalis</i>	Resistente	Resistente	+	-	+
F15C5	<i>E.faecalis</i>	Resistente	Sensível	+	-	-
F4C6	<i>E.faecalis</i>	Resistente	Resistente	+	-	-
F7C5	<i>E.faecalis</i>	Resistente	Resistente	+	-	-
F4C5	<i>E.faecalis</i>	Resistente	Resistente	+	-	-
F10C1	<i>E.faecalis</i>	Resistente	Resistente	-	-	-
F14C1	<i>E.faecalis</i>	Resistente	Intermediário	+	-	-
F14C2	<i>E.faecalis</i>	Resistente	Intermediário	+	-	-
F6C1	<i>E.faecalis</i>	Resistente	Sensível	+	-	-

F6C6	<i>E.faecalis</i>	Resistente	Intermediário	+	-	+
F8C1	<i>E.faecalis</i>	Resistente	Intermediário	+	-	-
F9C4	<i>E.faecalis</i>	Resistente	Intermediário	-	-	-
F11C3	<i>E.faecium</i>	Intermediário	Resistente	+	-	-
F11C2	<i>E.faecium</i>	Resistente	Sensível	+	-	-
F10C6	<i>E.faecium</i>	Resistente	Resistente	-	-	-
F8C3	<i>E. flavencens/ gallinarum</i>	Resistente	Sensível	+	-	-
S2C5	<i>E.faecalis</i>	Sensível	Sensível	-	-	-
S3C4	<i>E.faecalis</i>	Sensível	Sensível	+	-	-
S3C5	<i>E.faecalis</i>	Sensível	Sensível	+	-	+
S6C5	<i>E.faecalis</i>	Resistente	Sensível	-	-	-
S7C1	<i>E.faecalis</i>	Sensível	Sensível	-	-	-
S9C6	<i>E.faecalis</i>	Sensível	Sensível	+	-	+
S2C1	<i>E.faecium</i>	Sensível	Sensível	-	-	-
S2C2	<i>E.faecium</i>	Sensível	Sensível	-	-	-
S7C2	<i>E.faecium</i>	Sensível	Sensível	-	-	-
S8C3	<i>E.faecium</i>	Intermediário	Sensível	-	-	-

(+) resultados positivos e (-) negativos para a presença dos genes de resistência à tetraciclina e vancomicina.

A distribuição do gene de resistência *tet(L)* verificado entre os isolados de alimentos, apresentou-se em maior frequência nos isolados das amostras de carne crua de frango. A presença do gene *vanB* foi encontrada nos isolados de carne crua de frango e suína. A frequência desses genes no estudo coincide com os dados da literatura (Wilks *et al.*, 2005 e Li *et al.*, 2007).

A incidência de isolados de carne crua de frango e suína exibindo perfil de resistência à vancomicina e tetraciclina, através do antibiograma, que não apresentaram, pela técnica de PCR, os genes estudados, pode ser explicada pela possibilidade de outros genes determinantes de resistência a esse antimicrobiano estarem envolvidos, visto que, entre os micro-organismos deste gênero são reconhecidos outros genes de resistência a vancomicina (Kak *et al.*, 2002) e tetraciclina (Chopra e Roberts., 2001). Lopez *et al.*, (2009) também descreveram a resistência de enterococos a tetraciclina, porem sem possuir os genes *tet(L)* e *tet(M)*.

A presença do gene *tet(L)* e do gene *vanB* em isolados de amostras de carne crua suína que não expressaram resistência a esses antimicrobianos, indica que, apesar desses isolados apresentarem o gene, ele não está sendo expresso naquele momento, mas pode vir a ser, tornando portanto o isolado resistente. Esses genes podem ser ativados por fatores ambientais como, por exemplo, as condições físicas do trato gastrointestinal ou os efeitos do sinergismo da microbiota bacteriana.

O gene *vanA* não foi detectado em nenhum dos isolados das amostras analisadas. Os genes estudados não foram amplificados nos isolados provenientes de amostras de produtos cárneos processados.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos sinalizam que os alimentos de origem animal podem ser uma fonte potencial de propagação de enterococos resistentes e de genes de resistência para os seres humanos, em especial, a carne de frango, podendo trazer graves riscos a saúde humana. Assim sendo, considera-se necessária a implantação de novas medidas de monitoramento, bem como, o aperfeiçoamento e a continuidade das ações já implantadas pelos órgãos oficiais, para que o uso indevido e descontrolado de antimicrobianos principalmente na produção animal, com ênfase para o setor avícola, seja controlado, visando assim, à proteção à saúde e preservação do bem estar da população.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Brasil e Fundação Araucária – Paraná

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F.M.; BARGER, F.; ANDERSEN, J.S. The association between the use of avilamycin for growth promotion and the occurrence of resistance among *Enterococcus faecium*. *Microbial Drug Resistance*, v.6, p.71-76, 2000.
- AARESTRUP, F.M.; SLYFARTH, A.M; EMBORG, H. *et al.* Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, p.2054-2059, 2001.
- AARESTRUP, F.M.; HASMAN, H.; JENSEN, L.B. *et al.* Antimicrobial Resistance among Enterococci from Pigs in Three European Countries. *Applied and Environmental Microbiology* v.68, p.4127-4129, 2002.
- AARESTRUP, F.M, WEGENER, H.C e COLLIGNON, P. Resistance in bacteria of food chain: epidemiology and control strategies. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, v.6, p.733–750, 2008.

