

Ana Isabel Gonçalves Silva Ferraz Dias

Estudo da susceptibilidade a antibióticos em *Enterococcus* spp oriundos do ambiente de suiniculturas Portuguesas

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade Ciências da Saúde
Licenciatura em Ciências Farmacêuticas

Porto

-2009-

Estudo da susceptibilidade a antibióticos em *Enterococcus* spp oriundos do ambiente de suiniculturas
Portuguesas

Estudo da susceptibilidade a antibióticos em *Enterococcus* spp oriundos do ambiente de suiniculturas
Portuguesas

Ana Isabel Gonçalves Silva Ferraz Dias

**Estudo da susceptibilidade a antibióticos em *Enterococcus* spp oriundos do ambiente de
suiniculturas Portuguesas**

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade Ciências da Saúde
Licenciatura em Ciências Farmacêuticas

Porto

-2009-

Estudo da susceptibilidade a antibióticos em *Enterococcus* spp oriundos do ambiente de suiniculturas
Portuguesas

Ana Isabel Gonçalves Silva Ferraz Dias

**Estudo da susceptibilidade a antibióticos em *Enterococcus* spp oriundos do ambiente de
suiniculturas Portuguesas**

Ass: _____

Monografia apresentada à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de licenciada em Ciências Farmacêuticas, sob a orientação da Professora Doutora Carla Novais.

O presente trabalho resultou de uma colaboração da Universidade Fernando Pessoa com o REQUIMTE-laboratório associado.

Sumário

Considerados durante muito tempo microrganismos de baixa patogenicidade *Enterococcus* spp são, actualmente, agentes nosocomiais importantes, principalmente em imunocomprometidos. Uma vez que estes cocos de Gram positivo acumulam facilmente diferentes mecanismos de resistência a antibióticos, são frequentemente seleccionados em ambientes com elevada pressão selectiva, como os hospitais e a indústria agropecuária.

Nos últimos anos tem sido descrito o aparecimento de bactérias com resistência múltipla em animais para consumo humano de vários países. Uma vez que grandes quantidades de antibióticos têm sido consumidas no ambiente de produção animal em Portugal (INFARMED, 2007) e se desconhece qual a incidência de bactérias resistentes aos antibióticos em suiniculturas no nosso país, pretende-se com este trabalho avaliar a susceptibilidade, a diferentes famílias de antibióticos, de *Enterococcus* spp provenientes de diferentes tipos de amostras de suiniculturas com dois tipos de produção: intensiva e extensiva.

Foram identificados 185 *Enterococcus* spp resultantes de 53 amostras colhidas em 2 suiniculturas de produção intensiva do Norte e 1 suinicultura de produção extensiva do Sul de Portugal. O estudo da susceptibilidade aos antibióticos foi realizado em todos os isolados de *Enterococcus* spp pelo método de difusão com discos segundo as normas de CLSI. A identificação das espécies *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. durans* e *E. hirae* e a pesquisa dos genes que mais frequentemente conferem resistência aos glicopéptidos, foi realizada através de dois PCR *multiplex*. Foram realizados ensaios de conjugação em 76 isolados representativos das três suiniculturas de modo a estudar a transferência de resistências a quatro classes de antibióticos: tetraciclina, aminoglicosídeos, macrólidos e glicopéptidos.

Nas três suiniculturas estudadas, mais de 75% dos isolados apresentaram diminuição de susceptibilidade às tetraciclinas ou macrólidos. Os antibióticos que apresentaram maior actividade sobre as bactérias estudadas foram o cloranfenicol, a ampicilina e os glicopéptidos. Para a maioria dos antibióticos, foram registadas maiores percentagens de resistências nas

suiniculturas intensivas do que na suinicultura extensiva. Na pesquisa dos genes que conferem resistência aos glicopéptidos apenas foram encontrados os genes *vanA* (2%) e *vanC1* (4%). Nos ensaios de conjugação obtiveram-se transconjugantes para todas as classes de antibióticos estudadas. Após o estudo de susceptibilidade aos antibióticos nas bactérias transconjugantes observou-se que ocorreram fenómenos de co-transferência, sugerindo que diferentes genes de resistência se encontram nas mesmas plataformas genéticas ou que se disseminam em eventos genéticos comuns.

Os dados obtidos permitiram concluir que as suiniculturas portuguesas são reservatório de *Enterococcus* spp com resistência múltipla aos antibióticos. Estas bactérias, através da cadeia alimentar ou do contacto directo do homem com os animais ou ambiente de produção, podem colonizar pele e intestino e contribuir para a dinâmica da disseminação da resistência aos antibióticos entre bactérias comensais e patogénicas.

Estudo da susceptibilidade a antibióticos em *Enterococcus* spp oriundos do ambiente de suiniculturas
Portuguesas

Aos meus pais,

À minha irmã,

Aos meus professores.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço aos meus pais, pois ajudaram-me e apoiaram-me em tudo ao longo do curso e desta forma consegui ultrapassar mais uma etapa da minha vida. Obrigado, pais; sem vocês isto não teria sido possível!

Agradeço à Prof. Doutora Carla Novais, pela disponibilidade que sempre teve, pela ajuda, pelo incentivo e apoio que deu ao longo da elaboração desta monografia.

Agradeço ainda à Prof. Doutora Luísa Peixe (REQUIMTE/Microbiologia-Faculdade Farmácia. Universidade do Porto) por ter cedido os isolados para a realização do presente estudo.

Índice

I.	Introdução	20
1.	Características gerais de <i>Enterococcus</i> spp	20
2.	Ambiente de produção animal: uso de antibióticos e suas implicações para a saúde pública	22
3.	Disseminação horizontal da resistência a antibióticos em <i>Enterococcus</i> spp	28
II.	Objectivos	33
III.	Material e Métodos	34
1.	Origem das bactérias incluídas no presente estudo	34
2.	Avaliação da susceptibilidade aos antibióticos	35
3.	Identificação da espécie pelo método <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	35
3.1.	Reacções de amplificação	35
3.2.	Visualização dos produtos de amplificação	38
4.	Ensaio de conjugação.....	38
IV.	Resultados.....	40
1.	Identificação da espécie pelo método <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	40
2.	Avaliação da susceptibilidade aos antibióticos	41
3.	Pesquisa dos genes que conferem resistência aos glicopéptidos.....	46

Estudo da susceptibilidade a antibióticos em *Enterococcus* spp oriundos do ambiente de suiniculturas
Portuguesas

4.	Ensaio de conjugação.....	47
V.	Discussão.....	50
VI.	Bibliografia.....	54

Anexos

Índice de Figuras

Figura 1 - Vias de dispersão de bactérias patogénicas e/ou resistentes aos antibióticos entre vários nichos ecológicos. -----	27
Figura 2 - Espécies de <i>Enterococcus</i> identificadas nos isolados oriundos das suiniculturas estudadas. -----	40
Figura 3 - Isolados representativos de genes correspondentes à identificação da espécie. ----	41
Figura 4 - Percentagem de isolados de <i>Enterococcus</i> não susceptíveis (resistentes e com resistência intermédia) aos antibióticos, oriundos das três suiniculturas em estudo. -----	42
Figura 5 - Isolados representativos dos genes de resistência aos glicopéptidos. -----	46

Índice de Tabelas

Tabela 1 – <i>Primers</i> usados das reacções de PCR para identificação da espécie e de genes que conferem resistência a glicopéptidos. -----	36
Tabela 2 – Condições de amplificação usadas nos PCR realizados -----	37
Tabela 3 - Percentagem de resistência aos antibióticos apresentada pelas várias espécies de <i>Enterococcus</i> estudadas. -----	44
Tabela 4 - Fenótipos de resistência mais comuns nas várias espécies e suiniculturas.-----	45
Tabela 5 - Ensaio de conjugação para diferentes antibióticos realizados em estirpes representativas de todas as suiniculturas. -----	47
Tabela 6 - Perfil de resistências das bactérias transconjugantes comparativamente com as bactérias dadoras-----	49

Abreviaturas

CSPI - Center for Science in the Public Interest

DANMAP – The Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme

NORM/VET – Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway

INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde

EFSA - European Food Safety Authority

WHO - Organização Mundial de Saúde

EU – União Europeia

BLEAs - β -lactamases de espectro alargado

ADN (DNA) - Ácido desoxirribonucleico

MLS_B - macrólidos, lincosamidas e estreptograminas B

UV – Ultra-violeta

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

PCR - Polymerase Chain Reaction

bp – Pares de bases

BHI - Brain Heart Infusion

IV – Infra-vermelho

I. Introdução

1. Características gerais de *Enterococcus* spp

Originalmente o género *Enterococcus* foi classificado como *Streptococcus* do grupo D, sendo esta nomenclatura alterada com a utilização dos métodos modernos de taxonomia molecular (Sousa et al., 2000). A sua primeira descrição deu-se apenas em 1984 por Schleifer and Kilpper-Bälz (Klein, 2003). Desde esta data já foram referidas 28 espécies, podendo, no entanto, ocorrer novas classificações com o desenvolvimento das metodologias e com o aumento de estudos de investigação nestes microrganismos (Moreno et al., 2006).

Enterococcus spp são cocos de Gram positivo que aparecem isolados, aos pares ou em cadeias curtas. São anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, catalase e oxidase negativa e algumas espécies apresentam mobilidade (Moreno et al., 2006). Estas bactérias crescem a uma temperatura óptima de 35°C, embora a maioria das espécies possa crescer entre os 10 e os 45°C. *Enterococcus* spp são também capazes de sobreviver em condições adversas como na presença de 6,5% de cloreto de sódio, a pH 9,6 ou temperaturas de 60°C durante trinta minutos. Grande parte das espécies de *Enterococcus* pode ainda hidrolisar a esculina na presença de 40% de sais biliares (Sousa et al., 2000; Moreno et al., 2006; Ogier et al., 2007).

