

Associação da resistência a metais e a antibióticos em *Enterococcus* spp de origem animal

Francisca de Araújo Coutinho Pinho Gomes Silva Seco

**Associação da resistência a metais e a antibióticos em *Enterococcus* spp  
de origem animal**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências da Saúde

Projecto Pós-Graduação / Dissertação em Ciências Farmacêuticas

Porto

-2010-

Associação da resistência a metais e a antibióticos em *Enterococcus* spp de origem animal

Francisca de Araújo Coutinho Pinho Gomes Silva Seco

### **Declaração de Originalidade**

**Declaro que este trabalho foi realizado na íntegra por mim e que todo o material proveniente de outras fontes foi devidamente referenciado na sua totalidade**

AUTOR: \_\_\_\_\_

(FRANCISCA GOMES SILVA SECO Nº15296)

ORIENTADOR: \_\_\_\_\_

(PROF. DOUTORA CARLA NOVAIS)

Projecto de Graduação / Dissertação apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para conclusão do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

O presente trabalho resultou de uma colaboração da Universidade Fernando Pessoa com o REQUIMTE grupo Micro (Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto)



## Resumo

---

Nas últimas décadas, o aparecimento de bactérias multiresistentes, resultante do uso abusivo destas moléculas tem constituído um grave problema a nível mundial, sendo cada vez mais um desafio para a saúde pública em consequência da diminuição de alternativas terapêuticas disponíveis. Mais recentemente, tem-se ainda sugerido que biocidas como o cobre, o mercúrio, entre outros, largamente usados em vários nichos ecológicos, poderão contribuir para selecção e manutenção de bactérias com resistência múltipla aos antibióticos. Estudos têm demonstrado que tal fenómeno ocorre através da transferência horizontal de elementos genéticos móveis e mobilizáveis que transportam simultaneamente genes que conferem resistência a antibióticos e tolerância aos biocidas ou pela partilha de mecanismos de resistência comuns. Assim, sabendo-se que são administrados aos suínos grandes quantidades de sulfato de cobre como suplemento alimentar e que os genes que conferem resistência a este metal e ao mercúrio são facilmente dissemináveis, pretende-se com este trabalho avaliar, em isolados representativos das suiniculturas Portuguesas: a) a frequência do gene *tcrB* (resistência ao cobre) e *merA* (resistência ao mercúrio) e b) a respectiva capacidade de transferência destes genes,

Incluíram-se no estudo 199 *Enterococcus* spp pertencentes a várias espécies, provenientes de 6 suiniculturas Portuguesas, distribuídas pelo país. O gene *tcrB* foi detectado em cerca de 27% dos isolados, por PCR. Destes, 59% pertenciam a *E.faecium*, mostrando que esta espécie tem maior capacidade de adquirir *tcrB*. Pelo contrário, *merA* não foi identificado em nenhum dos isolados. Através do método diluição em agar, adaptado das normas CLSI, *tcrB*<sup>+</sup> apresentaram CMI<sub>50</sub> ≥ 16 mM, enquanto que os restantes demonstraram variações de 8 a 28 mM. Ensaios de conjugação revelaram que este gene é frequentemente transferido usando a tetraciclina e a eritromicina como moléculas de pressão selectiva. A resistência a estes antibióticos nos transconjugantes com *tcrB* também parece ser mais preponderante. Em suma, as suiniculturas Portuguesas são reservatórios de *tcrB*, frequentemente co-transferido, por conjugação, com genes de resistência a antibióticos. O uso de cobre em suiniculturas poderá favorecer a manutenção de bactérias multiresistentes ou a transferência horizontal de elementos genéticos móveis portadores de genes que codificam resistência aos antibióticos e/ou biocidas.

## Abstract

---

In the last decades, the emergence of multiresistant bacteria associated to the massive use of antibiotics has been defying the public health, since scarce therapeutic alternatives remain available to treat human infections. Recently, it was suggested that biocides (e.g. copper, mercury, quaternary ammonium compounds) widely used in several ecological niches, could contribute to the selection and maintenance of multiresistant bacteria. This phenomenon might occur through the horizontal transfer of mobile genetic elements carrying genes that confer resistance to antibiotics and tolerance to biocides or by the share of common resistance mechanisms responsible for cross resistance to both types of compounds. Therefore, knowing that high amounts of copper sulphate are used as swine growth promotor and copper and mercury resistance genes are associated to mobile genetic elements, the goals of this study were to evaluate in bacteria from Portuguese piggeries: a) the frequency of *tcrB* (resistance to copper) and *merA* (mercury resistance) genes; and b) their ability to transfer to other bacteria along with antibiotic resistance.

It was included 199 *Enterococcus* spp belonging to different species and isolated from six Portuguese pig farms located throughout the country. *tcrB* gene was detected in 27% of *Enterococcus* spp, by PCR method. Of these, 59% belonged to *E. faecium* suggesting that this specie might be more prone to acquire *tcrB*. Contrary, *merA* gene was not amplified in any isolate. By agar dilution method adapted from CLSI standards, *tcrB*<sup>+</sup> *Enterococcus* spp presented CMI  $\geq$  16 mM. Variable values of CMI (8-28 mM) were detected among *tcrB*<sup>-</sup> isolates. Mating assays revealed that *tcrB* was often transferred when tetracycline or erythromycin were used as selective pressure agents. The resistance to these antibiotics in *tcrB*<sup>+</sup> transconjugants was also the more predominant. In conclusion, Portuguese piggeries are reservoirs of *tcrB*, often co-transferred with genes coding for resistance to antibiotics. The use of copper as animal growth promotor might help to maintain antibiotic resistant bacteria in the animal environment and promote horizontal transfer of mobile genetic elements carrying genes that encoding antibiotic resistance and / or biocides.

## **Agradecimentos**

---

Começo por agradecer à Universidade Fernando Pessoa pelo apoio financeiro que disponibilizou de forma a possibilitar a investigação laboratorial inerente a este estudo, assim como as suas instalações e material.

Agradeço à Prof. Doutora Carla Novais, pela sua permanente disponibilidade, esforço e paciência em ajudar e orientar, ao longo da realização deste projecto.

Agradeço à Prof. Doutora Luísa Peixe (REQUIMTE/Microbiologia – Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto) por ter cedido os isolados para a realização do presente estudo, e à Dra. Teresa Coque (Hospital Ramón y Cajal, Madrid), por ter fornecido as bactérias receptoras.

Agradeço ao Dr. Ricardo Silva, técnico do laboratório de investigação da UFP, que me apoiou em alguns momentos da fracção experimental do trabalho.

## Índice

---

<b>Introdução .....</b>	<b>1</b>
1. Emergência da resistência a antibióticos .....	1
2. Outras moléculas que poderão estar associadas à selecção de bactérias resistentes aos antibióticos: Os Biocidas .....	2
2.1. O grupo dos metais .....	5
2.1.1. O Cobre .....	5
2.1.2. O Mercúrio .....	9
<b>Objectivos .....</b>	<b>12</b>
<b>Material e Métodos .....</b>	<b>13</b>
1. Origem das bactérias incluídas no presente estudo .....	13
2. Amplificação dos ácidos nucleicos – método de <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) .....	14
2.1. Pesquisa de genes que conferem resistência aos metais cobre e mercúrio .....	14
2.2. Visualização dos produtos de amplificação .....	15
3. Avaliação da susceptibilidade ao cobre .....	16
4. Ensaio de conjugação .....	16
5. Avaliação da susceptibilidade aos antibióticos nos transconjugantes .....	18
<b>Resultados .....</b>	<b>19</b>
1. Pesquisa de genes que conferem resistência aos metais cobre e mercúrio .....	19
2. Avaliação da susceptibilidade ao cobre .....	20
3. Ensaio de conjugação .....	22
4. Avaliação da susceptibilidade aos antibióticos .....	23
<b>Discussão .....</b>	<b>25</b>
<b>Bibliografia .....</b>	<b>28</b>
<b>ANEXOS</b>	

## Índice de Tabelas e Figuras

---

<b>Figura 1:</b> Mecanismo de acção dos Biocidas .....	3
<b>Figura 2:</b> Mecanismo de homeostase do cobre em <i>E.hirae</i> .....	7
<b>Figura 3:</b> Operação <i>tcrYAZB</i> .....	8
<b>Figura 4:</b> Mecanismo de resistência conferido pelo operão <i>mer</i> .....	10
<b>Figura 5:</b> Transposição Tn6009, contendo o operão <i>mer</i> e Tn916 .....	11
<b>Figura 6:</b> Incidência de <i>tcrB</i> nas amostras estudadas e a sua distribuição pelas espécies de <i>Enterococcus</i> .....	19
<b>Figura 7:</b> Amplificação de <i>tcrB</i> em isolados representativos da colecção estudada. A – Marcador de DNA (Hyperladder IV); B – Controlo negativo (BM4105 RF); C a G – Isolados com gene <i>tcrB</i> (663 bp); H – Isolado sem gene <i>tcrB</i> (663 bp); I – Controlo positivo (7S4S).....	20
<b>Figura 8:</b> Distribuição dos isolados <i>tcrB</i> <sup>+</sup> e <i>tcrB</i> <sup>-</sup> em diferentes concentrações de cobre. ....	21
<b>Figura 9:</b> Avaliação da disseminação horizontal de <i>tcrB</i> usando diferentes antibióticos como agentes de pressão selectiva.....	22
<b>Figura 10:</b> PCR realizado com intuito de confirmar a existência do gene <i>tcrB</i> nos transconjugantes. A – Marcador de DNA (Hyperladder IV); B – Controlo positivo (7S4S); C e D – isolados transconjugantes <i>tcrB</i> <sup>+</sup> ; E e F – Controlos negativos (GE.1 e BM4105 RF).....	23
<b>Figura 11:</b> Perfis de susceptibilidade aos antibióticos incluídos no estudo, nos transconjugantes com gene <i>tcrB</i> , a partir de placas contendo os respectivos antibióticos como agentes de selecção .....	24
<b>Tabela 1:</b> Condições usadas para a amplificação dos genes <i>tcrB</i> e <i>merA</i> .....	14
<b>Tabela 2:</b> Primers utilizados nas reacções de PCR para identificação dos genes <i>tcrB</i> e <i>merA</i> .....	15
<b>Tabela 3:</b> Distribuição da CMI de cobre em isolados de diferentes espécies com <i>tcrB</i> <sup>+</sup> . 21	

## **Abreviaturas**

---

**BHI** – Brain Heart Infusion

**bp** – Pares de base

**CLSI** – Clinical and Laboratory Standard Institute

**CMI** – Concentração mínima inibitória

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico

**FAO** – Food and Agriculture Organization

**NADPH** – Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase

**OIE** – World Organization for Animal Health

**PCR** – Polymerase Chain Reaction

**ppm** – parte por milhão

**SCAN** – European Comissions Scientific Committe for Animal Nutrition

**SCHENIR** – Scientific Committe on Emerging and Newly Identified Health Risks

**TAE** – Tris-Acetato-EDTA

**WHO** – Organização Mundial de Saúde

## Introdução

---

### 1. Emergência da resistência a antibióticos

Nas últimas décadas, o sucesso do tratamento das infecções humanas tem sido ameaçado pela aquisição de resistência bacteriana aos antibióticos resultante do uso incorrecto e abusivo destas moléculas (Donabedian et al., 2003; Wegener et al., 2003; Johnsen et al., 2005; Katsunuma et al., 2008). A diversidade de elementos móveis portadores de genes de resistência aos antibióticos e a emergência de clones bacterianos com resistência múltipla tem-se tornado um desafio para a saúde pública em consequência da diminuição de alternativas terapêuticas disponíveis (Hasman and Aerestrup., 2004; Davis et al., 2004; Hasman et al., 2006; Soge et al., 2008). Esta problemática foi descrita quer em bactérias de Gram negativo como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e membros da família *Enterobacteriaceae*, quer em bactérias de Gram positivo como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp e *S. pneumoniae*, entre outros (Hasman and Aerestrup, 2002; Hasman et al., 2006; Soge et al., 2008; Solioz et al., 2010).

Estudos publicados demonstraram que a presença deste tipo de microrganismos já não está confinado ao ambiente hospitalar, aparecendo noutros nichos ecológicos, nomeadamente em humanos saudáveis e em ambiente de produção animal intensiva (Schwarz et al., 2001; WHO / FAO / OIE, 2003; Hasman et al. 2006). Neste último nicho ecológico, a selecção de microrganismos e/ou de genes que codificam para a resistência a antibióticos advém do uso excessivo destas moléculas em medicina veterinária e, em algumas regiões geográficas, como promotores de crescimento. A preocupação da presença destes elementos no ambiente animal advém do risco da passagem de bactérias com resistência múltipla e seus elementos genéticos para humanos saudáveis, através da cadeia alimentar, por contacto directo com os animais ou alimentos de origem animal e/ou através do ambiente contaminado (Aerestrup et al., 2001; Chee-Sanford, J.C. et al., 2001; Casewell et al., 2003; WHO 2007). Esta preocupação conduziu a Comissão Europeia à abolição do uso de vários antibióticos

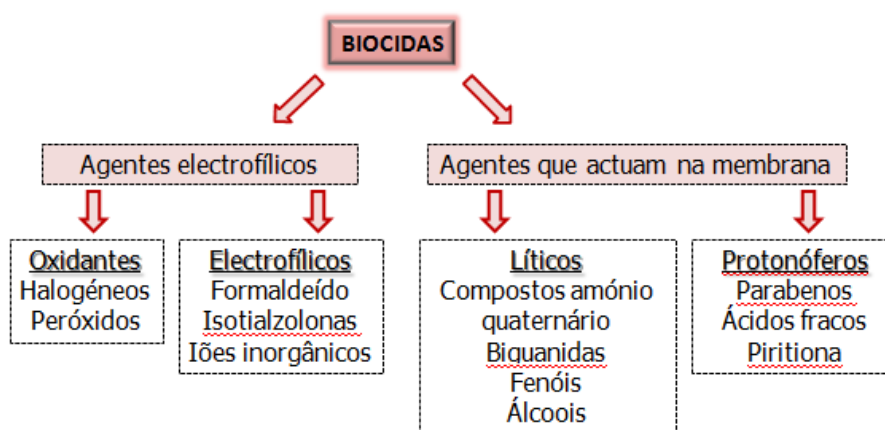
como promotores de crescimento animal até Janeiro de 2006 (Casewell et al., 2003; Garofalo et al., 2007). No entanto, o facto de muitas infecções humanas associadas a bactérias zoonóticas com resistência múltipla terem aumentado em alguns países (Philips et al., 2004), e o facto do bem-estar animal ter diminuído, instaurou alguma polémica relativa a esta decisão da Comissão Europeia.