ASLAM, M.; DIARRA, M.S; MASSON, L. Characterization of antimicrobial resistance and virulence genotypes of *Enterococcus faecalis* recovered from a pork processing plant. *Journal of Food Protection*, v.75, p.1486-1491, 2012.

BELL, J.M.; JAMES, C.; JOHN, T. Emergence of Vancomycin-Resistant Enterococci in Australia: Phenotypic and Genotypic Characteristics of Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, v.36, p.2187-2190, 1998.

CAMPOS, A.C.F.B.; SOUZA, N.R.; SILVA, P.H.C. *et al.* Resistência antimicrobiana em *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* isolados de carcaças de frango. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.33, p.575-580, 2013.

CHOPRA, I. e ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.65, p.232-260, 2001.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE – CLSI / NCCLS, 2011. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty – first informational supplemented. *Clinical and Laboratory Standard Institute*, Wayne, Pa, USA 31.

DIARRA, M.S.; HEMPEL, H.; CHAMPAGNE, J. *et al.* Distribution of Antimicrobial Resistance and Virulence Genes in *Enterococcus* spp. and Characterization of Isolates from Broiler Chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, v.76, 2010.

DONABEDIAN, S.; PERRI, M.B.; GORDONCILLI, M.J. *et al.* Characterization of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Isolated from Swine in Three Michigan Counties. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 4156–4160, 2010.

DUTKA-MALEN, S.; EVERS, S.; COURVALIN, P. Detection of glycopeptides resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant Enterococci by PCR. *Journal Clinical Microbiology*, v.33, p.24-27, 1995.

[EFSA] European Food Safety Authority. Joint scientific report of ECDC, EFSA and EMEA on meticillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in livestock, companion animals and foods. EFSA-Q-2009-00612 (EFSA Scientific Report (2009) 301, 1–10) and EMEA=CVMP=SAGAM=62464=2009, 2009a. Disponível on-line <[www.efsa.europa.eu=en=scdocs=doc=301r.pdf](http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc=301r.pdf)> acessado em: 11 fev. 2014.

FACKLAM, R. R.; SAHM, M.D.; TEIXEIRA, L.M. Enterococcus. In: Murray, B. E. et al. *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed. American Society for Microbiology Press. Washington DC, EUA, p.297-305, 1999.

FRANCO, B.D.G.M. e LANDGRAF, M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo. Atheneu 182, 1996.

FRANZ, C. M. A. P.; STILES, M.E.; SCHLEIFER, K.H. *et al.* Enterococci in foods – a conundrum for food safety. *International Journal Food Microbiology*, v.88, p.105-122, 2003.

FUNK, J.A.; LEJEUNE, J.T.; WITTUN, T.E. *et al.* The effect of subtherapeutic chlortetracycline on antimicrobial resistance in the fecal flora of swine. *Microbial Drug Resistance Journal*, v.12, p.210–218, 2006.

GEVERS, D.; DANIELSEN, M.; HUYS, G. *et al.* Molecular characterization of *tet(M)* genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry sausage. *Applied and Environmental Microbiology*, v.69, p.1270-1275, 2003.

KAK, V. e CHOW, J. W. Acquired Antibiotic Resistances in Enterococci. Gilmore, M. S. The Enterococci Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance, Washington, D. C.: ASM PRESS, 2002.

KUMMERER, K. Resistance in the environmental. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.54, p.311-320, 2004.

LI, S.; ZHANG, Z.; MI, Z.H. Vancomycin-Resistant Enterococci in a Chinese Hospital. *Current Microbiology*, v.55, p.125-127, 2007.

LOPEZ, M.; SAENZ, Y.; ROSO-BEZARES, B. *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.

MARQUES, E. B. e SUZART, S. Occurrence of virulence-associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina Brazil. *Journal Medical Microbiology*, v.53, p.1069 -1073, 2004.

MCDERMOTT P.F.; ZHAO, S.; WAGNER, D.D. *et al.* The food safety perspective of antibiotic resistance. *Animal Biotechnology Journal*, v.13, p.71–84, 2002.

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

OLIVEIRA, A. C. e SILVA, R.S. Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. *Revista eletrônica de enfermagem*, v.10, p.189-197, 2008.

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

ROSENGREN, L.B.; WALDENER, C.L.; REID-SMITH, R.J. *et al.* Associations between antimicrobial exposure and resistance in fecal *Campylobacter spp.* from grow-finish pigs on-farm in Alberta and Saskatchewan, Canada. *Journal of Food Protection*, v.72, p.482–489, 2009.

SCHOUTEN, M.; KORSTANJE, J.; MEIS, J. *et al.* Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Europe. *European Journal Clinical Microbiology Infectious Disease*, v.19, p.812-822, 2000.

VIGNAROLI, C.; ZANDRI, G.; AQUILANT, T. *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.

WILKS, A.; ANDERSEN, S.R. LICHT, T.R. Characterization of transferable tetracycline resistance genes in *Enterococcus faecalis* isolated from food. *FEMS Microbiology*, v.243, p.15-19, 2005.