Esta resistência a características adversas permite a sua distribuição ubíqua pela natureza, podendo ser encontrados no ar, água, solo e vegetação, embora o seu principal reservatório seja o intestino do homem e animais de sangue quente (Franz et al., 1999, Klein, 2003; Lukášová et al., 2003). Como tal, são considerados bons indicadores de contaminação fecal (Lukášová et al., 2003). No entanto, estas bactérias aparecem também como microflora dominante em muitos alimentos (Ex: queijos tradicionais fermentados), desempenhando um papel importante na indústria alimentar associado à textura e desenvolvimento de paladar de alguns produtos (Klein, 2003, Lukášová et al., 2003).

Além das suas propriedades tecnológicas, muitas estirpes de *E. faecalis* e principalmente *E. faecium* têm a capacidade de produzir uma variedade de bacteriocinas – enterocinas (Ogier et al., 2007). As enterocinas são pequenos péptidos com actividade anti-microbiana, sendo geralmente activos contra outros enterococos e outras bactérias como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* e *Vibrio cholerae* (Franz et al., 1999; Moreno et al., 2006; Ogier et al., 2007). Bacteriocinas procedentes de *Enterococcus* spp têm sido isoladas de vários alimentos, incluindo carnes fermentadas, produtos lácteos e vegetais. Podem ser usadas como agentes anti-*Listeria* na produção de certos tipos de queijos onde o pH aumenta a níveis que permitem o desenvolvimento da *Listeria monocytogenes*. Muitas vezes, *Enterococcus* spp predominam durante a maturação, produzindo enterocinas suficientes para inibir o crescimento desta bactéria (Franz et al., 1999).

Enterococcus spp são considerados patogénicos emergentes, estando incluídos no grupo de agentes etiológicos mais frequentemente associados a infecções nosocomiais em diferentes regiões geográficas (Franz et al., 1999; Ogier et al., 2007). Em pessoas saudáveis, *Enterococcus* spp são maioritariamente inofensivos, manifestando a sua patogenicidade em indivíduos hospitalizados durante longos períodos (principalmente em unidades de cuidados intensivos) ou em indivíduos com o sistema imunológico debilitado (Ex. imunodeprimidos) (Ogier et al., 2007). Estas bactérias são responsáveis por infecções como endocardites, do tracto urinário, intra-abdominais, pélvicas e bacteriémias (Lukášová et al., 2003; Moreno et al., 2006). Os principais factores de risco incluem a presença de catéteres uretrais ou intravasculares, cirurgias, queimaduras graves, terapias prévias com antibióticos e outras doenças debilitantes associadas às infecções. No que diz respeito a infecções intra-abdominais, *Enterococcus* spp estão frequentemente associados com outros agentes patogénicos, sendo por isso difícil atribuir-lhes uma responsabilidade indiscutível neste tipo de patologias (Ogier et al., 2007).

Tem-se ainda discutido a eventual capacidade destas bactérias produzirem biofilmes em superfícies como algalias, cateteres intravenosos ou em próteses, favorecendo a sua sobrevivência na presença de antibióticos e do sistema imunitário (Amyes, 2007).

O aumento do número de estirpes multiresistentes a antibióticos, incluindo à vancomicina, faz com que estas bactérias constituam um desafio à saúde pública (Moreno et al., 2006). De facto, actualmente, encontram-se no grupo dos microrganismos nosocomiais mais preocupantes. Embora as infecções humanas, sejam sobretudo associadas a *E. faecalis*, a proporção de patologias por *E. faecium* tem vindo a aumentar, pois esta espécie adquire com mais facilidade resistência a antibióticos. Outras espécies tais como *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* ou *E. raffinosus* têm sido descritas em infecções humanas, embora em situações ocasionais (Coque et al., 2005; Treitman et al., 2005; Ogier et al., 2007).

Enterococcus resistentes a antibióticos têm sido isolados de humanos saudáveis e hospitalizados, animais, habitats aquáticos e produtos agrícolas, indicando a sua elevada capacidade de adaptação a diferentes nichos ecológicos. Estes podem servir de reservatório a bactérias resistentes e seus genes que, oportunamente, contactam com o homem e desafiam a saúde pública (Lukášová et al., 2003).

2. Ambiente de produção animal: uso de antibióticos e suas implicações para a saúde pública

Os antibióticos no ambiente de produção animal podem ser usados para o tratamento de infecções bacterianas, como agentes profiláticos ou como promotores de crescimento.

O efeito dos antibióticos como promotores do crescimento foi inicialmente descoberto, na década de 1940, quando frangos alimentados com subprodutos da fermentação da tetraciclina demonstraram crescer mais rapidamente do que aqueles em que a alimentação não continha estes componentes (Phillips et al., 2004). Depois desta descoberta, quantidades subterapêuticas de antibióticos foram usadas pelos produtores com o intuito de reduzir os custos da criação de aves, bovinos, suínos, peixes, etc (CSPI, 1999; Wegener et al., 1999). O mecanismo pelo qual os antibióticos promovem o crescimento dos animais ainda não está totalmente clarificado. No entanto, pensa-se que os antibióticos promotores do crescimento

reduzem a flora intestinal normal (por competição, pode diminuir a absorção de nutrientes) e eliminam as bactérias nocivas (podem reduzir o desempenho causando infecções subclínicas). O efeito sobre o crescimento pode ser devido a uma combinação destes dois factores. A classe de fármacos usados e o tipo de animais envolvidos determina a importância relativa de cada mecanismo (Wegener et al., 1999).

Dados dinamarqueses indicam que só entre 2006 e 2007 houve um aumento de 5,2% (de 115,2 toneladas em 2006 para 121,1 toneladas em 2007) no consumo de antibióticos na produção animal. Os antibióticos usados em suínos compreendiam 80% do total do consumo, enquanto aqueles usados em bovinos, aves de capoeira e na aquicultura são responsáveis por 12%, 0,5% e 3% do consumo, respectivamente. Em 2007, tetraciclina e macrólidos foram os antibióticos mais usados em suiniculturas. O aumento do consumo do primeiro grupo esteve, provavelmente, associado às novas directrizes de tratamento lançadas pelas autoridades veterinárias, em 2005, como uma tentativa de reduzir a utilização de macrólidos (DANMAP, 2007). Na Noruega, o uso anual de agentes antimicrobianos veterinários diminuiu gradualmente 40% de 1995 a 2001. Posteriormente, esta utilização permaneceu num nível relativamente constante embora tenha ocorrido um ligeiro aumento entre 2005 e 2006. Neste país os antibióticos mais vendidos para a terapêutica animal foram as penicilinas, as penicilinas em associação com aminoglicosídeos e as sulfonamidas em combinação com trimetoprim (NORM/NORM-VET, 2006).

Relativamente à situação de Portugal verificou-se que, entre 2004 e 2006, a comercialização de antibióticos teve um decréscimo de cerca de 45%, associada fundamentalmente à diminuição da utilização de antibióticos nos animais de produção. É de salientar que das 167 toneladas de antibióticos utilizados em 2006, cerca de 155 destinaram-se a animais de produção. Os antibióticos mais usados em veterinária pertencem ao grupo das tetraciclina, facto que se verifica nos animais de produção e nos animais domésticos. Este grupo é também o principal responsável pelo decréscimo acima referido, tendo em conta que neste período o seu consumo diminuiu de 180 para 40 toneladas. Os outros antibióticos apresentaram pouca variabilidade de comercialização ao longo destes 3 anos (INFARMED, 2007).

O uso inapropriado dos antibióticos em veterinária (muitos com estruturas análogas aqueles usados nos humanos) contribui fortemente para o aumento das resistências bacterianas, tornando estas moléculas menos úteis no tratamento de infecções humanas e animais. Um dos casos mais exemplificativos é a resistência às quinolonas em *Campylobacter* spp e *Salmonella* spp. Segundo Phillips I. *et al* (2004) a resistência à ciprofloxacina em isolados de infecções humanas era extremamente baixa nos anos 80. No entanto, com a entrada da enrofloxacin na produção animal, na década de 90, foram sendo progressivamente isoladas bactérias resistentes às quinolonas quer nos animais quer nos humanos. *Campylobacter* spp e *Salmonella* spp são bactérias zoonóticas, com alta incidência em infecções humanas e, como tal, as dificuldades no seu tratamento são preocupantes para a comunidade científica. No relatório da EFSA verifica-se que a campilobacteriose é a infecção zoonótica em humanos mais frequente nos Estados Membros, sendo a carne de frango o veículo mais importante de transmissão destas infecções. O *C. jejuni* seguido do *C. coli* são as estirpes mais frequentemente encontradas. Os humanos infectam-se por contacto directo com animais portadores ou pela ingestão de carne crua ou mal processada de aves, suínos e bovinos ou, ainda, pela ingestão de leite não pasteurizado e água. A resistência antimicrobiana de *C. coli* em isolados de suínos foi relatada por seis Estados Membros, sendo os maiores níveis de resistências associados à ciprofloxacina, eritromicina, estreptomicina e tetraciclina. Em humanos as principais resistências de *Campylobacter* spp são à ciprofloxacina, tetraciclina e ampicilina. A ocorrência de resistência à ciprofloxacina é de especial interesse, uma vez que este antibiótico é frequentemente utilizado para tratar infecções gastrointestinais graves em seres humanos (EFSA 2007).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO 2007) a salmonelose constitui um dos problemas mais comuns de saúde pública. Milhões de casos humanos são reportados anualmente no mundo, originando milhares de mortos e verificando-se nos últimos anos um aumento na incidência e severidade da infecção. Em 2004, estavam identificados cerca de 2500 serótipos diferentes de *Salmonella*, a maioria patogénicos para humanos. As principais fontes de infecção são os ovos, a carne de frango e carne de porco, sendo a *S. Enteritidis* o serótipo predominante em carne de frango e a *S. Thiphimurium* em carne de porco. Em Portugal foi efectuado, em 2005, um programa de controlo em galinhas reprodutoras de ovos e carne, sendo que a percentagem de positivos foi das mais elevadas dos países da UE, 16.7%

e 27% respectivamente. Relativamente às resistências, a maioria dos isolados de *S. Enteritidis* foram totalmente sensíveis a todos os antibióticos testados. A situação da *S. Typhimurium* foi marcadamente diferente, uma vez que quase 40% dos isolados eram resistentes a mais de 4 dos antibióticos testados (EFSA 2007).