## **2. Outras moléculas que poderão estar associadas à selecção de bactérias resistentes aos antibióticos: os Biocidas**

Recentemente, na tentativa de terminar com a comum confusão entre os termos “antibiótico” e “biocida” uma nova definição de “biocida” foi proposta. Este termo refere-se a moléculas activas, não pertencentes ao grupo dos antibióticos, que matam ou controlam o crescimento bacteriano, existente em produtos biocidas (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks – SCHENIR, 2009).

Biocidas, tais como metais, compostos de amónio quaternário, biguanidinas, entre outros, são diariamente usados na sociedade com o intuito de controlar a multiplicação microbiana. Estes fazem parte integrante de variados produtos, tais como desinfetantes e antisépticos usados a nível hospitalar e na produção animal, cosméticos, produtos de higiene pessoal, produtos de limpeza doméstica como detergentes, na indústria alimentar, na indústria ambiental, e como promotores de crescimento animal. Recentemente, a Comissão Europeia, sugeriu que o uso de biocidas poderá contribuir para a selecção e manutenção de bactérias com resistência múltipla aos antibióticos (SCENIHR, 2009), através da transferência horizontal de elementos genéticos móveis e mobilizáveis que transportam simultaneamente genes que conferem resistência a antibióticos e tolerância a biocidas ou através da partilha dos mesmos mecanismos de resistência (Hasman et al. 2002; SCENIHR, 2009). Assim, o aumento do conhecimento sobre o papel desempenhado pelos biocidas na selecção de clones bacterianos ou elementos genéticos móveis específicos é de extrema importância.

Tal como os antibióticos, os biocidas actuam por vários mecanismos, nomeadamente sobre a integridade da membrana e morfologia celular ou sobre diversas etapas fundamentais do metabolismo bacteriano (ex: replicação do DNA, na transcrição, na tradução, entre outros). O mecanismo de acção destes compostos é dividido em quatro categorias (Fig.1): Os oxidantes, como cloro e peróxidos, são de rápida acção e actuam por reacções mediadas por radicais orgânicos que promovem a oxidação (Clapp et al., 1994; Dukan et al., 1999). Os agentes electrofílicos que incluem iões inorgânicos como a prata, cobre, mercúrio e biocidas orgânicos como o formaldeído, reagem covalentemente com nucleófilos com o intuito de inactivar enzimas (Collier et al., 1990; Slawson et al., 1990) e há indícios de que iniciam a formação de radicais livres intracelulares que contribuem para a sua acção letal (Thurman et Gerba, 1989; Chapman et Diehl, 1995; Kimura, 1997). Biocidas líticos, tais como a clorohexidina, compostos de amónio quaternário (Broxton et al., 1983; Chawner and Gilbert, 1989) e álcoois como o fenoxietanol (Gilbert et al., 1977) destabilizam membranas conduzindo a uma rápida lise celular. Por último, os protonóferos como os ácidos benzóico e sórbico e parabenos interferem com a capacidade de equilíbrio do pH, conferida pela membrana celular, resultando numa acidificação do interior da célula com consequente ruptura desta (Eklund, 1985).



**Figura 1** – Mecanismos de acção dos biocidas (Adaptado de Chapman, 2003)

A resistência bacteriana a biocidas foi pela primeira vez relatada por Chaplin em 1952, quando se detectaram formulações biocidas catiónicas contaminadas (Chaplin, 1952). Desde então, foram descritos vários casos de ausência de efeito destas moléculas, nomeadamente a ineficácia de conservantes (Yazdankhah, 2006), de antisépticos como

clorohexidina (Stickler, 1974; Wang et al., 2008), compostos de amónio quaternário (Romão et al., 2005), parabenos (Flores et al., 1997; Hutchinson et al., 2004), glutaraldeído (Manzoor et al., 1999; Fraud et al., 2001; Lapaiboon et al., 2006), entre outros.

São vários os mecanismos microbianos associados ao aumento da tolerância aos biocidas nomeadamente alterações do envelope celular, alterações da permeabilidade, bombas de efluxo e degradação/modificação das moléculas activas. Estes mecanismos podem ser intrínsecos de determinados géneros ou espécies bacterianas ou serem adquiridos por elementos genéticos móveis como plasmídeos e transposões (Fraise, 2002).

A resistência aos biocidas e antibióticos pode ser descrita por mecanismos de co-resistência (genes que codificam para mecanismos diferentes presentes no mesmo elemento genético) ou de resistência cruzada (o mesmo mecanismo inactiva diferentes tipos de moléculas). Como exemplo concreto de co-resistência pode referenciar-se um estudo realizado com isolados de *Salmonella* Abortus-equi resistentes à ampicilina, arsénio, crómio, cádmio e mercúrio, que após a remoção do plasmídeo contendo os diferentes genes de resistência, tornaram-se sensíveis a todos estes tóxicos (Gosh et al., 2000). A presença de algumas bombas de efluxo em isolados de *Listeria monocytogenes* (Mata et al., 2000) ou em *Pseudomonas aeruginosa* (Aendekerk et al., 2002), levam a aumento da resistência a antibióticos e biocidas quando comparados com isolados mutantes sem estas bombas, sendo este um exemplo de um mecanismo de resistência cruzada.

A existência de biofilmes, apesar não constituir nenhum mecanismo de resistência propriamente dito, também contribui para a sobrevivência de bactérias a determinados ambientes tóxicos, devido à sua disposição em comunidade (Baker-Austin et al., 2006), dificultando o contacto do biocida com os microrganismos.

## 2.1 O grupo dos metais

Os metais têm uma distribuição ubíqua na natureza, sendo usados em várias actividades quotidianas. Ao longo das últimas décadas, a crescente preocupação de que a contaminação por metais actue como um agente selectivo de bactérias resistentes aos antibióticos tem desencadeado a realização de muitos estudos nesta área (Chapman, 2003; Baker-Austin, 2006; Meyer, 2006). É de referir que, ao contrário dos antibióticos, os metais têm mais dificuldade de sofrer uma degradação natural, aumentando a importância do seu papel como agentes de selecção a longo prazo (Stepanauskas et al., 2005).

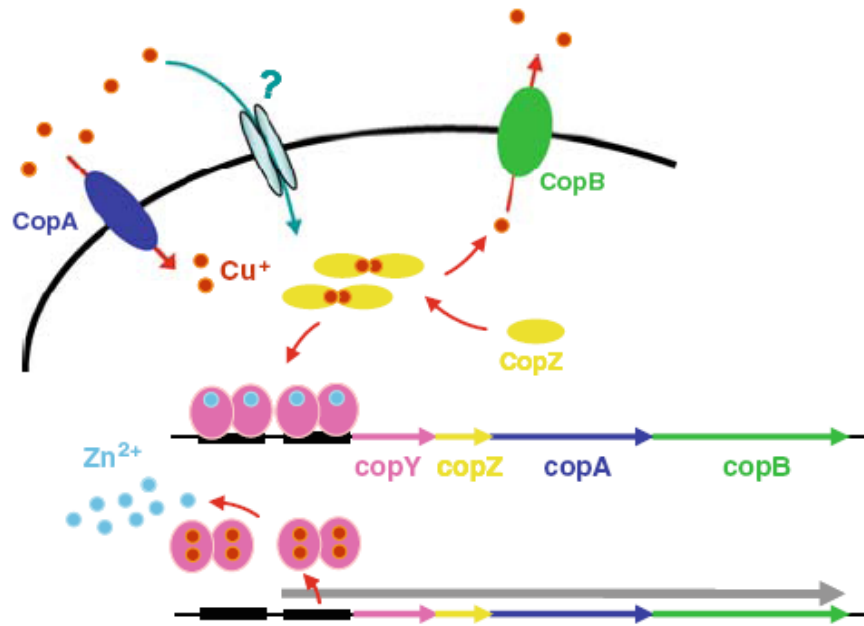
Em várias espécies de bactérias, tais como *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis*, entre outros, já foram descritos genes de resistência a metais pesados, tais como  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{AsO}_2^-$ ,  $\text{AsO}_4^{3-}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{CrO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Sb}^{3+}$ ,  $\text{TeO}_3^{2-}$ ,  $\text{Tl}^+$  e  $\text{Zn}^{2+}$ . Assim, analisando a tabela periódica, ficam excluídos os grupos Ia (ex. Na e K), IIa (ex. Ca e Mg), lantanídeos (ex. lantânio) e actinídeos (ex. Urânio), aos quais ainda não foram relatados genes de resistência. Também não são conhecidos genes de resistência a nenhum dos elementos do grupo VIIa dos halogéneos, apesar da sua abundância no ambiente, e da sua toxicidade em elevadas concentrações (Silver, 1996).

### 2.1.1 O cobre

O cobre é um dos metais incluídos no presente estudo, devido à sua ampla e crescente utilização e distribuição na natureza. Actividades como a acção vulcânica, nomeadamente de canais vulcânicos de alta profundidade, há cerca de 3,5 biliões de anos foram associadas à primeira distribuição de cobre na natureza (Solioz M. et al., 2010). A partir de então, este metal passou a poder ser encontrado em água, ar, rochas e solo. A sua larga utilização pelo Homem, nas últimas décadas, nomeadamente a nível hospitalar, farmacêutico, indústria metalomecânica, agricultura e em ambientes de

produção animal, tem contribuído para o aumento da sua existência e distribuição na natureza (Fouquet et al., 1991; Furnes et al., 2004; Hasman et al., 2006).

Este metal é um elemento essencial a todos os organismos vivos, tendo em conta que é necessário a determinadas funções vitais nas células, como co-factor de um largo número de enzimas (Krupanidhi et al., 2008). Desta forma, as bactérias desenvolveram mecanismos de homeostase para assegurar concentrações internas de cobre adequadas, já que níveis elevados deste metal seriam tóxicos e letais para estas. Um dos mecanismos melhor caracterizado é o operão *copYZAB*, existente na bactéria *Enterococcus hirae* (Hasman, 2005; Solioz et al., 2010). Os quatro genes codificados por este operão, nomeadamente *copY*, *copZ*, *copA* e *copB*, actuam em conjunto até alcançar o equilíbrio tolerável dos níveis deste metal na célula (Lu et Solioz, 2002). *CopA* e *CopB* são duas ATPases localizadas na membrana celular, que controlam a passagem de  $\text{Cu}^{2+}$  através desta. A primeira trata-se de uma bomba de influxo, que actua quando os níveis de cobre na célula não são suficientes para realizar as suas funções como co-factor enzimático (Solioz et Odermatt, 1995; Wunderli-Ye et Solioz, 2001), e a segunda de uma bomba de efluxo (Odermatt et Solioz, 1995), que expulsa excessos deste metal na célula, assim como níveis elevados de iões de prata. *copY*, localizado a montante dos quatro genes, trata-se de um repressor da transcrição do operão *copYZAB* que funciona quando existe um excesso de iões de cobre na célula. Por fim o gene *copZ*, responsável pelo tráfego de  $\text{Cu}^{2+}$  no periplasma, que acompanha sempre o trajecto do metal na célula. Assim, este último gene liga-se ao cobre em excesso, transferindo-o a *copB* para exclusão do metal, e também ao repressor *copY*, que induzirá o operão *cop*. Quando as concentrações de cobre na célula se encontram normais, o gene *copY* encontra-se ligado ao ião  $\text{Zn}^{2+}$ . Contudo, quando a concentração do primeiro metal se eleva, um ião de  $\text{Zn}^{2+}$  é substituído por dois iões de  $\text{Cu}^{+}$  e liberta-se do promotor, que consequentemente irá induzir o operão.



**Figura 2** – Mecanismo de homeostase do cobre em *E.hirae* (Solioz, et al., 2010)

Apesar de todo este mecanismo de homeostase, raramente o sistema *copYZAB* é capaz de lidar com concentrações artificialmente elevadas de cobre nas células. Assim, em resposta aos níveis tóxicos deste metal, surgem mecanismos de resistência ao cobre. Estes mecanismos adquiridos pelas bactérias foram já descritos tanto em bactérias Gram negativo, como *Escherichia coli* e *Pseudomonas syringae* (Brown et al., 1995; Silver, 1996), como em bactérias de Gram positivo, como *Enterococcus* spp, *Bacillus subtilis*, e *Lactococcus lactis* (Leelawatcharamas et al., 1997; Hasman et Aarestrup, 2002; Solioz et al., 2010). O gene *tcrB* (*transferable copper resistance gene B*) é, até a data, um dos poucos genes de resistência ao cobre conhecidos em *Enterococcus*, tendo sido recentemente demonstrado como um dos genes constituinte do operão *tcrYAZB* (Fig.3). Este é semelhante ao operão *copYZAB* do mecanismo de homeostase do cobre em *E. hirae*. Desta forma, bactérias que carregam o operão *tcrYAZB* são capazes de proliferarem, *in vitro*, em ambientes de elevada concentração de sulfato de cobre (até 28mM), enquanto que bactérias sem este gene, apenas lhes são toleráveis valores até 8mM (Hasman et al, 2006).

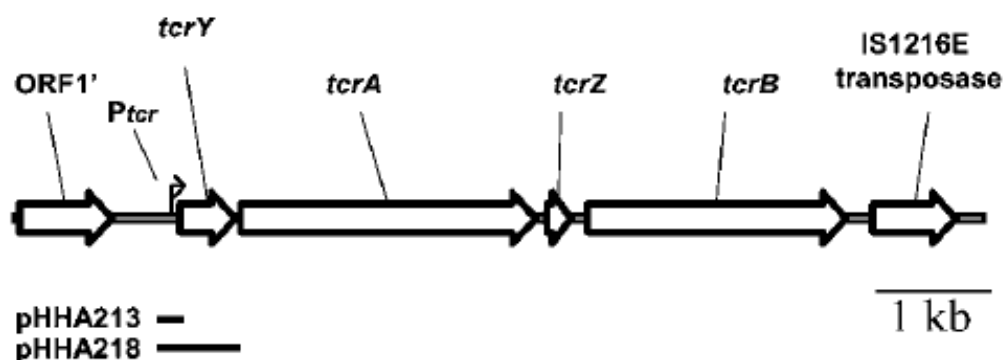


Figura 3 – Operação *tcrYAZB* (Hasman, 2005)

A pesquisa do gene *tcrB* em *Enterococcus* spp foi realizada em apenas algumas regiões geográficas (Hasman et Aarestrup, 2004; Hasman, 2006; Amachawadi et al., 2010). Um estudo demonstrou que, na Dinamarca, isolados de *Enterococcus* resultantes de suínos, quando comparados com outros reservatórios, apresentavam cerca de 46 a 79% de gene *tcrB*, entre o ano 1997 e 2003, respectivamente (Hasman et Aarestrup, 2005). A explicação mais provável para esta elevada incidência de resistência é o abuso da utilização de cloridrato e sulfato de cobre como promotores de crescimento em suínos, em quantidades acima das mínimas necessárias a nível nutricional. Hasman *et al.* (2006) relataram que apesar dos valores adequados de cobre como suplemento alimentar para um crescimento normal rondarem os 4 a 10 ppm, na Europa, a ração alimentar era suplementada com cerca de 175 ppm de cobre nos leitões com idade até às 12 semanas e cerca de 20 ppm nos suínos em crescimento ou em fim de vida. Nos Estados Unidos, os níveis de suplemento rondavam cerca de 125 a 250 ppm de cobre, independentemente da idade dos suínos. Este efeito da promoção do crescimento através da suplementação com cobre, foi documentada em vários estudos (Hasman et Aarestrup, 2002; Aarestrup et al., 2002; Hasman, 2004; Hasman et al, 2006; Amachawadi et al., 2010). Os autores do relatório SCAN (*European Commissions Scientific Committee for Animal Nutrition*) de 2003, reportam um grande número de análises de dose-resposta envolvendo suplementos de cobre fornecidos a suínos de diferentes idades, desde o período pós-desmame, suínos em crescimento e em fase terminal de crescimento. Através deste estudo, os autores concluíram que a presença de

grandes quantidades de cobre (65-280 ppm), apenas promoveria a taxa de crescimento dos leitões, visto que nenhum efeito significativo foi observado em suínos em crescimento avançado.