A disseminação destas bactérias ao homem, tornou claro o papel que a cadeia alimentar possuía na disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos. Adicionalmente, actividades que colocam indivíduos em contacto directo com os animais e seus produtos (produtores, veterinários e manipuladores de alimentos) também são consideradas de risco para a aquisição de tais microrganismos.

Não devemos ainda esquecer que o transporte de animais e carne por toda a Europa e por outros países não europeus, promove a disseminação de isolados resistentes aos antibióticos em áreas geograficamente afastadas. Por exemplo, Novais *et al.* (2005), descreveram um clone de *Enterococcus faecium* resistentes aos glicopéptidos presente durante vários anos em suínos de Portugal, Espanha, Dinamarca e Suíça.

Países como a Finlândia, França, Alemanha, Espanha, Suécia, Países Baixos e Reino Unido já tomaram medidas para monitorizar o consumo de antibióticos em animais e as resistências bacterianas em humanos, animais e alimentos de forma a controlar a transferência e o aumento das resistências nos isolados veterinários. Também o programa de controlo da Dinamarca *Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme* (DANMAP), estabelecido há alguns anos, aborda o problema das bactérias resistentes aos antibióticos nos animais, alimentos e seres humanos (Fluit *et al.*, 2006).

Para além das bactérias patogénicas, no ambiente de produção animal, podem seleccionar-se bactérias comensais resistentes a antibióticos, capazes de funcionarem como reservatório e agentes disseminadores de elementos genéticos com interesse clínico. Dentro destes géneros podemos destacar *Enterococcus* spp e bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. Por exemplo, um estudo português descreve a presença de integrões e de vários genes de resistência, nomeadamente codificadores de BLEAs (β -lactamases de espectro alargado) em amostras de *Enterobacteriaceae* provenientes de suínos e frangos, confirmando o papel dos

animais como possíveis reservatórios de bactérias e elementos de resistência na comunidade. Vários isolados produtores de BLEAs apresentavam resistência aos antibióticos utilizados na produção animal intensiva, nomeadamente à estreptomicina, sulfonamidas e trimetoprim. Muitas destas resistências demonstraram estar associadas a estirpes de *Escherichia coli* comensais provenientes de animais e humanos (Machado et al., 2008).

Embora, o intestino seja o ecossistema natural das bactérias entéricas, estas conseguem sobreviver em diferentes ambientes. Resistências bacterianas a β -lactâmicos, quinolonas, tetraciclina e sulfonamidas têm sido encontradas em águas residuais de todo o mundo (Kümmerer, K. 2009), especialmente nos países subdesenvolvidos (Witte, 2000; Phillips et al., 2004). Este tipo de contaminação também ocorre ocasionalmente em países desenvolvidos. Por exemplo, num estudo alemão, bactérias resistentes aos antibióticos foram detectadas em plantas duas semanas após a rega com águas residuais contendo coliformes resistentes aos antibióticos. Os dados encontrados levaram os autores a reflectir sobre a importância do papel dos esgotos e das águas residuais na transmissão de bactérias resistentes aos antibióticos para os seres humanos (Witte, 2000).

A prevalência de bactérias resistentes pode decrescer quando o uso de antibióticos na produção animal é diminuído ou mesmo descontinuado. Embora estirpes individuais possam reter os genes de resistência, elas podem ser substituídas por estirpes sensíveis quando a pressão selectiva é removida. Por exemplo, na Suécia já não se usam antibióticos como promotores de crescimento desde 1986 e, apesar de não ter havido uma erradicação completa de bactérias resistentes, observou-se uma diminuição destas nos animais, produtos alimentares e no Homem (Casewell et al., 2003; Dibner et al., 2005; Garofalo et al, 2007; Phillips, 2007).

Alguns estudos também indicam a persistência de resistências específicas, nomeadamente à vancomicina em *Enterococcus* spp muito tempo após a abolição da avoparcina, indicando que o problema das resistências no nicho animal é multifactorial e pode não ser resolvido apenas com a diminuição do consumo de antibióticos (NORM NORM-VET, 2000; Bonten et al., 2001; Phillips et al., 2004). Dado o modo promíscuo como as bactérias podem partilhar informação genética, as recomendações para evitar a utilização de antibióticos de uso humano na produção animal revelaram-se insuficientes (Summers, 2006).

3. Disseminação horizontal da resistência a antibióticos em *Enterococcus* spp

Além de serem resistentes a vários factores físico-químicos e ambientais, *Enterococcus* spp possuem um amplo espectro de resistências naturais e adquiridas a antibióticos. *Enterococcus* spp são naturalmente resistentes às penicilinas, aminoglicosídeos em baixa concentração, lincosamidas, entre outros (Klare et al., 2003; Poeta et al., 2005). As resistências adquiridas podem ocorrer devido a modificações genéticas dos microrganismos (acumulação de mutações no ADN ou aquisição de genes de resistência transferíveis de células de dadoras), sendo as bactérias resistentes posteriormente seleccionadas devido a pressão selectiva associada ao uso de antibióticos (utilização de concentrações terapêuticas e subterapêuticas) (Klare et al., 2003).

A disseminação horizontal de resistências envolve a transmissão de material genético de célula para célula, geralmente sob a forma de genes que codificam proteínas que não estavam presentes anteriormente na bactéria receptora. Muitos destes genes são transmitidos horizontalmente entre espécies ou entre géneros, em plasmídios conjugativos ou elementos conjugativos integrados (Ex: transposões) cuja eficácia está associada à frequente detecção de resistências aos antibióticos entre *Enterococcus* spp (Hastings et al., 2004; Ogier et al., 2007).

Embora as resistências aos vários antibióticos em *Enterococcus* spp de origem animal sejam variáveis entre diferentes países, nos últimos anos foi referida diminuição de susceptibilidade a várias classes de agentes antimicrobianos em isolados de todo o mundo. Entre os antibióticos descritos encontram-se as resistências aos glicopéptidos, aminoglicosídeos, tetraciclina e macrólidos. Na Europa, a tetraciclina é o antibiótico que apresenta os níveis de resistência mais elevados, com percentagens de resistência acima dos 50%, valores estes com tendência a aumentarem. Na Dinamarca, em 2007, a resistência para este antibiótico era de 89% em *E. faecalis* e 67% em *E. faecium* (DANMAP, 2007), enquanto que em 2006 a percentagem rondava os 60% (DANMAP, 2006). Outro exemplo é o caso da Hungria onde em 2004, 62,5% das estirpes de *Enterococcus* spp isoladas de suínos eram resistentes, valores bastante superiores aos verificados em 2002 e 2003 (25,9% e 54,7% respectivamente) (Kaszanyitzky et al., 2007). Em Portugal os valores registados são igualmente muito elevados, observando-se percentagens de resistência acima dos 90% (Novais et al., 2005; Poeta et al., 2006).

Enterococcus spp isolados de humanos, animais, meio ambiente e outras origens, são muitas vezes resistentes às tetraciclina devido à presença de várias classes de genes de resistência (*tet*). Os genes *tet* encontrados em *Enterococcus* spp são: *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetO*, *tetS* e *tetU* (Chopra et al., 2001; Klare et al., 2003). A maioria dos genes *tet* está associada com elementos genéticos conjugativos, o que pode explicar, parcialmente, a sua ampla distribuição entre as espécies bacterianas (Chopra et al., 2001; Fluit et al., 2001). Num estudo anterior, o gene de *tetM* (associado à protecção ribossomal) foi encontrado em 95% dos *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* de seres humanos, suínos e frangos (Aarestrup et al., 2000). Não só em *Enterococcus* spp mas também noutras espécies bacterianas, o gene *tetM* foi encontrado associado fundamentalmente ao transposição conjugativo Tn916 (Klare et al., 2003;

Agersø et al., 2006). *tetM* juntamente com o gene *tetL* (codifica uma bomba de efluxo), têm sido designados por vários autores como os mecanismos de resistência à tetraciclina mais importantes associados a *Enterococcus* spp (Poeta et al., 2005).

Uma das resistências mais estudadas relativamente a *Enterococcus* spp é a resistência aos glicopéptidos. O elevado uso de vancomicina nos hospitais conduziu ao aparecimento de *Enterococcus* spp resistentes a estas moléculas principalmente nos hospitais americanos (menos frequentemente nos hospitais Europeus). A utilização da avoparcina, sobretudo na Europa, contribuiu fortemente para o aparecimento destes *Enterococcus* spp resistentes fora do ambiente hospitalar (Bonten et al., 2001). Embora a Hungria, em 2004, não apresentasse resistências à vancomicina, em 2001 e 2002 as resistências eram superiores a 10% (Kaszanyitzky et al., 2007). Na Dinamarca, em 2007, a resistência a este antibiótico era de 2%, valor inferior ao de 2006 onde a taxa de resistência era de 3,4% (DANMAP, 2006; DANMAP, 2007). Portugal apresenta valores contraditórios uma vez que há estudos onde a percentagem de resistência é de 48% e outros onde não se verifica resistência a este antibiótico (Novais et al., 2005; Poeta et al., 2006).

As resistências à vancomicina constituem um grande problema no tratamento de infecções humanas uma vez que este antibiótico é utilizado como um dos últimos recursos no tratamento de infecções enterocócicas associadas a isolados multiresistentes (Ogier et al., 2007). Em *Enterococcus* spp, foram já descritos seis diferentes genótipos de resistência aos glicopéptidos. Um dos genótipos de resistência (*vanC*) corresponde à resistência intrínseca à vancomicina em *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* e *E. flavescens*, enquanto os restantes cinco correspondem à resistência induzida. O genótipo de resistência *vanA* é o mais frequente e está associado com um elevado nível de resistência induzida para vancomicina e teicoplanina (Bonten et al., 2001; Courvalin et al., 2006; Moreno et al., 2006; Ogier et al., 2007). O gene *vanB* é menos prevalente e codifica resistência à vancomicina e susceptibilidade à teicoplanina, embora a resistência a este antibiótico se possa desenvolver rapidamente durante o tratamento (Bonten et al., 2001). A disseminação horizontal da resistência aos glicopéptidos foi descrita fundamentalmente para estes dois genótipos, estando envolvidos elementos genéticos móveis ou mobilizáveis como os transposões Tn1546 para *vanA* e Tn1547, Tn1549 ou Tn5382 para *vanB* (Courvalin et al., 2006). Em vários países, nomeadamente nos

Europeus, o genótipo *vanA* foi identificado em *Enterococcus* spp isolados de humanos saudáveis, esgotos, fezes de animais e carne crua, evidenciando que outros nichos para além do hospitalar funcionam como reservatórios deste tipo de microrganismos (Woodford et al., 1998). Este fenótipo de resistência ocorre principalmente em *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*, podendo aparecer também em *Enterococcus avium*, *Enterococcus durans* e *Enterococcus raffinosus* (Courvalin et al., 2006).

Antibióticos da classe dos macrólidos, lincosamidas, estreptograminas B (MLS_B) e aminoglicosídeos são usados na medicina humana e veterinária (Portillo et al., 2000; De Leener et al., 2005). Taxas de resistência elevadas à eritromicina e a estreptomicina têm sido descritas em várias regiões do globo. Em 2002, em Espanha, as resistências eram de 86% para a eritromicina e 64% para a estreptomicina em *E. faecium*. No mesmo ano, a Suécia apresentava valores de 6% e 0% para estes mesmos antibióticos, evidenciando assim diferenças nas taxas de resistência em alguns países da Europa, provavelmente associadas a diferenças na utilização dos agentes antimicrobianos (Aarestrup et al., 2002). Na Hungria, a resistência a estes antibióticos também têm aumentado apresentando valores, em 2004, de 18,8% para a eritromicina e 12,5% para a estreptomicina (Kaszanyitzky et al., 2007). Na Dinamarca, de 2006 a 2007, a resistência à eritromicina aumentou significativamente em *E. faecium* isolados de suínos (34,5% e 47% respectivamente). Este aumento ocorreu concomitantemente com o incremento significativo do consumo de macrólidos na produção destes animais (DANMAP, 2007).

No caso da gentamicina, as resistências são relativamente baixas. Em 2002 a Suécia não apresentou nenhum caso de resistência a este antibiótico, verificando-se o mesmo caso em 2004 na Hungria (Aarestrup et al., 2002; Kaszanyitzky et al., 2007). Relativamente à Dinamarca, em 2007, foi registado 9% de resistências em *E. faecalis* enquanto todos os isolados de *E. faecium* eram susceptíveis (DANMAP, 2007). Em Portugal verificam-se valores de resistência à eritromicina superiores a 80%. No caso dos aminoglicosídeos, estreptomicina e gentamicina os valores são díspares, encontrando-se para a primeira percentagens de resistência bastantes elevados e para a gentamicina valores mais baixos (Novais et al., 2005; Poeta et al., 2006).

Já foram descritos diferentes mecanismos de resistência associados ao grupo MLS_B. A resistência a este grupo de antibióticos em *Enterococcus* spp está frequentemente associada com a presença do gene *ermB*, que é disseminado por vários elementos genéticos nomeadamente o transposição conjugativo Tn917 (Aarestrup et al., 2000; Portillo et al., 2000; Fluit et al., 2001). Este gene confere resistência cruzada a macrólidos, lincosamidas e estreptograminas do grupo B, é muito comum em *Enterococcus* spp de humanos, suínos e aves de capoeira (De Leener et al., 2005). O gene *ermA* é menos prevalente que o anterior, sendo também possível encontrar associações entre estes dois genes (Fluit et al., 2001).

Enterococcus spp podem adquirir genes de resistência aos aminoglicosídeos que codificam para a produção de enzimas que modificam o antibiótico eliminando o seu efeito bactericida (Chow, 2002). Já foram descritas mais de 50 enzimas que modificam os aminoglicosídeos (Fluit et al., 2001), algumas com especificidade para diferentes moléculas desta classe de antibióticos. Os genes *aac(6')-Ie-aph(2'')*-Ia, *aph(2'')*-Ib, *aph(2'')*-Ic e *aph(2'')*-Id medeiam a resistência à gentamicina, enquanto os genes *ant(3')*-Ia e *ant(6')*-Ia conferem resistência à estreptomicina (Chow, 2002; Klare et al., 2003). Destes genes, *aac(6')-Ie-aph(2'')*-Ia é o que tem maior significado clínico, pois *Enterococcus* spp que o possuem são resistentes a praticamente todos os aminoglicosídeos disponíveis clinicamente com excepção de estreptomicina (Chow, 2002).

Em virtude das grandes quantidades de antibióticos que têm sido consumidas no ambiente de produção animal, a descrição de bactérias resistentes aos antibióticos (comensais ou patogénicas) e/ou dos seus genes de resistência tem-se demonstrado da maior importância, uma vez que estas podem ser disseminadas ao homem, contribuindo para uns dos desafios actuais da saúde pública: o tratamento de infecções humanas associadas a bactérias com resistência múltipla aos antibióticos.

II. Objectivos

Estudos de diferentes países (Aarestrup et al., 2002; Novais et al., 2006; Poeta et al., 2006; DANMAP, 2007; Kaszanyitzky et al., 2007; NORM/NORM-VET, 2007) têm descrito o aparecimento de bactérias oriundas de animais de produção com resistência múltipla aos antibióticos. Estes dados são preocupantes pela possível passagem dos microrganismos ou dos seus genes de resistência aos humanos através da cadeia alimentar. Uma vez que existe escassa informação da presença de bactérias resistentes aos antibióticos em suiniculturas portuguesas e de, recentemente, ter sido divulgado um relatório do INFARMED (INFARMED, 2007) mencionando o consumo de grandes quantidades de antibióticos no ambiente de produção animal constituíram objectivos deste trabalho:

- (i) Identificar ao nível da espécie *Enterococcus* spp provenientes de diferentes tipos de amostras (animais, ambientais, alimentares e medicamentosas) de suiniculturas portuguesas com dois tipos de produção: intensiva e extensiva;
- (ii) Avaliar a susceptibilidade de *Enterococcus* spp a diferentes famílias de antibióticos usados em medicina humana;
- (iii) Pesquisar a presença dos genes mais comuns associados à resistência a glicopéptidos;
- (iv) Avaliar a capacidade de transferência de resistência à tetraciclina, aminoglicosídeos, macrólidos e glicopéptidos através de ensaios de conjugação com estirpes representativas de cada suinicultura.
- (v) Avaliar, nos transconjugantes, a resistência a diferentes famílias de antibióticos co-transferidos nos ensaios de conjugação juntamente com os antibióticos utilizados na selecção.

III. Material e Métodos

1. Origem das bactérias incluídas no presente estudo

Entre Maio e Dezembro de 2007 foram colhidas 53 amostras em 2 suiniculturas de produção intensiva do Norte (E, F) e 1 suinicultura de produção extensiva do Sul de Portugal (D). As amostras foram classificadas em 4 grupos de acordo com a sua origem:

- (i) oriundas de suínos: n=17 (fezes (n=10), zaragatoa rectal (n=3), da narina (n=1), de unha (n=1) e da superfície dos animais (n=2));
- (ii) oriundas de água e alimentos: n=13 (ração do saco original e comedouros (n=6), água para consumo não tratada e tratada com UV e cloro, antes e depois de ir para os bebedouros (n=7));
- (iii) oriundas de resíduos: n=7 (chorume (n=1), esterco seco usado posteriormente na agricultura (n=1), lagonagem (n=2) e fossa (n=3)).
- (iv) oriundas de outros pontos do ambiente das suiniculturas: n=16 (ar de diferentes salas com animais (n=4), sistema de ventilação (n=1), paredes e pavimentos de salas desinfectadas e não desinfectadas (n=7), doseador de ração (n=1), terra utilizada por suínos de várias idades (n=2) e terra em fase de pousio (não usada por suínos no momento da colheita) (n=1)).

Todas as amostras foram processadas no laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia do Porto, tendo sido guardadas 185 bactérias identificadas como *Enterococcus* spp.