A presença do gene *tcrB* e respectiva resistência bacteriana ao cobre foi sugerida como um dos factores que poderia ser responsável pela manutenção da resistência aos glicopéptidos e macrólidos após a sua abolição como promotores de crescimento. O que esteve na base desta sugestão foi a presença de um plasmídeo conjugativo que transportava, para além de *tcrB*, um gene de resistência aos glicopéptidos (*vanA*) e outro ao grupo dos macrólidos, lincosamidas e estreptograminas do grupo B (*ermB*) (Hasman et Aarestrup, 2002). Este plasmídeo tinha a capacidade de se transmitir entre isolados de *E. faecium*. De facto, um estudo realizado em 1998 na Dinamarca revelou que mais de 90% dos isolados de *E. faecium* resistentes ao cobre oriundos de suínos apresentaram simultaneamente resistência aos macrólidos e, 20% desses, foram resistentes concomitantemente aos macrólidos, glicopéptidos e cobre (Hasman et al., 2006).

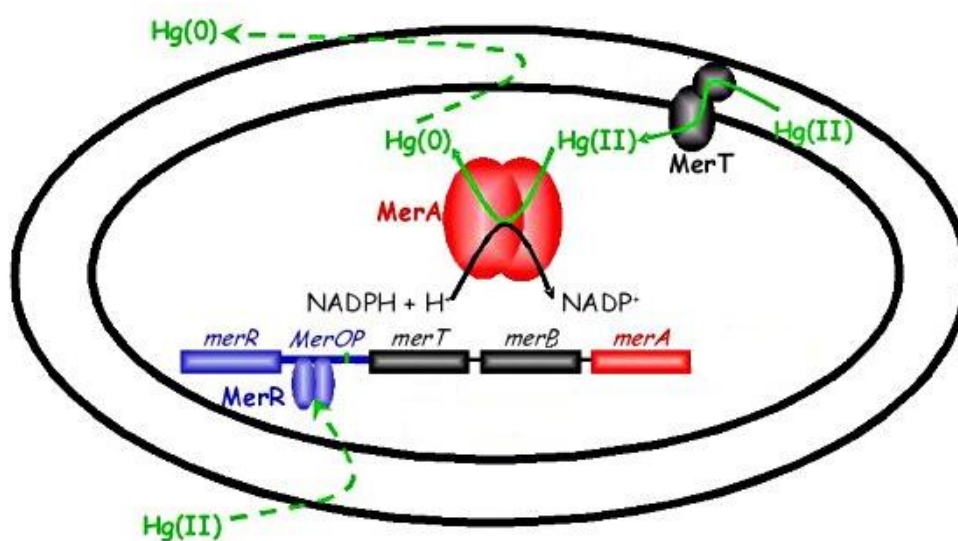
### **2.1.2 O Mercúrio**

O mercúrio é um elemento constituinte da crosta terrestre e a sua disseminação pelo ar, água e solo apresenta uma grande importância devido à elevada toxicidade da sua forma mais perigosa. Este metal pode apresentar-se de três formas: 1) Mercúrio elementar, que constitui a forma mais comum na atmosfera, sendo absolutamente inerte e insolúvel em água; 2) Mercúrio iónico ou oxidado, altamente reactivo, solúvel em água e com capacidade de se transformar na terceira forma, 3) Metilmercúrio. Esta é muito tóxica e perigosa (Nascimento A. et Chartone-Souza, 2003).

Este metal é largamente utilizado em vários processos, nomeadamente na indústria, na produção de instrumentos médicos (ex: termómetros, esfigmomanómetros), amálgamas dentárias, lâmpadas, tubos de raio-X, entre outros. A sua capacidade de interferência em determinados processos biológicos, torna-o igualmente útil para a indústria farmacêutica na produção de anti-sépticos, diuréticos,

entre outros. Para além destas aplicações, o mercúrio pode ser ainda encontrado em vários produtos como baterias, lâmpadas fluorescentes, reagentes catalisadores, pigmentos em tintas, pesticidas e explosivos (Zscheck et Murray, 1990; Davis et al., 2004). Assim, a actividade antropogénica contribui amplamente para a distribuição e acumulação deste metal na natureza. A contaminação de ambientes aquáticos por mercúrio constitui uma grande preocupação uma vez que pode haver uma conversão natural para metilmercúrio, a sua forma mais tóxica, sendo esta bioacumulável na cadeia alimentar, nomeadamente nos peixes (Nazaret et al., 2004).

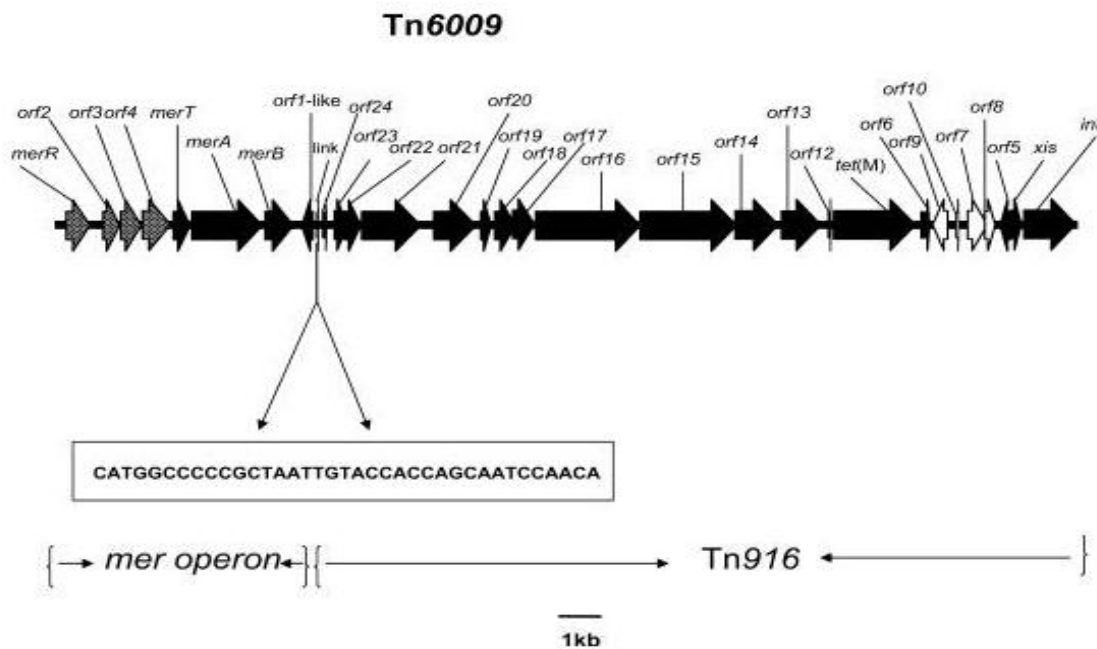
Devido à sua capacidade biocida, algumas bactérias de Gram positivo e de Gram negativo desenvolveram mecanismos de resistência ao mercúrio, cujos genes estão localizados no operão *mer* (Silver S., 1996; Karen J.C., 2001). Este operão permite a desintoxicação celular bacteriana, através da redução enzimática de Hg (II), com formação de mercúrio metálico volátil. Esta reacção é catalisada pela enzima mercúrio redutase dependente de NADPH, que é codificada pelo gene *merA*. A actividade transcricional do operão é controlada pela proteína reguladora *merR*, actuando como repressor na ausência de Hg (II), ou promotor da transcrição na presença do metal, através da ligação à proteína MerOP. O gene *merB* e *merT* localizam-se também no operão *mer*, com função de resistência ao mercúrio orgânico e transporte, respectivamente. Concluindo, quatro são os genes constituintes deste operão, funcionando todos em conjunto de forma a eliminar excessos de mercúrio na célula (Fig.4).



**Figura 4** – Mecanismo de resistência conferido pelo operão *mer* (Adaptado de Covès J., 2000)

A dispersão dos operão *mer* tem sido sobretudo estudada nas bactérias de Gram negativo (Silver, 1996). Vários elementos genéticos móveis (plasmídeos e transposões) têm sido descritos a transportar simultaneamente genes de resistência aos antibióticos e ao mercúrio. Como exemplo, podem-se referir plasmídeos caracterizados por Novais et al (2010) que possuem vários genes de resistência a antibióticos ( $\beta$ -lactâmicos, canamicina, tobramicina, cloranfenicol, trimetoprim ou sulfonamidas) e o operão *mer*.

No que diz respeito a bactérias Gram positivo, são poucos os estudos que se têm dedicado à investigação deste tipo de resistências. Por exemplo, o transposição Tn6009 (Fig.5) de *Staphylococcus aureus*, foi recentemente descrito (Soge et al., 2008). Ele é constituído pelo transposição conjugativo Tn916 (que confere resistência à tetraciclina) e o operão *mer*.



**Figura 5** – Transposição *Tn6009*, contendo o operão *mer* e *Tn916* (Soge et al., 2008)

A resistência aos metais pode estar intimamente relacionada com a resistência aos antibióticos, mas mais estudos necessitam de ser desenvolvidos no sentido de compreender a verdadeira incidência dos genes de resistência aos metais em ambientes de elevada pressão selectiva como os hospitais e o ambiente de produção animal e qual o seu papel na evolução da resistência aos antibióticos nestes locais.

## II. Objectivos

---

Nos últimos anos, tem sido demonstrado que alguns transposões e plasmídeos possuem simultaneamente genes que conferem resistência a metais e antibióticos, sugerindo que diferentes pressões selectivas podem ser responsáveis pela manutenção de bactérias com resistência múltipla aos antibióticos (Hasman et al., 2006; Baker-Austin., 2006; Aarestrup et al., 2004; Davis et al., 2004). Estes dados são preocupantes devido à possível passagem dos microrganismos ou dos seus genes de resistência aos humanos, através de várias vias, nomeadamente através da cadeia alimentar. Em *Enterococcus* spp, dois tipos de genes que conferem resistência aos metais (mercúrio e cobre) e localizados nos mesmos elementos genéticos que albergam genes de resistência a antibióticos, foram identificados. No entanto, estes estudos foram aplicados num reduzido numero de isolados, desconhecendo-se assim, até ao momento, qual a sua incidência em *Enterococcus* spp. Desta forma, constituem objectivos deste estudo:

- a) Pesquisar por métodos de biologia celular, a frequência do gene *tcrB* (resistência ao cobre) e *merA* (resistência ao mercúrio) em *Enterococcus* spp, oriundos de amostras do ambiente de suiniculturas Portuguesas;
- b) Avaliar, fenotipicamente, a concentração mínima inibitória (CMI) ao cobre, em *Enterococcus* spp com presença ou ausência do gene *tcrB*;
- c) Determinar, por ensaios de conjugação, a capacidade de transferência dos genes *tcrB* e *merA*, em isolados representativos das diferentes suiniculturas, espécies e perfis de resistência aos antibióticos;
- d) Para os isolados com ensaios de conjugação positivos, avaliar a co-transferência de resistência a algumas classes de antibióticos;

### III. Material e Métodos

---

#### 1. Origem das bactérias incluídas no presente estudo

Nos anos 2006 e 2007, foram obtidas amostras provenientes de 6 suiniculturas, entre as quais 1 de produção extensiva, no Centro, e 5 de produção intensiva, no Norte, Centro e Sul de Portugal. Dos 473 isolados obtidos, incluíram-se neste estudo 199 bactérias, previamente identificadas como, *E. faecium* (n=81), *E. faecalis* (n=42), *E. hirae* (n=34), *E. gallinarum* (n=8), *E. casseliflavus* (n=4) e *Enterococcus* sp (n=30) (Novais et al., 2008). Estes isolados foram obtidos de 80 amostras, divididas em 5 grupos de acordo com a sua origem:

- (i) suínos: n=50 [fezes (n=35), zaragatoa rectal (n=8), da narina (n=1), da unha (n=2) e da superfície dos animais (n=4)];
- (ii) água e alimentos: n=38 [ração dos leitões e comedouro (n=22), alimento medicamentoso (marca desconhecida) (n=2), água para consumo não tratada (n=1) e tratada com UV e cloro (n=1) e bebedouros (n=12)];
- (iii) resíduos: n=45 [lagonagem (n=23), esterco seco (n=8), chorume (n=4), resíduos sólidos (n=4), água residual (n=2) e fossa (n=4)];
- (iv) Antiséptico da marca Mystral<sup>TM</sup>: n=5 (Nota: na sua composição contém Sulfato de cobre)
- (v) oriundas de outros locais do ambiente das suiniculturas: n=59 [pó das diferentes salas com animais (n=9), ar (n=7), sistemas de ventilação (n=2), paredes e pavimentos (n=8), jaula de gestação (n=3), água limpa e suja parideiras (n=8), maternidade (n=8), ninho leitões (n=3), doseador de ração (n=1), terra utilizada por suínos de várias idades (n=9) e terra em fase de pousio (não usada por suínos no momento da colheita) (n=3)];

## 2. Amplificação dos ácidos nucleicos – método de Polymerase Chain Reaction (PCR)

### 2.1 Pesquisa de genes que conferem resistência aos metais cobre e mercúrio

A pesquisa dos genes que se pretendem estudar, nomeadamente o que confere resistência ao cobre – gene *tcrB* – e o que confere resistência ao mercúrio – gene *merA* – foi realizada através de um PCR multiplex, nas condições descritas na Tabela 1, e usando os *primers* previamente descritos por outros autores (Tabela 2).