2. Avaliação da susceptibilidade aos antibióticos

O estudo da susceptibilidade aos antibióticos foi executado em todos os isolados de *Enterococcus* spp pelo método de difusão em agar com discos segundo as normas de CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (CLSI, 2006). Inicialmente foi realizada uma suspensão bacteriana, em tubos de soro fisiológico estéreis, com densidade óptica de 0,5 MacFarland, sendo depois semeado em meio de cultura Mueller-Hinton 2 (bioMérieux). À superfície do meio de cultura foram colocados discos impregnados com antibióticos em concentrações definidas pelas normas anteriormente citadas. Os antibióticos testados incluíram a vancomicina 30µg, teicoplanina 30µg, ampicilina 10µg, tetraciclina 30µg, minociclina 30µg, eritromicina 15µg, quinupristina-dalfopristina 15µg, ciprofloxacina 5µg, cloranfenicol 30µg, gentamicina 120µg, estreptomicina 300µg e nitrofurantoína 300µg (Oxoid, bioMérieux e Beckm-Dickinson). As placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas, no fim das quais se mediu, com craveira, os halos de inibição à volta dos discos. De acordo com o tamanho dos halos apresentados as bactérias foram classificadas como susceptíveis (S), com resistência intermédia (I) ou resistentes (R). A bactéria usada como controlo foi *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

3. Identificação da espécie pelo método *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

3.1. Reacções de amplificação

A identificação das espécies *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. durans* e *E. hirae* e a pesquisa dos genes que mais frequentemente conferem resistência aos glicopéptidos (*vanA*, *vanB*, *vanC-1* e *vanC-2*) foi realizada através de dois PCR *multiplex* com condições previamente descritas (Satake et al, 1997; Arias et al, 2006) (Tabela 1 e Tabela 2).

Tabela 1 – Primers usados das reacções de PCR para identificação da espécie e de genes que conferem resistência a glicopéptidos.

Espécies e genes que conferem resistência aos glicopéptidos	Primers	Sequência	Referência
<i>E. hirae</i>	murG-F	5'-GGCATATTTATCCAGCACTAG-3'	Arias e al, 2006
	murG-R	5'-CTCTGGATCAAGTCCATAAGTGG-3'	
<i>E. durans</i>	mur-ed-F	5'-AACAGCTTACTTGACTGGACGC-3'	Arias e al, 2006
	mur-ed-R	5'-GTATTGGCGCTACTACCCGTATC-3'	
<i>E. faecium</i>	E1	5'-ATC AAG TAC AGT TAG TCT T-3'	Satake et al, 1997
	E2	5'-ACG ATT CAA AGC TAA CTG-3'	
<i>E. faecalis</i>	F1	5'-GCA AGG CTT CTT AGA GA-3'	Satake et al, 1997
	F2	5'-CAT CGT GTA AGC TAA CTT C-5'	
<i>van A</i>	A1	5'-GGG AAA ACG ACA ATT GC-3'	Satake et al, 1997
	A2	5'-GTA CAA TGC GGC CGT TA-3'	
<i>van B</i>	B1	5'-ATG GGA AGC CGA TAG TC-3'	Satake et al, 1997
	B2	5'-GAT TTC GTT CCT CGA CC-3'	
<i>van C₁</i>	C1-1	5'- GAA AGA CAA CAG GAA GAC CGC-3'	Satake et al, 1997
	C1-2	5'-ATC GCA TCA CAA GCA CCA ATC-3'	
<i>van C₂</i>	C2-1	5'-CGG GGA AGA TGG CAG TAT-3'	Satake et al, 1997
	C2-2	5'-CGC AGG GAC GGT GAT TTT-3'	

Tabela 2 – Condições de amplificação usadas nos PCR realizados

Objectivo	Reagentes	Marca	Concentração stock	Concentração final	Condições do termociclador	Tamanho do produto amplificado (bp)	
Identificação de <i>E. hirae</i>	Tampão	Promega	10x	5x	95°C - 10 min 1 ciclo 94°C - 30s ; 55°C - 30s; 72°C - 30s 25 ciclos 72°C - 10 minutos 1 ciclo	521	
	MgCl ₂	Promega	25mM	2mM			
	dNTP's	Frilabo	10mM	0,2mM			
	Taq Polimerase	Promega	5U/μl	1,25U			
Identificação de <i>E. durans</i>	murG-F	Frilabo	100μM	0,5 μM	72°C - 10 minutos 1 ciclo	177	
	murG-R	Frilabo	100μM	0,5 μM			
	mur-ed-F	Frilabo	100μM	0,5 μM			
	mur-ed-R	Frilabo	100μM	0,5 μM			
Identificação de <i>E. faecalis</i>	Tampão	Promega	10x	5x		941	
	MgCl ₂	Promega	25mM	2mM			
	dNTP's	Frilabo	10mM	0,2mM			
Identificação de <i>E. faecium</i>	Taq Polimerase	Promega	5U/μl	1,25U	95°C - 10 min 1 ciclo 94°C - 30s 55°C - 30s 72°C - 30s 25ciclos 72°C - 10 min 1 ciclo	550	
	E1	Frilabo	100μM	0,5 μM			
Identificação de genes que conferem resistência a glicopéptidos:	E2	Frilabo	100μM	0,5 μM			
	F1	Frilabo	100μM	0,5 μM			
	F2	Frilabo	100μM	0,5 μM			
	A1	Frilabo	100μM	0,5 μM			
	A2	Frilabo	100μM	0,5 μM			
	vanA	B1	Frilabo	100μM			0,5 μM
	vanB	B2	Frilabo	100μM			0,5 μM
	vanC ₁	C1-1	Frilabo	100μM			0,5 μM
vanC ₂	C1-2	Frilabo	100μM	0,5 μM			
	C2-1	Frilabo	100μM	0,5 μM		732	
						625	
						796	
						484	

3.2. Visualização dos produtos de amplificação

Os produtos de PCR amplificados foram detectados após uma electroforese horizontal em gel com 2% de agarose em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE 1x) contendo 0,01% de revelador de DNA fluorescente-Sybr Safe DNA gel stain (Invitrogen). Como marcador de peso molecular foi usado o Hyperladder IV (Bioline) com as condições descritas pelo fabricante. A electroforese foi realizada a 110 volts durante 40 minutos. Os resultados foram observados num transiluminador e registados digitalmente com programa Quantati one version 4.6.1 Buidl 055. (BioRad).

4. Ensaio de conjugação

Foram realizados ensaios de conjugação em 76 isolados representativos das três suiniculturas de modo a estudar a transferência de resistências a quatro classes de antibióticos: tetraciclina (30 *E. faecium*), aminoglicosídeos (5 *E. faecium*; 11 *E. faecalis*), macrólidos (16 *E. faecium*; 6 *E. faecalis*) e glicopéptidos (3 *E. faecium*). Como estirpes receptoras usou-se *E. faecalis* JH2.2 e *E. faecium* BM4105 sensíveis a todos os antibióticos com excepção da rifampicina e ácido fusídico.

As bactérias em estudo, denominadas dadoras, e as bactérias receptoras foram inoculadas em 5ml de *Brain Heart Infusion* (BHI) caldo (OXOID) e incubadas a 37°C durante um período de 16 horas. Nos caldos das dadoras correspondentes aos ensaios de conjugação com tetraciclina, colocou-se um disco deste antibiótico para estimular possíveis transferências de transposões associados à resistência à tetraciclina que possam estar presentes.

As bactérias dadoras e receptoras foram misturadas na proporção de 1:1, tendo sido 200µl desta mistura colocados em BHI agar e incubados a 37°C durante 24 horas. Após este tempo retirou-se a totalidade deste crescimento para 1 ml de soro fisiológico, tendo sido espalhados 100µl desta suspensão em placas de selecção contendo antibióticos (60µg/ml de rifampicina e

6µg/ml de tetraciclina, 500µg/ml de gentamicina, 8µg/ml de eritromicina ou 6 µg/ml de vancomicina). Posteriormente as placas foram incubadas 48 horas a 37°C.

Para verificar a viabilidade das placas de selecção usaram-se as bactérias receptoras (BM4105 e JH2.2) como controlos negativos e transconjugantes previamente caracterizados no laboratório como controlos positivos. Para a tetraciclina o transconjugante usado foi TC446511.1, para a gentamicina a TCG 122.3, para a eritromicina a TC446511.2 e para a vancomicina a TC H182.1.

Isolaram-se em BHI agar 1 a 3 colónias das placas de selecção com crescimento, tendo sido colocados no primeiro quadrante discos de rifampicina, ácido fusídico e tetraciclina, gentamicina, eritromicina ou vancomicina. As placas foram incubadas a 37°C durante 24h e as bactérias que demonstraram ser resistentes à rifampicina, ácido fusídico e a um dos outros quatro antibióticos (de acordo com o tipo de conjugação), foram classificadas como possíveis transconjugantes.

Com o intuito de confirmar a presença de transconjugantes e fenómenos de co-transferência da resistência a antibióticos de outras famílias que não as estudadas, foram realizados antibiogramas de acordo com o procedimento descrito no ponto dois deste capítulo.

IV. Resultados

1. Identificação da espécie pelo método *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Dos 185 isolados das três suiniculturas estudadas, *Enterococcus faecium* foi a espécie predominantemente encontrada (56%; n=104/185), seguindo-se *E. hirae*, *E. faecalis* e *E. gallinarum* (Fig. 1). Em quinze por cento de *Enterococcus* spp (n=28/104) foi apenas possível a identificação até ao género, uma vez que não se obteve nenhum resultado positivo correspondente às 6 espécies incluídas nos PCR executados.

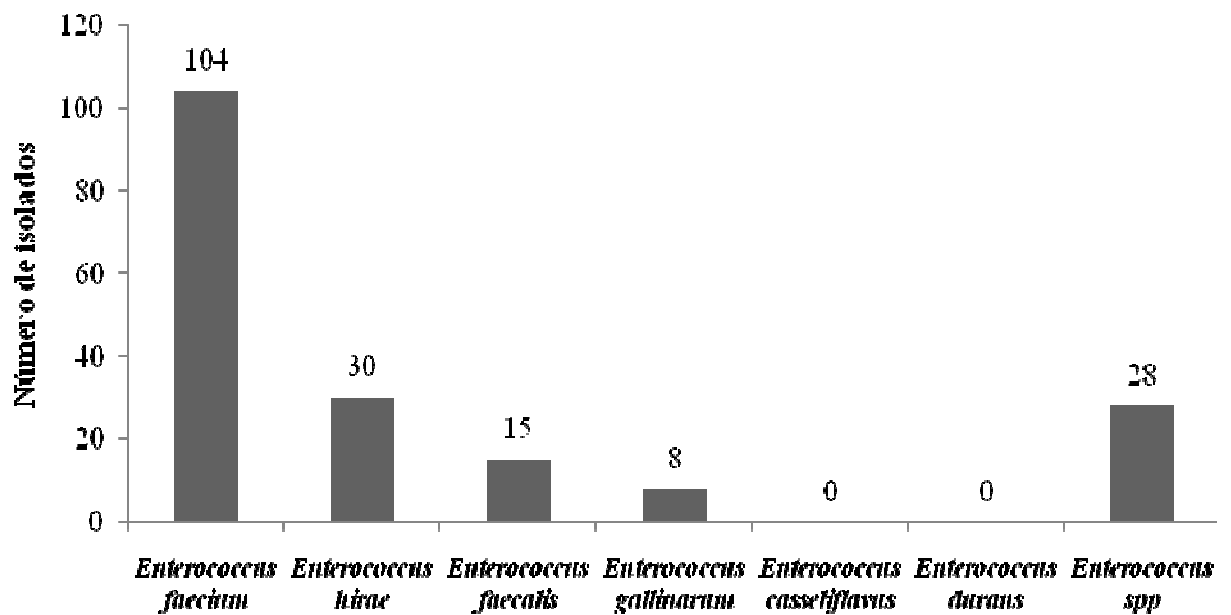


Figura 2 - Espécies de *Enterococcus* identificadas nos isolados oriundos das suiniculturas estudadas.

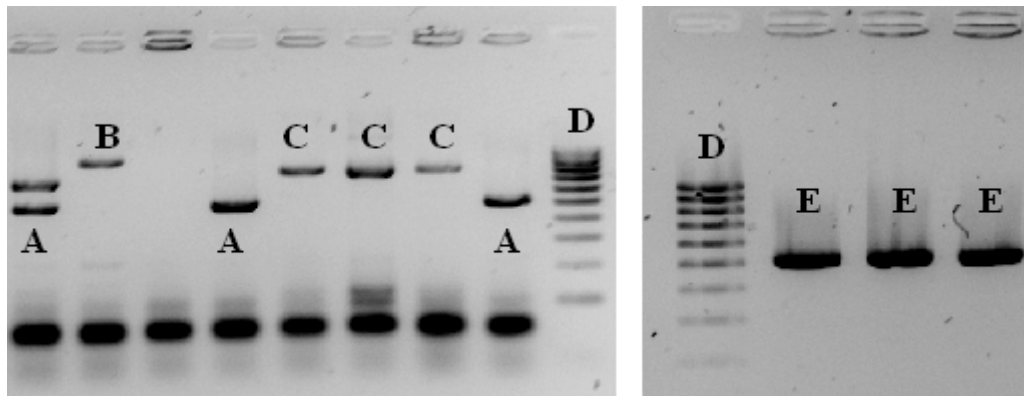


Figura 3 - Isolados representativos de genes correspondentes à identificação da espécie. A – *E. faecium* (532bp); B – *E. faecalis* (941bp); C – Gene *vanC1 E. gallinarum* (796bp); D – Marcador de DNA (Hyperladder IV (Bioline)); E – *E. hirae* (521bp).

2. Avaliação da susceptibilidade aos antibióticos

Observando a Fig.3 verifica-se que, nas três suiniculturas estudadas, mais de 75% dos isolados apresentaram diminuição de susceptibilidade às tetraciclinas (tetraciclina e minociclina) ou macrólidos (eritromicina). A resistência a este último antibiótico detectou-se sobretudo da suinicultura F (74%; n=25/34), enquanto na suinicultura extensiva D a maioria dos isolados apresentaram uma resistência intermédia (52%; n=25/48).

Foram raros os isolados da suinicultura extensiva D que apresentaram resistência aos aminoglicosídeos (0% para a gentamicina e 6% para a estreptomicina). Percentagens mais elevadas foram encontradas nas suiniculturas intensivas, sobretudo na F. Observou-se que 14 a 21% dos isolados apresentaram elevados níveis de resistência à gentamicina e entre 24 a 62% elevados níveis de resistência à estreptomicina. No caso da nitrofurantoína ocorre o oposto, já que a diminuição de susceptibilidade na suinicultura extensiva (D) é maior do que nas intensivas (E e F).

Mais de 50% dos isolados das três suiniculturas apresentaram diminuição de susceptibilidade à quinupristina-dalfopristina e à ciprofloxacina.

Os antibióticos que apresentam maior actividade sobre as bactérias estudadas foram o cloranfenicol, a ampicilina e os glicopéptidos (vancomicina e teicoplanina) (Fig.3).

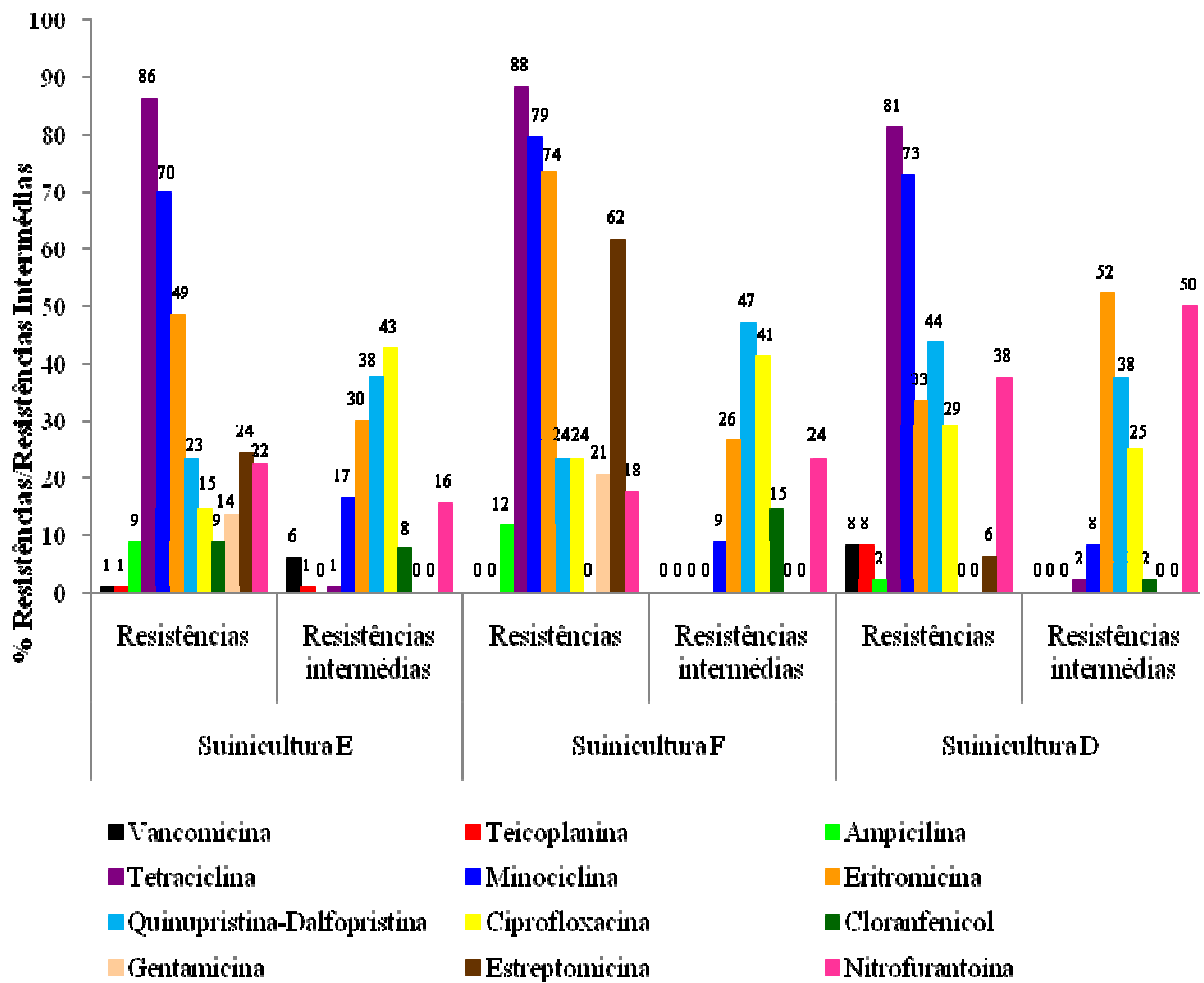


Figura 4 - Percentagem de isolados de *Enterococcus* não susceptíveis (resistentes e com resistência intermédia) aos antibióticos, oriundos das três suiniculturas em estudo.

Analisando a Tabela 1 verifica-se que a diminuição de susceptibilidade a antibióticos como as tetraciclinas e macrólidos se faz sentir de uma forma mais homogénea para todas as espécies estudadas. No entanto, observa-se que, de uma maneira geral, a resistência aos glicopéptidos, ampicilina e ciprofloxacina é mais marcante na espécie *E. faecium*. Como esperado, *E. gallinarum* apresenta, em algumas suiniculturas (E), diminuição de susceptibilidade à vancomicina pelo facto de possuir intrinsecamente o gene *vanC1*.

E. faecalis destacou-se como sendo a espécie com mais resistência à gentamicina, cloranfenicol e, como esperado, à quinupristina-dalfopristina, uma vez que apresenta uma resistência natural a este último antibiótico.

E. hirae parece ser a espécie menos propensa a acumular resistência.

Tabela 3 - Percentagem de resistência aos antibióticos apresentada pelas várias espécies de *Enterococcus* estudadas.