**Tabela 1** – Condições usadas para a amplificação dos genes *tcrB* e *merA*

Gene a amplificar	Reagentes	Concentração final	Condições termociclador	Tamanho do produto amplificado (bp)
<u><i>tcrB</i></u>	Tampão	5x	95°C-10min-1 ciclo	663
	MgCl <sub>2</sub>	2mM	94°C-30s	
	dNTP's	0,2mM	55°C-30s	1081
	Taq polimerase	1,25U	72°C-1min-30 ciclos	(se o gene for originário de <i>Streptococcus/Bacillus</i> )
<u><i>merA</i></u>			72°C-10min	1644 (se o gene for originário de <i>Enterococcus/Staphylococcus</i> )

**Tabela 2** – Primers utilizados nas reacções de PCR para identificação dos genes *tcrB* e *merA*

<b>Gene</b>	<b>Metal para que codificam</b>	<b>Primers</b>	<b>Sequência</b>	<b>Referência</b>
<i>tcrB</i>	Cobre	824	5'- CAT CAC GGT AGC TTT AAG GAG ATT TTC-3'	Hasman et al., 2006
		825	5'- ATA GAG GAC GCC GCC ACC ATT G – 3'	
<i>merA</i>	Mercúrio	MRAF	5'-ATG ACT CAA AAT TCA TAT AAA ATA-3'	Ojo et al., 2004
		MRAR	5'-TTA GCC TGC ACA ACA AGA TAA-3'	

## 2.2 Visualização dos produtos de amplificação

Os produtos de amplificação das reacções de PCR foram analisados após uma electroforese horizontal com gel de agarose a 2% em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE 1x), contendo 0,01% de fluorescente-Sybr Safe DNA gel stain como revelador de DNA. Foram aplicados 10µl do produto de amplificação, assim como um marcador de peso molecular (Hiperladder IV), com condições anteriormente descritas pelo fabricante. A electroforese foi efectuada a 110 volts durante 40 minutos, tendo sido os seus resultados observados num transiluminador e adquiridos digitalmente com o programa Quantati one version 4.6.1 Buidl 055.

### 3. Avaliação da susceptibilidade ao cobre

O estudo da susceptibilidade ao cobre foi realizado em 92 dos isolados representativos de *Enterococcus* spp das várias suiniculturas, espécies e perfis de resistência, pelo método de diluição em agar com adaptação das normas CLSI (*Clinical and Laboratory Standard Institute*).

Inicialmente, foram preparadas as placas, contendo Mueller-Hinton II e Sulfato de cobre em concentrações crescentes (0mM, 1mM, 2mM, 4mM, 8mM, 12mM, 20mM e 24mM) de acordo Hasman et al., 2006. As bactérias em estudo foram semeadas em meio BHI agar e incubadas a 37°C durante 24h, de modo a ocorrer o seu crescimento. A partir da cultura pura foi feita uma suspensão bacteriana, em tubos com soro fisiológico estéril, até obtenção de uma densidade óptica de 0,5 McFarland, sendo posteriormente inoculada 1µl desta suspensão, nos meios de cultura anteriormente preparados, através de um multiinoculador. Após a incubação das placas a 37°C durante 24horas, foi determinada a concentração mínima inibitória (CMI) do cobre. Como controlo negativo (*tcrB*<sup>-</sup>) foi utilizada a bactéria *E. faecium* BM4105 RF e como controlo positivo (*tcrB*<sup>+</sup>) *E. faecium* 7S4S.

A avaliação da susceptibilidade ao mercúrio não foi realizada, devido à sua toxicidade.

### 4. Ensaio de conjugação

Foram executados ensaios de conjugação em 47 isolados *tcrB*<sup>+</sup> representativos das várias suiniculturas, espécies e perfis de resistência aos antibióticos. Como estirpes receptoras foram utilizadas *E. faecium* GE1 e *E. faecium* BM4105 RF, *tcrB*<sup>-</sup> e sensíveis a todos os antibióticos testados, com excepção da rifampicina e ácido fusídico. Todas as bactérias dadoras eram sensíveis a estes dois últimos antibióticos.

Nos ensaios de conjugação, as bactérias dadoras e receptoras foram inoculadas separadamente em 5ml de caldo de Brain Heart Infusion (BHI), e incubadas a 37°C durante um período de cerca de 16h. Os dois tipos de bactérias foram misturadas na proporção 1:1, tendo sido passados 200µl desta mistura para BHI agar (37°C, 24h), de modo a promover possíveis trocas genéticas. O crescimento bacteriano foi transferido, na sua totalidade, para 1ml de soro fisiológico. De seguida, foram retirados 100µl desta suspensão, para placas de selecção (BHI agar) contendo 30µg/ml de rifampicina, 25µg/ml de ácido fusídico e diferentes antibióticos (vancomicina, eritromicina, tetraciclina ou ampicilina). As placas foram incubadas a 37°C durante 48h. De modo a avaliar a viabilidade das placas de selecção foram utilizadas as bactérias receptoras (*E. faecium* BM4105 RF e *E. faecalis* JH2.2) como controlos negativos e transconjugantes previamente estudados em laboratório como controlos positivos. Para a tetraciclina o transconjugante usado foi TC446511.1, para a gentamicina a TCG122.3, para a eritromicina a TC446511.2 e para a vancomicina a TC H182.1. Na presença de crescimento bacteriano, 1 a 3 colónias dessas placas de selecção foram isoladas em BHI agar, na qual se colocaram discos de rifampicina, ácido fusídico e tetraciclina, gentamicina, eritromicina ou vancomicina, tendo sido incubadas a 37°C durante 24h. Os isolados que demonstraram resistência aos antibióticos, foram classificados como possíveis transconjugantes.

Por último, foram realizados novos PCR para verificar a presença do gene *tcrB* nos transconjugantes, segundo as condições anteriormente descritas no subcapítulo dois. O gene *merA* não foi testado uma vez que as bactérias selvagens eram desprovidas deste gene.

## **5. Avaliação da susceptibilidade aos antibióticos nos transconjugantes**

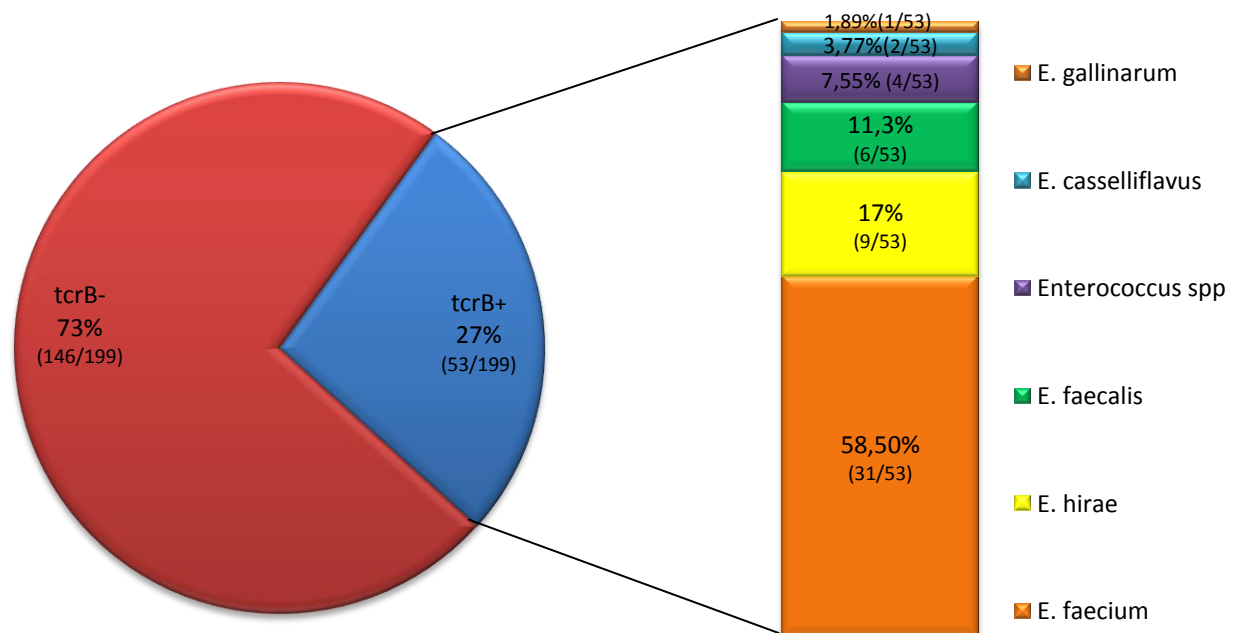
De forma a confirmar fenómenos de co-transferência de resistência a antibióticos de outras famílias que não as estudadas, foram efectuados em todos os transconjugantes *tcrB*<sup>+</sup> de *Enterococcus* spp, antibiogramas pelo método de Difusão em agar com discos (método de Kirby-Bauer), de acordo normas CLSI (2006).

Inicialmente, as bactérias em estudo foram semeadas em meio BHI agar e incubadas a 37°C durante 24h, de modo a ocorrer o seu crescimento. A partir da cultura pura foi feita uma suspensão bacteriana, em tubos de soro fisiológico estéreis, até obtenção de uma densidade óptica de 0,5 McFarland, medida num nefelómetro, sendo posteriormente semeada em meio de cultura Mueller-Hinton II. À superfície do meio foram colocados discos impregnados com antibióticos em concentrações definidas pelas normas anteriormente citadas. Entre os antibióticos usados constaram a vancomicina 30µg, teicoplanina 30µg, ampicilina 10µg, tetraciclina 30µg, minociclina 30µg, eritromicina 15µg, ciprofloxacina 5µg, gentamicina 120µg, nitrofurantoína 300µg, rifampicina 5µg e ácido fusídico 10µg. Após a incubação das placas a 37°C durante 24horas, foram medidos os halos de inibição de crescimento bacteriano à volta dos discos, com craveira. O diâmetro dos halos obtidos para cada bactéria, permitiu classificá-las como susceptíveis (S), com resistência intermédia (I) ou como resistentes (R). Como controlo foi utilizada a bactéria *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

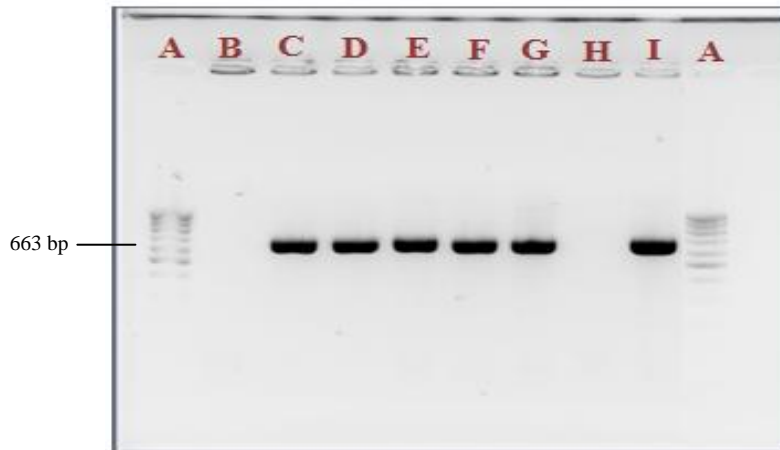
## IV. Resultados

### 1. Pesquisa de genes que conferem resistência aos metais cobre e mercúrio

Nas várias espécies de *Enterococcus* spp testadas, foi detectado o gene *tcrB* em 27% dos isolados (53/199 isolados). Dentro das espécies previamente identificadas, aquela que parece adquirir mais frequentemente este gene é *E.faecium*, seguido de *E. hirae* (Fig. 6 e 7).



**Figura 6** – Incidência de *tcrB* nas amostras estudadas e a sua distribuição pelas espécies de *Enterococcus*.



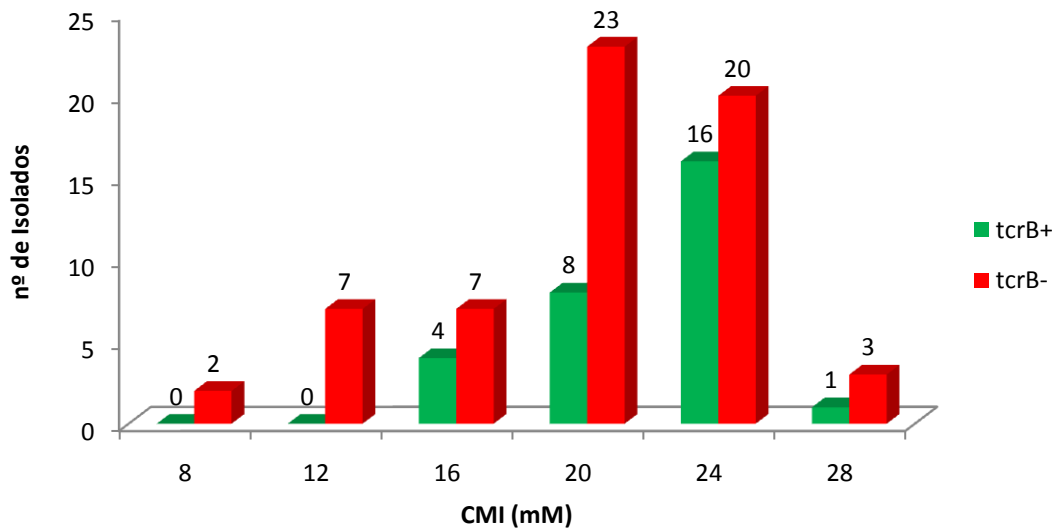
**Figura 7** – Amplificação de *tcrB* em isolados representativos da coleção estudada. A – Marcador de DNA (Hyperladder IV); B – Controlo negativo (BM4105 RF); C a G – Isolados com gene *tcrB* (663 bp); H – Isolado sem gene *tcrB* (663 bp); I – Controlo positivo (7S4S)

O gene *merA*, gene que confere resistência ao mercúrio, não foi identificado em nenhum dos isolados estudados.

## 2. Avaliação da susceptibilidade ao cobre

Observando a Figura 8, verifica-se que os isolados com o gene *tcrB* apresentaram CMI  $\geq 16$ mM, enquanto que os isolados com ausência deste gene, demonstraram variações de CMI, de 8 a 28mM.

De acordo com a Tabela 3, verifica-se ainda que as CMI para as diferentes espécies foram semelhantes.