Suinicultura	Espécie	Nº de isolados	% Resistências																							
			Vanco	Teico	Ampi	Tetra	Mino	Eritro	Q/D	Cipro	Cloran	Genta	Estrep	Nitro												
E	<i>E. faecium</i>	52	2	0	2	0	15	0	85	0	73	12	54	35	8	44	23	48	0	8	8	0	29	0	29	23
	<i>E. faecalis</i>	10	0	0	0	0	0	100	0	80	20	50	30	100	0	0	50	70	0	50	0	30	0	0	0	0
	<i>E. hirae</i>	12	0	0	0	0	0	0	92	0	50	42	17	25	0	42	8	8	0	8	0	0	8	0	25	17
	<i>E. gallinarum</i>	7	0	43	0	0	14	0	86	0	86	0	57	14	14	57	0	71	0	14	14	0	0	0	0	14
	<i>Enterococcus spp</i>	22	0	9	0	5	0	0	82	5	64	18	50	27	41	32	9	36	9	9	18	0	27	0	23	5
F	<i>E. faecium</i>	23	0	0	0	0	17	0	87	0	78	9	70	30	9	57	30	43	0	13	9	0	57	0	22	35
	<i>E. faecalis</i>	5	0	0	0	0	0	100	0	100	0	100	0	80	20	0	40	0	20	80	0	100	0	0	0	0
	<i>E. hirae</i>	3	0	0	0	0	0	0	100	0	67	33	100	0	0	67	33	0	0	0	0	0	33	0	33	0
	<i>E. gallinarum</i>	1	0	0	0	0	0	0	100	0	100	0	0	100	100	0	0	100	0	100	0	0	0	0	0	0
	<i>Enterococcus spp</i>	2	0	0	0	0	0	0	50	0	50	0	50	50	50	0	0	50	0	0	50	0	100	0	0	0
D	<i>E. faecium</i>	29	10	0	10	0	3	0	90	0	83	7	41	55	31	41	41	14	0	3	0	0	7	0	34	48
	<i>E. hirae</i>	15	0	0	0	0	0	0	67	0	60	7	27	40	73	20	0	40	0	0	0	0	7	0	47	5
	<i>Enterococcus spp</i>	4	25	0	25	0	0	0	75	25	50	25	0	75	25	75	50	50	0	0	0	0	0	0	25	50

NOTA: As percentagens observadas na tabela incluem os isolados resistentes e com resistência intermédia.

Legenda: Vanco – Vancomicina; Teico – Teicoplanina; Ampic - Ampicilina; Tetra – Tetraciclina; Mino – Minociclina; Eritro – Eritromicina; Q/D – Quinupristina/Dalfopristina; Cipro – Ciprofloxacina; Cloran – Cloranfenicol; Genta – Gentamicina; Estrep – Estreptomicina; Nitro - Nitrofurantoína

Na Tabela 2 estão representados os 10 fenótipos de resistência mais predominantes de um total de 61. O mais comum é a resistência simultânea à tetraciclina e minociclina que aparece nas 3 suiniculturas em estudo e em todas as espécies, exceptuando *Enterococcus faecalis*. Os outros fenótipos incluem menos isolados mas um maior número de antibióticos. Verifica-se que, associada à resistência às tetraciclinas, aparecem frequentemente resistências a quinolonas, macrólidos, quinupristina-dalfopristina e aminoglicosídeos, sugerindo que, eventualmente, os genes que as codificam possam estar nos mesmos elementos genéticos.

Tabela 4 - Fenótipos de resistência mais comuns nas várias espécies e suiniculturas.

Fenótipo de resistência	Número de isolados	Espécies	Suiniculturas
Tetraciclina, Minociclina	19	<i>E. faecium</i> <i>E. hirae</i> <i>E. gallinarum</i> <i>Enterococcus spp</i>	E F D
Tetraciclina, Minociclina, Ciprofloxacina	13	<i>E. faecium</i> <i>E. hirae</i> <i>Enterococcus spp</i>	E F D
Tetraciclina, Minociclina, Ciprofloxacina, Estreptomina	10	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>	E F D
Tetraciclina, Minociclina, Nitrofurantoína	8	<i>E. faecium</i> <i>E. hirae</i> <i>Enterococcus spp</i>	E D
Tetraciclina, Minociclina, Eritromicina, Quinopristina/Dalfopristina	8	<i>E. faecium</i> <i>E. hirae</i> <i>Enterococcus spp</i>	E F D
Tetraciclina, Minociclina, Eritromicina, Quinopristina/Dalfopristina, Gentamicina Nitrofurantoína	7	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>Enterococcus spp</i>	E F
Tetraciclina, Minociclina, Eritromicina,	6	<i>E. faecium</i> <i>E. hirae</i> <i>E. gallinarum</i>	E F D
Tetraciclina, Minociclina, Quinopristina/Dalfopristina	5	<i>E. faecalis</i> <i>E. gallinarum</i> <i>Enterococcus spp</i>	E F
Tetraciclina, Minociclina, Eritromicina, Nitrofurantoína	5	<i>E. faecium</i>	E F D
Tetraciclina, Minociclina, Eritromicina, Quinopristina/Dalfopristina, Gentamicina, Estreptomina	5	<i>E. faecalis</i> <i>Enterococcus spp</i>	E

3. Pesquisa dos genes que conferem resistência aos glicopéptidos

Na pesquisa dos genes que conferem resistência aos glicopéptidos apenas foram encontrados os genes *vanA* (2%) e *vanC1* (4%). Como esperado o gene *vanC1* foi observado apenas em *E. gallinarum* pois é intrínseco desta espécie. Este gene confere, geralmente, baixa resistência à vancomicina, sendo, no entanto, alguns dos isolados estudados, fenotipicamente susceptíveis.

O gene *vanA* foi encontrado em 4 *E. faecium* provenientes das suiniculturas E (n=1) e D (n=3). Este gene confere elevado nível de resistência quer à vancomicina quer à teicoplanina.

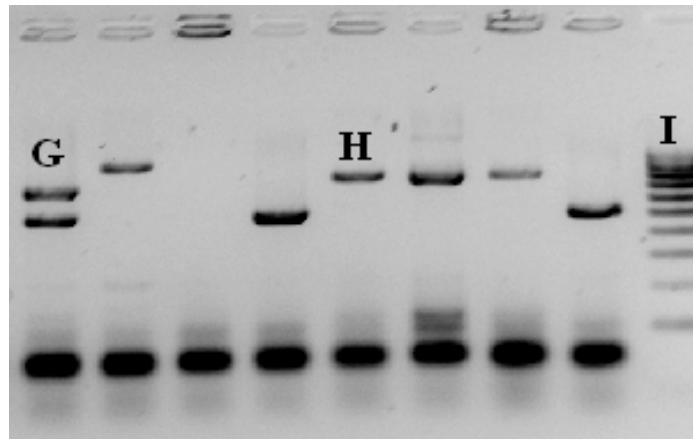


Figura 5 - Isolados representativos dos genes de resistência aos glicopéptidos. G – Gene *vanA*; H – Gene *vanC1*; I – Marcador de DNA (Hyperladder IV (Bioline)). As outras bandas correspondem à identificação da espécie (Ver Fig.2).

4. Ensaio de conjugação

Os ensaios de conjugação para a transferência da resistência à tetraciclina foram efectuados apenas em *E. faecium* representativos das 3 suiniculturas. Das 30 bactérias dadoras estudadas, somente 10 deram origem a transconjugantes após a conjugação com a bactéria receptora *E. faecium* BM4105.

Das conjugações, cujos agentes de selecção foram aminoglicosídeos, obtiveram-se unicamente 2 transconjugantes correspondentes à conjugação de *E. faecalis* com a bactéria receptora *E. faecalis* JH2-2. No que se refere aos macrólidos só as conjugações de *E. faecium* com a receptora *E. faecium* BM4105 deram origem a transconjugantes (n=5).

Os ensaios de conjugação referentes aos glicopéptidos foram realizados em 3 dos isolados com o gene *vanA*. Todas as conjugações efectuadas deram origem a transconjugantes.

Tabela 5 - Ensaio de conjugação para diferentes antibióticos realizados em estirpes representativas de todas as suiniculturas.

Antibiótico	Espécie	Suiniculturas	Número de dadoras estudadas	Número de dadoras que deram origem a transconjugantes	
Tetraciclina	<i>E. faecium</i>	E	30	10	
		F			
		D			
Aminoglicosídeos	<i>E. faecium</i>	E	5	0	
	<i>E. faecalis</i>	F	11	2	
Macrólidos	<i>E. faecium</i>	E	16	5	
		<i>E. faecalis</i>	F	6	0
		D			
Glicopéptidos	<i>E. faecium</i>	E	3	3	
		D			

Analisando o perfil de resistência aos antibióticos das bactérias transconjugantes (Tabela 4) pode observar-se que ocorreram fenómenos de co-transferência, ou seja, juntamente com a resistência aos antibióticos em estudo (tetraciclina, gentamicina, eritromicina ou vancomicina) foram transferidas, às bactérias receptoras, resistências a outras famílias de antibióticos.

No que diz respeito às conjugações cuja selecção foi feita com tetraciclina, pode verificar-se a co-transferência frequente da resistência à vancomicina ou eritromicina e, em alguns casos, à quinupristina-dalfopristina.

Da mesma forma, nas conjugações em que se utilizou como agente de selecção a gentamicina, juntamente com a resistência a esta, pode observar-se co-transferência de resistência à quinupristina-dalfopristina e/ou à estreptomomicina e eritromicina.

Os transconjugantes obtidos na conjugação com o agente de selecção eritromicina apresentaram resistência não só a este antibiótico, mas também a tetraciclina, aminoglicosídeos e/ou quinupristina-dalfopristina.

Nas conjugações em que a vancomicina foi o agente de selecção, verificou-se que os transconjugantes apresentaram sempre resistência à teicoplanina. Ocorreu também co-transferência de resistência à eritromicina.