**Figura 8** – Distribuição dos isolados *tcrB*<sup>+</sup> e *tcrB*<sup>-</sup> em diferentes concentrações de cobre.

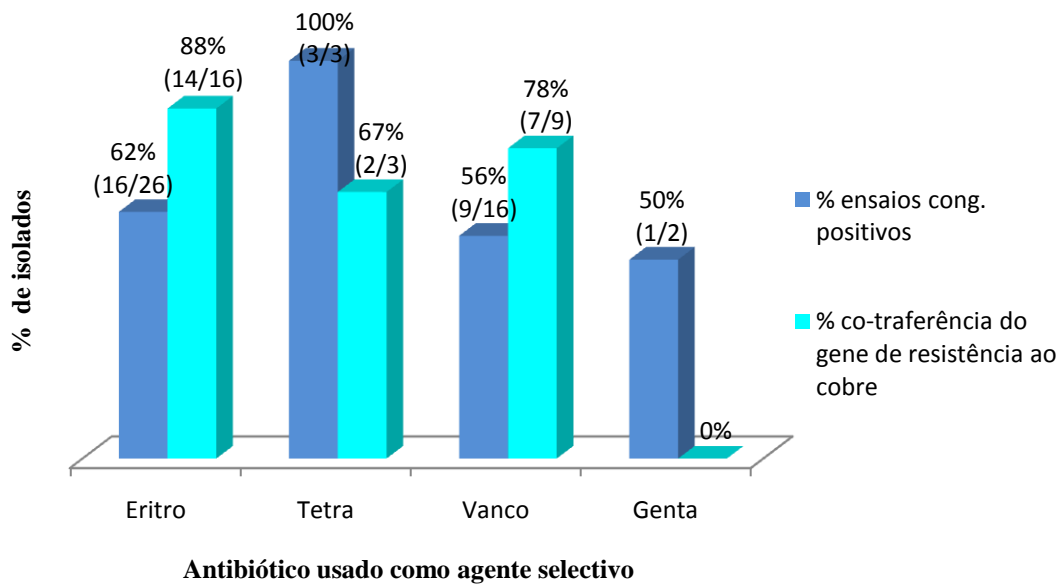
**Tabela 3** – Distribuição da CMI de cobre em isolados de diferentes espécies com *tcrB*<sup>+</sup>.

Espécie	Isolados (n)	CMI (mM)
<i>E. faecalis</i>	1	28
	1	24
	2	20
	1	16
<i>E. faecium</i>	11	24
	6	20
	2	16
<i>E. hirae</i>	3	24
	1	16
<i>E. gallinarum</i>	1	24

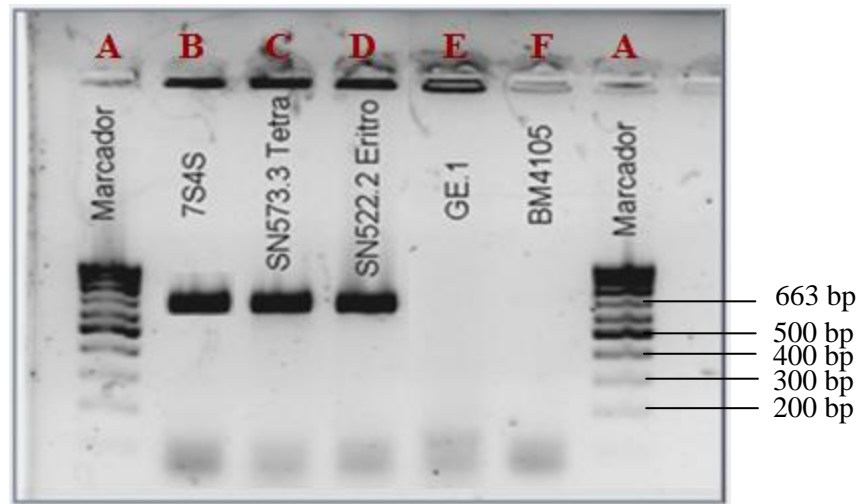
### 3. Ensaio de conjugação

Na Figura 9 evidencia-se que para os quatro antibióticos usados nas placas de selecção foram conseguidos ensaios de conjugação positivos.

A co-transferência do gene *tcrB* foi mais frequente nas placas de selecção suplementadas com eritromicina (Fig. 9 e 10). Pelo contrário, quando a gentamicina foi usada como agente de selecção não foi obtido nenhum transconjugante *tcrB*<sup>+</sup>.



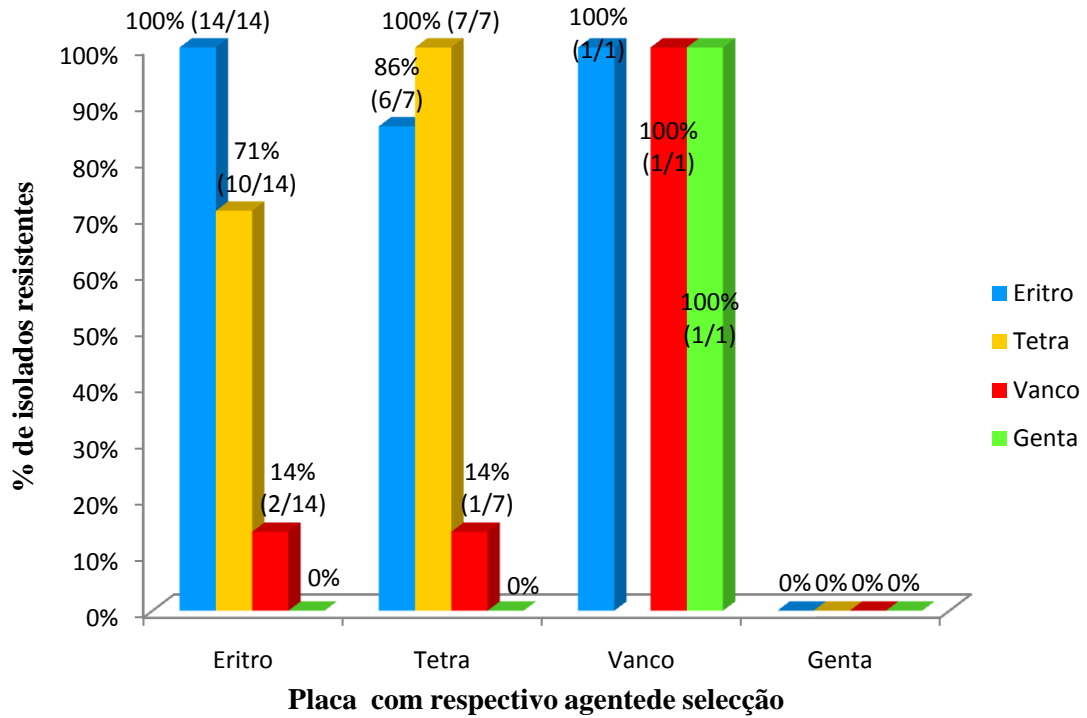
**Figura 9** – Avaliação da disseminação horizontal de *tcrB* usando diferentes antibióticos como agentes de pressão selectiva.



**Figura 10** – PCR realizado com intuito de confirmar a existência do gene *tcrB* nos transconjugantes. A – Marcador de DNA (Hyperladder IV); B – Controle positivo (7S4S); C e D – isolados transconjugantes *tcrB*<sup>+</sup>; E e F – Controlos negativos (GE.1 e BM4105 RF)

#### 4. Avaliação da susceptibilidade aos antibióticos

A avaliação da susceptibilidade aos antibióticos em todos os transconjugantes possuindo *tcrB* revelou que este gene passa sobretudo com a resistência à eritromicina, seguida de tetraciclina e ocasionalmente com a vancomicina (Fig.11). São de destacar as elevadas percentagens de resistência à eritromicina e tetraciclina nos isolados que vieram de diferentes placas de selecção.



**Figura 11** – Perfis de susceptibilidade aos antibióticos incluídos no estudo, nos transconjugantes com gene *trcB*, a partir de placas contendo os respectivos antibióticos como agentes de selecção

## IV. Discussão

---

Este estudo mostra que *tcrB* está largamente distribuído em *Enterococcus* de diferentes espécies, amostras e suiniculturas localizadas em diferentes regiões geográficas de Portugal. As taxas de incidência de *tcrB* conhecidas são baseadas num número reduzido de estudos, realizados em diferentes países Europeus e Estados Unidos. Estes reportaram taxas de incidência maiores e menores do que aquelas observadas no presente trabalho (Aarestrup *et al.*, 2002; Hasman *et al.*, 2002; Amachawadi *et al.*, 2010). A Dinamarca, Espanha e Suécia, apresentaram percentagens de incidência para o gene *tcrB* de 92, 56 e 8%, respectivamente (Aarestrup *et al.*, 2002). Tendo em conta que nos dois primeiros países a quantidade máxima de administração de sulfato de cobre permitida é de cerca de 175 ppm, é compreensível o alcance de maiores valores de resistência do que na Suécia, onde a quantidade máxima fornecida é de 35 ppm. Contudo, nos EUA, onde a dose de sulfato de cobre fornecida aos suínos é entre 100-250 ppm (Amachawadi *et al.*, 2010), observou-se apenas 5% de *Enterococcus* spp com gene *tcrB*. Estes dados sugerem que poderão existir outros factores para além da quantidade de cobre administrada em diferentes regiões geográficas. Por exemplo, o tipo de alimentação dos animais poderá influenciar a biodisponibilidade de cobre no intestino destes, desconhecendo-se as concentrações reais deste metal que poderão estar a seleccionar bactérias resistentes. Estas diferenças de incidência de *tcrB* poderão também estar relacionadas com características dos elementos genéticos (*ex.* abundância, estabilidade, capacidade de transferência) disponíveis nos ambientes locais para captar *tcrB*.

A detecção de *tcrB* nas amostras portuguesas não foi surpreendente, uma vez que os suínos são os animais que consomem concentrações mais elevadas de sulfato de cobre como promotor de crescimento quando comparados com outros animais de produção intensiva (SCAN, 2003). De facto, ausência ou baixas percentagens de *tcrB* foram previamente descritas em *Enterococcus* spp de aves, vacas e ovelhas (Hasman *et al.*, 2002; SCAN, 2003).

A Comissão Europeia tem vindo a preocupar-se com a selecção de bactérias resistentes aos antibióticos devido ao uso massivo de biocidas. Neste estudo, o sucesso

dos ensaios de conjugação corrobora dados prévios, que indicam que a transferência horizontal tem um papel importante na co-dispersão de genes que codificam para a resistência aos antibióticos e cobre (*tcrB* está presente no elemento conjugativo cromosomal integrativo ICES<sub>de3396</sub> de um *Streptococcus dysgalactiae* e no plasmídeo conjugativo pA17sv1 de um *E. faecium*, que também transporta *ermB* e *vanA*) (Número de Acesso ao GeneBank EU142041.1, Hasman *et al.*, 2002; Davies *et al.*, 2009).

Embora neste estudo não se tenha caracterizado a plataforma genética na qual está localizada *tcrB*, ficou demonstrada a capacidade de disseminação deste gene juntamente com a resistência à eritromicina, tetraciclina e/ou vancomicina. A larga dispersão de elementos de captura genética (ex. plasmídeos) associados a tetraciclinas e macrólidos (muito usados na produção animal) (Aarestrup *et al.*, 2002; Hasman *et al.*, 2002) pode contribuir para uma maior captação de *tcrB* por estes elementos, justificando a larga associação deste gene com as resistências atrás mencionadas.

O predomínio de *tcrB* em *E. faecium* sugere que esta espécie, em particular, pode estar mais apta a adquirir e/ou manter os elementos genéticos transportadores deste gene. Resultados semelhantes foram observados anteriormente (Aarestrup *et al.*, 2002).

Embora a transferência horizontal pareça ter um papel importante na disseminação de *tcrB*, a expansão clonal não pode ser descartada, havendo necessidade de estudos moleculares mais aprofundados para avaliar esta hipótese.

Para além de *tcrB*, *Enterococcus* spp poderão ainda ser reservatório de outros genes que conferem resistência a elevadas concentrações de cobre. Isto poderá justificar o facto de, neste estudo, se ter observado *Enterococcus* spp sem gene de resistência ao cobre mas com elevadas CMI. De facto, recentemente, foi detectado o gene *CueO* num isolado animal de *E. faecium* e *Listeria monocytogenes* (Gene Bank n. NZ\_ABQI01000039.1; van Shaik *et al.*, 2010).

Em suma, suínos e ambiente de suiniculturas Portuguesas são reservatórios de *Enterococcus* spp com *tcrB*. Este é frequentemente co-transferido por conjugação com

genes de resistência a antibióticos. A pressão selectiva associada com o uso destas moléculas e compostos de cobre na produção animal, pode favorecer a manutenção de clones e ou elementos genéticos móveis de transferência horizontal portadores de genes que codificam para a resistência a antibióticos e tolerância a biocidas.

## Bibliografia

---

Aarestrup, F.M. et al. (2001). 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 Chemotherapy*, 45(7), pp. 2054-2059.

Aarestrup, F.M., Hasman, H., Jensen L.B., Moreno, M., Herrero, I.A., Domínguez, L., Finn, M. e Franklin, A. (2002). Antimicrobial Resistance among Enterococci from Pigs in Three European Countries, *Applied and Environment Microbiology*, 68, pp. 4127-4129.

Aenderkerk, S. et al. (2002). Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium, *Microbiology*, 148, pp. 2371-2381.

Amachawadi, R.G. et al. (2010). Occurrence of *tcrB*, a transferable copper resistance gene, in fecal enterococci of swine, *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(9), pp.1089-1097.

Baker-Austin, C., Wright, M.S., Stepanauskas, R., McArthur, J.V. (2006). Co-selection of antibiotic and metal resistance, *Trends of Microbiology*, 14(4), pp. 176-182.

Brown, N. L., Barrett, S. R., Camakaris, J., Lee, B. T. & Rouch, D. A. (1995). Molecular genetics and transport analysis of the copperresistance determinant (pco) from *Escherichia coli* plasmid pRJ1004, *Molecular Microbiology*, 17, pp. 1153–1166.

Broxton, P., Woodcock, P.M., Gilbert, P. (1983). A study of the antibacterial activity of some polyhexamethylene biguanides towards *Escherichia coli* 8739. *Journal of Applied Microbiology*, 54, pp. 345–353.

Casewell, M., Friis, C., Marco, E., McMullin, P., Philips, I. (2003). The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health, *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 52(2), pp. 159-161.

Champler, L. et al. (2004). Characterization of the MerD protein from *Ralstonia metallidurans* CH34: a possible role in bacterial mercury resistance by switching off the induction of the mer operon, *Molecular Microbiology*, 52(5), pp. 1475-1485.

Chaplin, C.E. (1952). Bacterial resistance to quaternary ammonium disinfectants, *Journal Bacteriology*, 63(4), pp. 453-458.

Chapman, J.S. (2003). Biocide resistance mechanisms, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 51, pp. 133-138.

Chapman, J.S., Diehl, M.A., (1995). Methylchlorisothiazolone-induced growth inhibition and lethality in *Escherichia coli*. *Journal of Applied Bacteriology*, 78, pp. 134-141.

Chawner, J.A., Gilbert, P. (1989). Interaction of the bisbiguanides chlorhexidine and alexidine with phospholipid vesicles: evidence for separate modes of action. *Journal of Applied Bacteriology*, 66, pp. 253-258.

Chee-Sanford, J.C. et al. (2001). Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities, *Applied Environmental Microbiology*, 67(4), pp. 1494-1502.

Clapp, P.A., Davies, M.J., French, M.S., Gilbert, B.C. (1994). The bactericidal action of peroxides: an EPR spin-trapping study. *Free Radiation Research*, 21, pp. 147-167.

Collier, P.J., Ramsey, A.J., Austin, P., Gilbert, P. (1990). Growth inhibitory and biocidal activity of some isothiazolone biocides. *Journal of Applied Bacteriology*, 69, pp. 569–577.

Covès, J. (2000). La résistance bactérienne au mercure, Laboratoire de Chimie et Biochimie des Centres Redox Biologiques, *DEA National de Toxicologie*.

Davies, M. R., Shera, J., Van Domselaar, G. H., Sriprakash, K. S., McMillan, D. J. (2009). A novel integrative conjugative element mediates genetic transfer from group G *Streptococcus* to other {beta}-hemolytic Streptococci. *J. Bacteriol.*, 191(7), pp. 2257-65.

Davis, I.J., Roberts, A.P., Ready, D., Richards, H., Wilson, M., Mullany, P. (2004). Linkage of a novel mercury resistance operon with streptomycin resistance on a conjugative plasmid in *Enterococcus faecium*, *Plasmid*, 54, pp. 26-38.

Donabedian, S.M. et al. (2003). Molecular characterization of gentamicin-resistant Enterococci in the United States: evidence of spread from animals to humans through food, *Journal Clinical Microbiology*, 41(3), pp. 1109-1113.

Dukan, S., Belkin, S., Touati, D. (1999). Reactive oxygen species are partially involved in the bacteriocidal action of hypochlorous acid, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 367, pp. 311–316.

Eklund, T. (1985). The effect of sorbic acid and esters of p-hydroxybenzoic acid on the proton motive force in *Escherichia coli* membrane vesicles, *Journal of General Microbiology*, 131, pp. 73–76.

Flores, M, Morillo, M, Crespo, ML. (1997). Deterioration of raw materials and cosmetic products by preservative resistant micro-organisms. *Int Biodeterior Biodegrad* , 40, pp. 157-60.

Fouquet, Y., Von Stackelberg, U., Charlou, J.L., Donval, J.P., Erzinger, J., Foucher, J.P., Herzig, P., Muhe, R., Soakai, S., Wiedicke, M., Whitechurch, H. (1991). *Nature*, 349, pp. 778–781.

Fraiese, A.P. (2002). Biocide abuse and antimicrobial resistance – a cause for concern?, *Journal Antimicrobial Chemother*, 49, pp. 11-12.

Fraud, S, Maillard, J-Y, Russell, A.D. (2001). Comparison of the mycobactericidal activity of orthophthalaldehyde, glutaraldehyde and other dialdehydes by a quantitative suspension test, *Journal Hosp Infect*, 48, pp. 214-221.

Furnes, H., Banerjee, N.R., Muehlenbachs, K., Staudigel, H., de Wit, M. (2004). Early life recorded in archean pillow lavas, *Science*, 304, pp. 578–581.

Garofalo, C. et al. (2007). Direct detection of antibiotic resistance genes in specimens of chicken and pork meat, *International Journal of Food Microbiology*, 113, pp. 75-83.

Gilbert, P., Beveridge, E.G., Crone, P.B. (1977). The lethal action of 2-phenoxyethanol and its analogues upon *Escherichia coli* NCTC 5933, *Microbios*, 19, pp. 125–141.

Gosh, A. et al. (2000). Characterization of large plasmids encoding resistance to toxic heavy metals in *Salmonella abortus equi*, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 272, pp. 6-11.

Gomes, F., Silva, R., Freitas, A.R., Sousa, J.C., Coque, T.M., Peixe L., Novais, C. (2009). Co-selection of copper and antibiotic resistance genes in enterococci from piggeries, Portugal, *FEMS Microbiology* 2009, Gutemburgo, Suécia (Poster).

Hasman, H. (2005). The *tcrB* gene is part of the *tcrYAZB* operon conferring copper resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*, *Microbiology*, 151, pp. 3019-3025.

Hasman, H., Aarestrup, F.M. (2002). *tcrB*, a gene conferring transferable copper resistance in *Enterococcus faecium*: Occurrence, transferability, and linkage to macrolide and glycopeptide resistance, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(5), pp. 1410-1416.

Hasman, H., Aarestrup, F.M. (2004). Relationship between copper, glycopeptid, and macrolide resistance among *Enterococcus faecium* strains isolated from pigs in Denmark between 1997 and 2003, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(1), pp. 454-456.

Hasman, H., Kempf, I., Chidaine, B., Cariolet, R., Ersboll, A.K., Houe, H., Hansen, H.C., Aarestrup, F.M. (2006). Copper resistance in *Enterococcus faecium*, mediated by the *tcrB* gene, is selected by supplementation of pig feed with copper sulfate, *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), pp.5784-5789.

Hutchinson, J, Runge, W, Mulvey, M, Norris, G, Yetman, M, Valkova, N, et al. (2004). *Burkholderia cepacia* infections associated with intrinsically contaminated ultrasound gel: The role of microbial degradation of parabens, *Infect Control Hosp Epidemiol*, 25, pp. 291-296.

Johnsen, P.J. et al. (2005). Persistence of animal and human glycopeptide-resistant enterococci on two Norwegian poultry farms formerly exposed to avoparcin is associated with a widespread plasmid-mediated *vanA* element within a polyclonal *Enterococcus faecium* population, *Applied Environmental Microbiology*, 71(1), pp. 159-168.

Karen, J.C. (2001). Bioavailable mercury in arctic snow determined by a light-emitting mer-lux bioreporter, *InfoNorth*, 54(1), pp. 92-101.

Katsunuma, Y. et al. (2008). Comparison of pulsed-field gel electrophoresis patterns of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* and enterococci isolates from the feces of

livestock and livestock farmers in Japan, *Journal General Applied Microbiology*, 54(1), pp. 39-50.

Kimura, T.N.H. (1997). Intracellular generation of superoxide by copper sulfate in *Escherichia coli*, *Mutation Research*, 389, pp. 237–242.

Krupanidhi, S., Sreekumar, A., Sanjeevi, C.B. (2008). Copper and Biological Health, *The Indian Journal of medical research*, 128(4), pp. 448-461.

Laopaiboon, L., Phukoepthim, N., Laopaiboon, P. (2006). Effect of glutaraldehyde biocide on laboratory-scale rotating biological contactors and biocide efficacy, *Electronic Journal of Biotechnology ISSN*, pp.0717-3458.

Leelawatcharamas, V., L. G. Chia, P. Charoenchai, N. Kunajakr, C. Q. Liu, and N. W. Dunn. (1997). Plasmid-encoded copper resistance in *Lactococcus lactis*, *Biotechnol. Lett.*, 19, pp. 639–643.

Lu, Z.H. and Solioz, M. (2002). Bacterial copper transport, *Adv Protein Chem*, 60, pp. 93–121.

Manzoor, S.E., Lambert, P.A., Griffiths, P.A., Gill, M.J., Fraise, A.P. (1999). Reduced glutaraldehyde susceptibility in *Mycobacterium chelonae* associated with altered cell wall polysaccharides, *J Antimicrob Chemother*, 43, pp. 759-765.

Mata, M.T., Baquero, F., and Pérez-Díaz, J.C. (2000). A multidrug efflux transporter in *Listeria monocytogenes*, *FEMS Microbiololy*, 187, pp. 185-188.

Meyer, B. (2006). Does microbial resistance to biocides create a hazard to food hygiene?, *International Journal of Food Microbiology*, 112, pp. 275-279.

Nascimento, A. et Chartone-Souza, E. (2003). Operon *mer*: Bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments, *Genetics and molecular research*, 2(1), pp. 92-101.

Nazaret, S. et al. (1994). *merA* gene expression in aquatic environments measured by mRNA production and Hg(II) volatilization, *Applied Environmental Microbiology*, 60(11), pp. 4059-4065.

Nogueira, A., Dias, A., Silva, R., Freitas, A.R., Sousa, J.C., Peixe, L.V., Novais, C. (2008). Contribuição das suiniculturas na selecção e disseminação de *Enterococcus* spp resistentes às tetraciclina, *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde*, 5, pp. 163-173.

Novais, C., Freitas, A.R., Coque, T.M., Nogueira, A., Silva, R., Dias, A., Sousa, J.C., Peixe, L. (2008). Portuguese piggeries as reservoir of antibiotic multi-resistant enterococci., *ASM Conference on Antimicrobial Resistance in Zoonotic Bacteria and Foodborne Pathogens*, Copenhagen, Denmark (Poster).

Novais, A., Baquero F., Machado E., Cantón R., Peixe L., Coque T.M. (2010). International Spread and Persistence of TEM-24 Is Caused by the Confluence of Highly Penetrating *Enterobacteriaceae* Clones and an IncA/C<sub>2</sub> Plasmid Containing Tn1696::Tn1 and IS5075-Tn21, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(2), pp. 825-834.

Philips, I., Casewell, M., Cox, T., De Groot, B., Friis, C., Jones, R., Nightingale, C., Preston, R., Waddell, J. (2004). Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data, *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 53(1), pp. 28-52.

Romao, C.M., De Faria, Y.N., Pereira, L.R., Asensi, M.D. (2005). Susceptibility of clinical isolates of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* to a hospital disinfectant and molecular typing, *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 100, pp. 541-548.

SCAN. European Commissions Scientific Committee for Animal Nutrition. Opinion of the Scientific Committee for Animal Nutrition on the use of copper in feeding stuffs. (2003): 1-47.

SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks) (2009) – Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides, *Directorate-General for Health and Consumers*, European Commission.

Schwarz, S., Kehrenberg, C., Walsh, T.R. (2001). Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17(6), pp. 431-437.

Sieira, E., Gomes, F., Freitas, A.R., Silva, R., Sousa, J.C., Coque, T.M., Peixe, L., Novais, C. (2010). High prevalence of tcrB, a copper resistance gene, in antibiotic-resistant Enterococci from swines and piggeries environment. *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde UFP*, n. 7. Submetido para publicação

Silver S. (1996). Bacterial resistances to toxic metal ions – a review, *Gene*, 179, pp. 9-19.

Slawson, R.M., Lee, H., Trevors, J.T. (1990). Bacterial interactions with silver, *Biology of Metals*, 3, pp. 151–154.

Soge, O.O., Beck, N.K., White, T.M., No, D.B., Roberts, M.C. (2008). A novel transposon, Tn6009, composed of a Tn916 element linked with a *Staphylococcus aureus* mer operon, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62, pp. 674-680.

Solioz, M., Abicht, H.K., Mermod, M., Mancini, S. (2010). Response of Gram-positive bacteria to copper stress, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 15, pp. 3-14.

Solioz, M. & Odermatt, A. (1995). Copper and silver transport by CopB-ATPase in membrane vesicles of *Enterococcus hirae*, *Journal Biol Chem*, 270, pp. 9217–9221.

Stepanauskas, R. et al. (2005). Elevated microbial tolerance to metals and antibiotics in metal-contaminated industrial environments, *Environment Science Technology*, 39, pp. 3671–3678.

Stickler, D.J. (1974). Chlorhexidine resistance in *Proteus mirabilis*, *Journal Clin Pathol*, 27, pp. 284-287.

Thurman, R.B., Gerba, C.P. (1989). The molecular mechanisms of copper and silver ion disinfection of bacteria and viruses, *CRC Critical Reviews in Environmental Control*, 18, pp. 295–315.

Wang, J., Sheng, W., Chen, D., Chen, M., Chen, Y., Chang, S. (2008). Longitudinal analysis of chlorhexidine susceptibilities of nosocomial methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates at a teaching hospital in Taiwan, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62, pp. 514-517.

Wegener, H.C. (2003). Antibiotics in animal feed and their role in resistance development, *Current Opinion Microbiology*, 6(5), pp. 439-445.

Willem, Van Shaik. et al. (2010). Pyrosequencing-based comparative genome analysis of the nosocomial pathogen *Enterococcus faecium* and identification of a large transferable pathogenicity island, *BMC Genomics*, 11, pp. 1471-2164.

WHO, the world health report 2007 - A safer future: global public health security in the 21st century.

WHO/FAO/OIE. Expert Workshop on Non-human Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance: Scientific Assessment, Geneva, Switzerland, 1-5 December 2003.

Wunderli-Ye, H. & Solioz, M. (2001). Purification and functional analysis of the copper ATPase CopA of *Enterococcus hirae*, *Biochem Biophys Res Commun*, 280, pp. 713–719.

Yazdankhah, S., Scheie, A., Hoiby, A., Lunestad, P., Heir, E., Fotland, T., Naterstad, K., Kruse, H. (2006). Triclosan and Antimicrobial resistance in bacteria: An overview, *Microbial Drug Resistance*, 12(2).

Zscheck, K.K., Murray, B.E. (1990). Evidence for a Staphylococcal-like mercury resistance gene in *Enterococcus faecalis*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, pp. 1287-1289.



## **ANEXOS**

**ANEXO 1 : ARTIGO REVISTA UFP N.7, SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO**

**High prevalence of *tcrB*, a copper resistance gene, in antibiotic-resistant  
Enterococci from swines and piggeries environment**

Eduarda Silveira  
PhD Student-Microbiology  
REQUIMTE/ Faculty of Pharmacy -UP  
eduardamorenosilveira@gmail.com

Francisca Gomes  
Student of Pharmaceutical Sciences Master  
Faculty of Health Sciences -UFP  
15296@ufp.edu.pt

Ana R. Freitas  
PhD Student-Microbiology  
REQUIMTE/ Faculty of Pharmacy -UP  
anarpf@gmail.com

Ricardo Silva  
Graduated in Clinical Analysis and Public Health  
CEBIMED/ Faculty of Health Sciences –UFP  
ricardos@ufp.edu.pt

João Carlos Sousa  
Full Professor  
CEBIMED/ Faculty of Health Sciences –UFP  
jcsousa@ufp.edu.pt

Teresa M. Coque

**Senior Scientist  
Microbiology Laboratory.  
Hospital Ramón y Cajal. Madrid.  
teresacoque@gmail.com**  
**Luísa Peixe**

**Luísa Peixe  
Associate Professor with Aggregation  
Researcher**

---

**lpeixe@ff.up.pt**

**Carla Novais  
Assistant Professor**

---

REQUIMTE/ Faculty of Pharmacy -UP

CEBIMED/ Faculty of Health Sciences –UFP  
Researcher  
REQUIMTE/ Faculty of Pharmacy -UP  
cnovais@ufp.edu.pt

## **Resumo**

Suplementos de cobre são largamente utilizados como promotores de crescimento na produção animal intensiva. Diferentes suiniculturas Portuguesas são reservatório do gene *tcrB* (resistência ao cobre), disseminado em várias espécies de *Enterococcus* provenientes de amostras animais e ambientais. A resistência à eritromicina parece ser mais comum entre bactérias *tcrB*<sup>+</sup>. Este gene é frequentemente transferido usando quer a tetraciclina quer a eritromicina como elementos de pressão selectiva. A selecção de bactérias resistentes aos antibióticos no ambiente de produção animal parece estar relacionada quer com o uso destas moléculas quer com produtos biocidas.

**Palavras-chave:** cobre, biocidas, resistência a antibióticos, *Enterococcus*, suínos.

## **Abstract**

Copper is largely used as an animal growth-promoter in intensive animal production. Different Portuguese piggeries are reservoir of genetic elements containing the *tcrB* gene (coding for copper resistance) which is disseminated in different enterococcal species, samples and piggeries. Resistance to erythromycin seems to be more common among enterococci harbouring *tcrB* which is frequently transferred using tetracycline or erythromycin as selective agents. The selection of antibiotic resistance bacteria in the animal setting might be associated with the use of antibiotics and/or biocides.

**Keywords:** copper, biocides, antibiotic resistance, *Enterococcus*, pigs.

## 1. Introduction

In the last decades the menace imposed by multidrug resistant microorganisms has been attributed to the selective pressure exercised by the consumption of large amount of antimicrobial agents used for different purposes in different ecological niches as hospitals and the intensive animal production (Hasman *et al.*, 2006; WHO/FAO/OIE, 2003; Schwarz *et al.*, 2001). However, despite the efforts to decrease the use of antibiotics (e.g. ban of antibiotics as animal growth promotion, control hospital policies) antibiotic resistant microorganisms are increasingly recovered from farm animals, pets and aquacultures (Phillips *et al.*, 2004). Recently, the European Community suggested that the use of non-antibiotic substances classified as biocides (e.g. metals, quaternarium ammonium compounds, bisguanidines, etc) in disinfectants, antiseptics, cosmetics and other widely distributed products, might contribute to the selection and maintenance of antibiotic resistant bacteria in some ecological niches (SCENIHR, 2009). This hypothesis has been suggested since the activity of antibiotics and biocides is often diminished by the same or similar bacterial mechanism and/or mobile genetic elements (Hasman *et al.*, 2002; SCENIHR, 2009). Hence, the knowledge improvement concerning microorganism's resistance/tolerance to biocides and the identification of particular clones or genetic elements that contribute to the dissemination of biocide and antibiotic resistance genes is of utmost importance.

Copper has been used in different settings due to its cytotoxic properties (as fungicide/bactericide in agriculture activities, disinfectant in human and animal settings, or as preservative in different industrial processes) and also as animal growth promoter (Berg *et al.*, 2005; EFSA, 2009; SCAN, 2003). It plays a vital role in the physiology of all living organisms being largely used in Europe and United States in swine, poultry and fish farming's (SCAN, 2003; Amachawadi *et al.*, 2010) The emergence of bacteria exhibiting copper resistance/tolerance mechanisms in the presence of high levels of this metal was predictable and we now recognize that many microorganisms use homeostasis proteins to maintain a strict cellular copper quota to avoid toxic concentrations (Stoyanov *et al.*, 2010). However, an association between copper and antibiotic resistance has scarcely been investigated.

Enterococci, which have been used in the last years as good indicators of antibiotic resistance gene flux in particular niches, have developed resistance to copper by the acquisition of the *tcrYAZB* gene cluster (Hasman *et al.*, 2005). This operon was

initially described on pA17sv1, a plasmid also harbouring genes encoding resistance to different antibiotics as macrolides (*ermB*) or glycopeptides (*vanA*), showing an association between *tcrYAZB* operon and antibiotic resistance (Hasman *et al.*, 2005). To date the number of isolates carrying this plasmid is scarce although its real distribution has not been evaluated outside a few geographical locations (Hasman *et al.*, 2002). Our goal was to analyze the occurrence of *tcrB* gene (coding for a CPx-type copper efflux ATPase) among enterococci from swine and the environment of six Portuguese piggeries and to evaluate the frequency of its co-transference with tetracycline and erythromycin, antibiotics largely used as veterinary agents in intensive animal production.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Study design**

Between April 2006 and December 2007 we conducted a large study to determine the incidence of antibiotic resistant enterococci present in the animal production setting (Novais *et al.*, unpublished). It included isolates recovered from five intensive (A, B, C, E, F) and one extensive (D) production piggeries located in North, Centre and South of Portugal. From the 473 enterococci obtained, we selected for this specific study 197 isolates representative of different antibiotic resistance profiles, species and piggeries. They were originated from animals (31 from feces, 2 nostril and 8 skin), residues (36 waste lagoons, 16 manure), animal feed (18 food, 14 drinking water) and piggeries environment (6 disinfectant-Mystral®, 8 air, 16 residual waters, 12 soils, 12 dust, 18 piggeries facilities – walls and floors from disinfected rooms, equipment). Previously, samples were enriched in Buffered Peptone Water for 16h (37°C) and a 0,1 ml aliquot were plated onto Slanetz-Bartley agar plates without antibiotics and supplemented with 16 mg/L of tetracycline, 1000 mg/L of streptomycin, 125 mg/L of gentamicin, 8 mg/L of erythromycin, 6 mg/L of vancomycin or 16 mg/L of ampicillin.

### **2.2 Bacterial identification**

Genus identification was based on the results of Gram stain, catalase test, bilis-esculin hydrolysis and growth in NaCl 6,5%. Identification at species level (*Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus*,

*Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*) was performed by amplification of species specific genes by PCR as previous described (Novais et al., 2005; Arias et al, 2006)

### **2.3. Study of antimicrobial susceptibility.**

All isolates were tested for susceptibility to tetracycline and erythromycin using the disk diffusion method and following CLSI guidelines (CLSI, 2007).

### **2.4. Matting assays.**

Conjugation experiments were done for representative *tcrB*<sup>+</sup> enterococci (n=42) of different species and antibiotic resistance profiles. They were performed by filter mating method at a 1:1 donor-recipient ratio using the rifampicin and fusidic acid resistant strains *E. faecalis* strain JH2-2, *E. faecium* strain BM4105 or *E. faecium* GE1 as recipients. Transconjugants were recovered from selection plates containing 30mg/L of rifampicin, 25mg/L of fusidic acid plus 8mg/L of tetracycline or 8mg/L of erythromycin. Transconjugants were recovered after 24-48h of incubation (37°C) and they were verified by confirming the resistance to rifampicin, fusidic acid and tetracycline or erythromycin by the disc diffusion method (CLSI, 2007).

## **3. Results**

### **3.1 Bacterial identification**

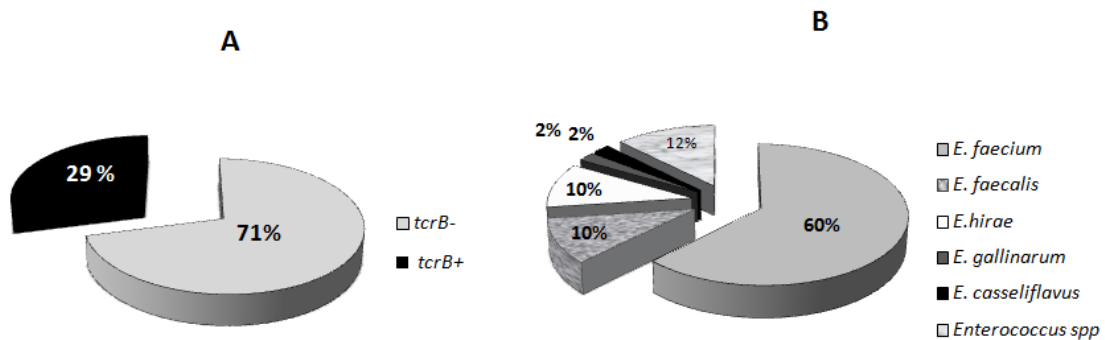
We identified 79 *Enterococcus faecium*, 41 *E. faecalis*, 33 *E. hirae*, 6 *E. gallinarum*, 3 *Enterococcus casseliflavus* and 35 *Enterococcus* spp.

### **3.2 Study of antimicrobial susceptibility.**

Most enterococci isolates included in this study showed resistance to tetracycline (92%, n=192/197) or erythromycin (86%, n=170/197). Resistance was scattered by different species, samples and piggeries.

### 3.3 Search of genes encoding for antibiotic or copper resistance

The *tcrB* gene was detected in 29% (n=57/197) of enterococci from all piggeries and samples (except those from a sample of drinking water and nostril swab). Most of these isolates were identified as *E. faecium* (60%, n=34/57), followed by *E. faecalis* (14%; n=8/57), *E. hirae* (10%; n=6/57) and other species (*E. gallinarum*-2%, n=1/57; *E. casseliflavus*-2%, n=1/57; *Enterococcus* spp.-12%, n=7/57) (Fig.1).



**Fig. 1.** Incidence of *tcrB* gene among the isolates studied (A) and its distribution by species (B).

### 3.4 Association of antibiotic resistance profile and *tcrB* gene.

A higher percentage of resistance to erythromycin was detected among *tcrB*<sup>+</sup> isolates (98%) than among *tcrB*<sup>-</sup> (81%). No significant difference was observed for tetracycline resistance among these two groups (*tcrB*<sup>+</sup>-95% and *tcrB*<sup>-</sup> -91%)

### 3.4. Matting assays

We obtained 57% of positive matting assays for tetracycline or erythromycin resistance (n=24 out of 42 enterococci included). Among them, a high number of transconjugants (92%, n=22/24) also carried *tcrB* gene (Table 1). *tcrB*<sup>+</sup> transconjugants were resistant to erythromycin (n=8), to tetracycline (n=1) or both (n=14) antibiotics (Table 1).

Antibiotic used as selective agent	Isolates tested	Positive mating assays; Species	<i>tcrB</i> co-transferred to transconjugants	Antibiotic resistance patterns in transconjugants harboring <i>tcrB</i>		
				Ery	Tet	Ery+Tet
Erythromycin (8mg/L)	26	n=15/26; <i>E.faecium</i> (n=12), <i>Enterococcus</i> spp (n=3)	100% (n=15/15)	47% (n=7/15)	0% (n=0/15)	53% (n=8/15)
Tetracycline (8mg/L)	16	n=9/16; <i>E.faecium</i> (n=6), <i>E. faecalis</i> (n=2), <i>Enterococcus</i> spp (n=1)	78% (n=7/9)	0% (n=0/7)	14% (n=1/7)	86% (n=6/7)

**Table 1.** Features of *tcrB*<sup>+</sup> transconjugants obtained from different species of enterococci.

Footnote: Tet=tetracycline; Ery=erythromycin.

#### 4. Discussion

This study shows that *tcrB* is widely distributed among enterococci from different species, samples and piggeries located in several Portuguese geographical regions. Incidence rates of *tcrB* are based on a few studies performed in different European countries which have reported higher (Denmark, Spain) and lower (Sweden) percentages than those observed in this study (Aarestrup *et al.*, 2002; Hasmand *et al.*, 2002). It was not surprised to detect this gene in our samples, since pigs are the farm animals that consume the highest concentrations of CuSO<sub>4</sub> as growth promoter in comparison with animal from other production types (SCAN, 2003). In fact, absence or lower percentages of this gene were previously observed in enterococci from poultry, calves or sheep (Hasman *et al.*, 2002; SCAN, 2003).

The European Community has been worried about the selection of antibiotic resistant bacteria by the use on nonantibiotic molecules. In this study, erythromycin resistance was more frequent among *tcrB*<sup>+</sup> than among *tcrB*<sup>-</sup> isolates. The success of mating assays corroborates previous data that indicate that horizontal transfer plays an important role in the co-dispersion of antibiotic and copper resistance genes (*tcrB* is present in different Gram positive genus located either in ICES<sub>de3396</sub>, a conjugative integrative element or at the transferable multiresistance plasmid pA17sv1, harbouring *ermB* and *vanA* (GenBank accession numbers EU142041.1, AE009948.1, CP001849.1, CP001708.1; Hasman *et al.*, 2002; Davies *et al.*, 2009). Although we did not characterize the genetic platform in which *tcrB* was located, we demonstrated its transferability with erythromycin and/or tetracycline resistance. The large spread of

particular capture genetic units associated with these two widely used antibiotics in piggeries environments (Aarestrup *et al.*, 2002; Hasman *et al.*, 2002) might contribute to the frequent co-transfer of the resistances mentioned above, either within common genetic platforms or in different elements transferred during the same genetic event. The predominance of *tcrB* among *E. faecium* suggests that this particular species might be more prone to acquire and/or to maintain the genetic elements carrying this gene. Similar results for *E. faecium* were observed in previous studies (Aarestrup *et al.*, 2002). Although horizontal transfer seems to have an important role in *tcrB* dissemination, a clonal expansion cannot be ruled out, and thus further molecular studies should be performed to test this hypothesis.

In summary, Portuguese pigs and piggeries environment are reservoirs of *tcrB* which is frequently co-transferred with antibiotic resistance genes by conjugation. The selective pressures associated with the use of antibiotics and/or copper compounds in the animal production might favor the maintenance of particular clones or the horizontal transfer of mobile genetic elements carrying genes coding for antibiotic resistance and/or biocides.

## References

- Aarestrup, F. M., Hasman, H., Jensen, L. B., Moreno, M., Herrero, I. A., Dominguez, L., Finn, M., Franklin, A. Antimicrobial resistance among enterococci from pigs in three European countries. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, (2002): 4127-29.
- Amachawadi, R. G., Shelton, N. W., Jacob, M. E., Shi, X., Narayanan, S. K., Zurek, L., Dritz, S. S., Nelssen, J. L., Tokach, M. D., Nagaraja, T. G. *Foodborne Pathog. Dis.*, (2010) [In print].
- Arias, C.A., Robredo, B., Singh, K.V., Torres, C., Panesso, D. e Murray, B.E. Rapid identification of *Enterococcus hirae* and *Enterococcus durans* by PCR and detection of a homologue of the *E. hirae* mur-2 Gene in *E. durans*. In: *Journal of Clinical Microbiology*, 44, (2006):1567–70.
- Berg, J., Tom-Petersen, A., Nybroe, O. Copper amendment of agricultural soil selects for bacterial antibiotic resistance in the field. *Letters in Applied Microbiology*, 40, (2005): 146-51.
- Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement. (2007). M100- S17, vol. 27. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Davies, M. R., Shera, J., Van Domselaar, G. H., Sriprakash, K. S., McMillan, D. J. A novel integrative conjugative element mediates genetic transfer from group G *Streptococcus* to other {beta}-hemolytic Streptococci. *J. Bacteriol.*, 191(7), (2009): 2257-65.

EFSA. European Food Safety Authority. Inability to assess the safety of copper-enriched yeast added for nutritional purposes as a source of copper to food supplements, based on the supporting. Scientific Statement of the Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS). *Journal*, 1128, (2009): 1-9.

Hasman, H., Aarestrup, F. M. *tcrB*, a gene conferring transferable copper resistance in *Enterococcus faecium*: occurrence, transferability, and linkage to macrolide and glycopeptide resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46, (2002): 1410-16.

Hasman, H., Aarestrup, F. M. The *tcrB* gene is part of the *tcrYAZB* operon conferring copper resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Microbiology*, 151, (2005): 3019-25.

Hasman, H., Kempf, I., Chidaine, B., Cariolet, R., Ersbøll, A. K., Houe, H., Hansen, C. B. H., Aarestrup, F. M. Copper Resistance in *Enterococcus faecium*, Mediated by the *tcrB* Gene, Is Selected by Supplementation of Pig Feed with Copper Sulfate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72 (9), (2006): 5784-89.

Novais C, Coque TM, Costa MJ, Sousa JC, Baquero F, Peixe LV. High occurrence and persistence of antibiotic-resistant enterococci in poultry food samples in Portugal. *J Antimicrob Chemother.* 56, (2005):1139-43.

Phillips, I., Casewell, M., Cox, T., De Groot, B., Friis, C., Jones, R., Nightingale, C., Preston, R., Waddell, J. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(1), (2004): 28-52.

SCAN. European Commissions Scientific Committee for Animal Nutrition. Opinion of the Scientific Committee for Animal Nutrition on the use of copper in feeding stuffs. (2003): 1-47.

SCENIHR, Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. (2009).

Schwarz, S., Kehrenberg, C., Walsh, T. R. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17 (6), (2001): 431-37.

Stoyanov, J. V., Mancini, S., Huat Lu, Z., Mourlane, F., Poulsen, K. R., Wimmer, R., Solioz, M. The stress response protein Gls24 is induced by copper and interacts with the CopZ copper chaperone of *Enterococcus hirae*. *FEMS (Letter)*, 302, (2010): 69-75.

WHO/FAO/OIE. Expert Workshop on Non-human Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance: Scientific Assessment, Geneva, Switzerland, 1-5 December 2003.

**ANEXO 2 : ABSTRACT E POSTER APROVADO E ENVIADO PARA O  
CONGRESSO FEMS 2009**

**Co-selection of copper and antibiotic resistance genes in enterococci from  
piggeries, Portugal**

Gomes F. <sup>2</sup>, Silva R. <sup>2</sup>, Freitas A. R. <sup>1</sup>, Sousa J. C. <sup>2</sup>, Coque T.M. <sup>3</sup>, Peixe L.V. <sup>1</sup>, Novais  
C. <sup>1,2</sup>

- 1- REQUIMTE. Serviço Microbiologia. Faculdade Farmácia. Universidade do Porto. Portugal
- 2- Laboratório de Microbiologia. Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade Fernando Pessoa. Porto. Portugal
- 3- Servicio de Microbiologia. Hospital Ramón y Cajal. Madrid. Spain

**Background:** Copper (Cu) is an essential trace element for all animal species being several Cu compounds used as a feed additive in swine production in Europe. Recent studies have described enterococci containing simultaneously genes coding for resistance to copper (*tcrB*) and antibiotics.

**Objectives:** To analyze the occurrence of *tcrB* among enterococci from Portuguese piggeries and to assess the co-transference of *tcrB* with antibiotic resistance (AB<sup>R</sup>) genes of different families.

**Methods:** Representative isolates (n=95) from 61 samples (pigs, food/medicine, residues, facilities) collected from 6 piggery farms (North, Centre, South; 2006-2007) were studied. Susceptibility to Cu, glycopeptides (Gl), ampicillin (Ap), tetracycline (Te) and erythromycin (Er) was performed by standard methods (CLSI , [Cu] 0-28mM). Detection of *tcrB*, *vanA*, *tetM*, *tetL* and *pbp5* were determined by PCR. Mating assays for representative *tcrB*<sup>+</sup> enterococci were done on selective media supplemented with rifampicin plus Te, Er, Ap or Gl.

**Results:** Resistance to Te, Er, Ap or Gl was achieved in 92%, 83%, 13% and 6%, respectively. *tcrB* was detected in 34% of the isolates (20 *E. faecium*, 5 *E. faecalis*, 5 *E.*

*hirae*, 1 *E. gallinarum*, 1 *Enterococcus* spp) which showed a MIC $\geq$ 16mM. Conversely, the MIC of isolates lacking *trcB* varied from 4 to 28mM. *trcB* was transferred in 75% of the cases, associated with *ermB*, *tetL*, *tetM*, *vanA* or *pbp5* (43%, 25%, 21%, 7%, 4%, respectively).

**Conclusions:** Portuguese piggeries are reservoirs of enterococci harbouring both *trcB* and AB<sup>R</sup> genes, located in common platforms or co-transferred in the same genetic events. Horizontal dissemination of AB<sup>R</sup> mobile elements might be favoured by the selective pressures exercised by the use of both antibiotics and Cu compounds. Enterococci lacking *trcB* and exhibiting lower susceptibility to Cu suggest the interference of other genes in the resistance to this metal.



# Co-selection of copper and antibiotic resistance genes in enterococci from piggeries, Portugal

Gomes F. <sup>2</sup>, Silva R. <sup>2</sup>, Freitas A. R. <sup>1</sup>, Sousa J. C. <sup>2</sup>, Coque T.M. <sup>3,4,5</sup>, Peixe L.V. <sup>1</sup>, Novais C. <sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>REQUIMTE. Serviço Microbiologia. Faculdade Farmácia. Universidade do Porto. <sup>2</sup>Laboratório de Microbiologia. Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade Fernando Pessoa. Porto. Portugal. <sup>3</sup>Servicio de Microbiologia. Hospital Ramón y Cajal. <sup>4</sup>Unidad de Resistencia a Antibióticos y Virulencia Bacteriana asociada al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). <sup>5</sup>CIBER en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, Spain.

\*cnovais@ufp.edu.pt;



## BACKGROUND and PURPOSE

The persistence of antibiotic resistance in animal production has been mainly attributed to the massive use of antibiotics in this setting. However, other substances (e.g. heavy metals, antiseptics, biocides) present in the local environment might contribute to the selection and maintenance of certain strains and/or antibiotic resistance patterns (Hasman et al., 2006).

Copper is an element widely distributed in the environment whose cytotoxic properties have been exploited as a diversity of applications. They included its use as sterilizing agent or biocide (wounds and drinking water), algicide, industrial preservative (wood and textil industries), desinfectant and feed additive (veterinary and food industry). Bacteria use copper homeostasis proteins to maintain a strict cellular copper quota avoiding high concentrations which are toxic for the bacterial cell.

Acquired resistance to copper in enterococci is mediated by the plasmid encoded *tcrB* gene. Some European studies have described plasmids containing *tcrB* and also genes conferring resistance to macrolides (*ermB*) and glycopeptides (*vanA*) among animal and human isolates (Aarestrup et al., 2002; Hasman et al., 2002; Hasman et al., 2006).

The goal of our study was to analyze the occurrence of *tcrB* among enterococci resistant to different antibiotic families from Portuguese piggeries (Novais, 2005 and 2008) and to evaluate its link with antibiotic resistance genes.

## METHODS

**Bacterial strains.** Ninety five enterococci (42 *E. faecium*, 24 *E. faecalis*, 17 *E. hirae*, 3 *E. gallinarum*, 9 *Enterococcus* spp) exhibiting different antibiotic resistance profiles were selected from a larger collection of strains which came from a surveillance study for evaluating the role of piggeries in the epidemiology of antibiotic resistance in Portugal. The isolates were recovered from 61 samples (pigs, food/medicines, residues, piggeries facilities) of 6 piggeries (North, Center, South) during 2006-2007.

**Antibiotic susceptibility test.** Susceptibility to glycopeptides, ampicillin, tetracycline and erythromycin was performed by the disk diffusion method following CLSI guidelines (CLSI 2006).

**Evaluation of minimum inhibitory concentration (MIC) to copper.** MIC to copper was evaluated by agar dilution method using Mueller-Hinton agar and the following concentrations of copper: 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 mM (pH=7). *E. faecium* BM4105 and 7545 (clone of A175v1) were used as susceptible and resistant controls (Hasman et al., 2006).

**Characterization of antibiotic and copper resistance genes:** Detection of *tcrB*, *ermB*, *vanA*, *tetM*, *tetL* and *pbp5* were determined by PCR as previously described (Aarestrup et al., 2000; Dahl et al., 2000; Hasman et al., 2006).

**Mating assays:** Mating assays were done for representative *tcrB*<sup>+</sup> enterococci (n=47) with different antibiotic resistance profile by filter mating method at a 1:1 donor-recipient ratio, using the rifampicin and fusidic acid resistant *E. faecalis* JH2-2, *E. faecium* BM4105 or *E. faecium* GE-1 as recipients. Transconjugants were recovered in selection plates with 60mg/L of rifampicin plus 6mg/L of tetracycline, 8mg/L of erythromycin, 6mg/L of vancomycin or 8mg/L of ampicillin. Transconjugants were recovered after 24-48h of incubation (37°C) and were confirmed by resistance to rifampicin, fusidic acid and tetracycline, erythromycin, vancomycin or ampicillin by the disk diffusion method.

## RESULTS

Resistance to tetracycline, erythromycin, ampicillin or glycopeptides was observed in 92% (n=87/95 isolates studied), 83% (n=79/95), 13% (n=12/95) and 6% (n=6/95) of the isolates, respectively.

*tcrB* was detected in 34% (n=32/95) of enterococci (20 *E. faecium*, 5 *E. faecalis*, 5 *E. hirae*, 1 *E. gallinarum*, 1 *Enterococcus* spp) (Fig.1) which showed copper MICs ≥16mM. Conversely, MIC of isolates lacking *tcrB* varied from 8 to 28mM (Fig. 2).

Although antibiotic resistance was observed in all enterococci studied, those harboring *tcrB* were more frequently resistant to erythromycin, vancomycin or ampicillin (Fig.3).

*tcrB* was co-transferred in 75% (n=21/28) of isolates positive for mating assays. It was frequently observed with *ermB* (67% n=14/21), *tetM* (52% n=11/21), *tetL* (38% n=8/21) and occasionally with *vanA* (5% n=1/21) or *pbp5* (10% n=2/21) (Table 1).

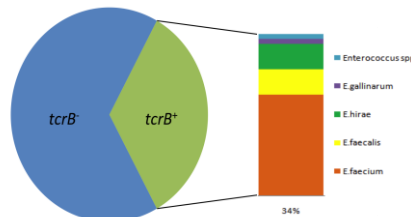


Fig.1. Percentage of isolates with *tcrB* and its distribution by different species.

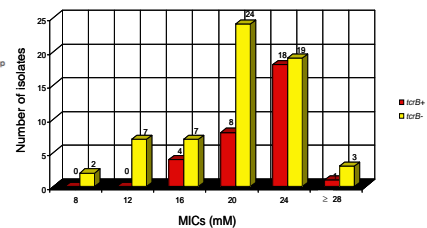


Fig.2. Evaluation of copper MICs for *tcrB*<sup>+</sup> and *tcrB*<sup>-</sup> isolates.

Table 1. Evaluation of *tcrB* co-transference with antibiotics of different classes in mating assays.

Antibiotic used as selective agent	% of positive mating assays	<i>tcrB</i> co-transferred to transconjugants (%)	Antibiotic resistance genes transferred with <i>tcrB</i> (%)
Erythromycin (8mg/L)	62% (16/26)	69% (11/16)	<i>terM</i> -36% (4/11) <i>terL</i> -55% (6/11) <i>ermB</i> -100% (11/11)
Tetracycline (6mg/L)	56% (9/16)	78% (7/9)	<i>terM</i> -100% (7/7) <i>terL</i> -29% (2/7) <i>ermB</i> -43% (3/7) <i>vanA</i> -43% (3/7)
Ampicillin (8mg/L)	67% (2/3)	100% (2/2)	<i>pbp5</i> - 100% (2/2)
Vancomycin (6mg/L)	50% (1/2)	100% (1/1)	<i>vanA</i> -100% (1/1)

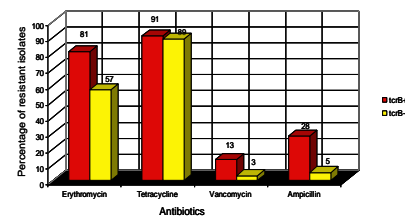


Fig.3. Resistance to different antibiotics in *tcrB*<sup>+</sup> and *tcrB*<sup>-</sup> isolates

## CONCLUSIONS

Portuguese piggeries are reservoirs of enterococci harbouring genes conferring resistance to biocides (*tcrB*) and antibiotic resistance (*ermB*, *vanA*, *tetM*, *tetL*, *pbp5*).

Simultaneous transference of resistance to copper, macrolide and glycopeptide antibiotics has previously been reported (Hasman et al., 2002). However, this is the first study involving co-transfer of ampicillin or tetracycline, suggesting that *tcrB* can be widely disseminated among plasmids conferring resistance to different antibiotic genes in enterococci.

Enterococci lacking *tcrB* and exhibiting low susceptibility to copper suggest other genes associated to the resistance with this metal might be present in Portuguese piggeries.

More detailed studies are needed to evaluate the impact of the use of biocides in animals in the selection and maintenance of antibiotic resistance.

## REFERENCES

- Aarestrup et al., 2002. AEM. 68:4127-4129  
Aarestrup FM, et al. 2000. DMD. 37:127-37.  
CLSI. 2006. Approved standard. 9th edition.M2-A9. CLSI, Wayne, PA  
Dahl et al., 2000. Microbiology. 146:1469-1479  
Hasman et al., 2002. AAC. 46:1410-1416  
Hasman et al., 2006. AEM. 72:5784-5789  
Novais et al., 2005. JAC. 56:1139-1143  
Novais et al., 2008. ASM Conference on Antimicrobial Resistance in Zoonotic Bacteria and Foodborne Pathogens. Copenhagen, Denmark. Poster, p. 84, C138

## ACKNOWLEDGEMENTS

Research on enterococci was supported by grants from Fundação Ciência e Tecnologia (POCI/AMB/61814/2004; Portugal) and from European Union (BIOHYPO-KBBE-2008-2-4-02).