Tabela 6 - Perfil de resistências das bactérias transconjugantes comparativamente com as bactérias dadoras

	Suinicultura	Espécie	Nº de isolados	Perfil de resistência aos antibióticos das dadoras	Perfil de resistência aos antibióticos dos transconjugantes *
Conjugações Tetraciclina	D,E	<i>E. faecium</i>	3	Tetra, Mino, Eritro, Q/D, Nitro	Tetra, Eritro Tetra, Eritro, Q/D Tetra, Mino, Eritro, Q/D
	D	<i>E. faecium</i>	1	Tetra, Mino, Cipro	Tetra, Mino
	D	<i>E. faecium</i>	1	Vanco, Teico, Tetra, Mino	Vanco, Tetra Vanco, Tetra, Mino
	D	<i>E. faecium</i>	1	Vanco, Teico, Amp, Tetra, Mino	Vanco, Tetra
	D	<i>E. faecium</i>	1	Vanco, Teico, Tetra, Mino, Nitro	Vanco, Tetra
	E	<i>E. faecium</i>	1	Tetra	Tetra
	E	<i>E. faecium</i>	1	Amp, Tetra, Eritro, Cipro, Estrep	Tetra, Eritro
	F	<i>E. faecium</i>	1	Tetra, Mino, Eritro, Cipro	Tetra Tetra, Eritro
Conjugações Aminoglicosídeos	F	<i>E. faecalis</i>	1	Tetra, Mino, Eritro, Q/D, Genta, Estrep	Eritro, Q/D, Genta, Estrep
	E	<i>E. faecalis</i>	1	Tetra, Q/D, Genta	Q/D, Genta
Conjugações Macrólidos	D	<i>E. faecium</i>	2	Tetra, Mino, Eritro, Q/D, Nitro	Eritro Eritro, Q/D
	E	<i>E. faecium</i>	1	Amp, Tetra, Mino, Eritro	Tetra, Mino, Eritro
	E	<i>E. faecium</i>	1	Tetra, Mino, Eritro, Q/D, Estrep, Nitro	Tetra, Eritro Tetra, Mino, Eritro
	F	<i>E. faecium</i>	1	Tetra, Mino, Eritro, Cipro	Tetra, Eritro
Conjugações Glicopéptidos	E	<i>E. faecium</i>	1	Vanco, Teico, Tetra, Eritro, Nitro	Vanco, Teico, Eritro
	D	<i>E. faecium</i>	1	Vanco, Teico, Amp, Tetra, Mino	Vanco, Teico
	D	<i>E. faecium</i>	1	Vanco, Teico, Tetra, Mino, Nitro	Vanco, Teico

* Os antibiogramas das bactérias transconjugantes foram realizados em três isolados escolhidos aleatoriamente.

V. Discussão

O presente trabalho estudou a incidência de *Enterococcus* spp resistentes a várias famílias de antibióticos oriundos de suiniculturas Portuguesas, tendo sido, globalmente observadas elevadas percentagens de resistência bacteriana.

Apesar de terem sido identificadas várias espécies do género *Enterococcus*, mais de 50% dos isolados correspondem a *E. faecium*. Se tivermos em conta que esta espécie adquire com mais facilidade resistência aos antibióticos e que a selecção das bactérias foi realizada com a utilização de meios suplementados com antibióticos (Novais C., comunicação pessoal) não é de estranhar a sua predominância. Os resultados do presente estudo demonstram igualmente que *E. faecium* e *E. faecalis* são as espécies com maiores percentagens de resistência a antibióticos, sendo que a primeira apresenta valores mais elevados para os glicopéptidos, ampicilina e ciprofloxacina, enquanto *E. faecalis* demonstrou ser menos susceptível à gentamicina, cloranfenicol e quinupristina-dalfopristina. A resistência a este último antibiótico é justificada pela resistência natural que esta espécie apresenta as estas moléculas. Estes resultados são concordantes com outros previamente descritos por outros autores para isolados de origem animal (Hershberger et al., 2005; Novais et al., 2005; Poeta et al., 2006).

Com excepção dos glicopéptidos e da nitrofurantoína, foram registadas maiores percentagens de resistências nas suiniculturas intensivas (E e F) do que na suinicultura extensiva (D). Isto pode dever-se ao facto de nas suiniculturas intensivas se usar uma maior quantidade de antibióticos e de os animais estarem confinados a espaços mais limitados. Estas práticas não só seleccionam melhor bactérias resistentes aos antibióticos, como também facilitam a sua dispersão entre os animais.

Tal como descrito por estudos europeus (incluindo outros estudos portugueses) (Aarestrup et al., 2002; Novais et al., 2005; Poeta et al., 2006; Kaszanyitzky et al., 2007), tetraciclina, minociclina e eritromicina foram os antibióticos aos quais *Enterococcus* spp apresentaram maiores percentagens de resistência. Estes resultados já eram esperados, uma vez que as tetraciclina e os macrólidos são das classes de antibióticos mais usadas na produção animal

(NORM/NORM-VET, 2006; DANMAP, 2007). Também em Portugal, estes grupos de antibióticos são dos mais usados, apesar de se ter verificado um decréscimo no seu consumo nos últimos anos na produção animal (INFARMED, 2007). As suiniculturas intensivas do presente estudo administravam doxiciclina aos suínos, facto que pode justificar a elevada percentagem de resistência registada para grupo das tetraciclinas.

Adicionalmente, os ensaios de conjugação revelaram não só que os genes que conferem resistências à tetraciclina e eritromicina são transferíveis, mas também que ocorrem frequentemente processos de co-transferência da resistência à tetraciclina, eritromicina e quinupristina-dalfopristina. Estes eventos sugerem que a disseminação da resistência a estes antibióticos pode ser promovida por várias moléculas presentes no ambiente de produção animal e assim, facilitada. Estudos moleculares mais aprofundados justificam estes factos, ao evidenciarem a associação do gene *tetM* (confere resistência às tetraciclinas) e do gene *ermB* (resistência aos macrólidos, lincosamidas e estreptograminas B (MLS_B)) no mesmo plasmídeo ou transposões (Aarestrup et al., 2000). A combinação entre estes dois genes é comum em cocos de Gram positivo como *Enterococcus* spp (Chopra et al, 2001).

Nas suiniculturas intensivas (E e F) as percentagens de resistência aos aminoglicosídeos foram elevadas, sendo que a estreptomicina apresenta valores superiores. Isolados resistentes à gentamicina foram essencialmente observados em *E. faecalis*. Curiosamente, a resistência a esta molécula do grupo de aminoglicosídeos tem sido mais associada a *E. faecalis* do que a outras espécies. De facto, maiores percentagens de resistência à gentamicina foram detectadas por Novais et al (2005) e Donabedian et al (2003), para *E. faecalis* do que para outras espécies. O mesmo verificou Poeta et al (2006) em humanos e animais de companhia, mas não nas aves de capoeira. A forte associação desta espécie à resistência à gentamicina ainda não está esclarecida.

Por outro lado, as resistências à estreptomicina ocorreram em todas as espécies exceptuando *E. gallinarum*. Estudos dinamarqueses, de 2007, apresentam igualmente resistências elevadas para a estreptomicina (DANMAP, 2007). O aumento das resistências aos aminoglicosídeos pode ser muito preocupante uma vez que, na Europa, as resistências a estes antibióticos em humanos também são elevadas. Na maioria dos países europeus isolados de *E. faecalis*

provenientes de infecções invasivas humanas, apresentaram mais de 25% de resistência à gentamicina, sendo que os casos da Alemanha e da Grécia são os mais inquietantes. Entre 2001 e 2007, em Portugal, as resistências aos aminoglicosídeos em *Enterococcus* spp aumentaram, registando-se em 2007 o valor mais elevado que se situa acima dos 25% (EARSS, 2008). Os aminoglicosídeos são usados, com efeitos sinérgicos, em associação com antibióticos antiparietais no tratamento de algumas infecções provocadas por *Enterococcus* spp. O aumento das resistências a estes antibióticos pode condicionar as opções terapêuticas para este tipo de infecções.

Os glicopéptidos são importantes antibióticos de reserva em infecções por *Enterococcus* spp quando ocorre resistências às penicilinas ou aos aminoglicosídeos, ou no caso de alergia à penicilina. Na Europa, em 2007, os valores de resistências aos glicopéptidos em infecções humanas eram já bastantes elevados sendo que Portugal (29%), Irlanda (33%) e Grécia (37%) são os países que apresentavam valores mais preocupantes (EARSS, 2008).

As resistências à vancomicina e teicoplanina nas suiniculturas em estudo foram reduzidas. Contudo na suinicultura extensiva a percentagem de isolados não susceptíveis foi de 16%. Este facto comprova que, apesar de a avoparcina (promotor de crescimento responsável pelo desenvolvimento de resistências a glicopéptidos) ter sido abolida em 1997 (Casewell et al., 2003; Garofalo et al, 2007; Phillips, 2007), ainda se encontra alguns *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE) em isolados obtidos dez anos mais tarde, sugerindo que outros factores para além da avoparcina podem ser responsáveis pela manutenção destas bactérias. Um estudo português, com amostras obtidas em 2001 de frangos para consumo humano, apresentou percentagens mais elevadas, sendo que a maioria dos isolados resistentes, tal como no presente trabalho, continham o gene *vanA* (Novais et al, 2005). Este gene é altamente transferível entre estirpes pois está no transposição Tn1546 associado a plasmídeos conjugativos. De facto, todos os ensaios de conjugação realizados no presente trabalho em que vancomicina foi agente de selecção, demonstraram a transferência da resistência quer a esta molécula quer à teicoplanina, resultados concordantes coma presença do gene *vanA*. Tal como outros, estes resultados demonstram a elevada capacidade de dispersão deste gene. Para além do gene *vanA*, nas suiniculturas portuguesas detectou-se também *vanC1* em *E.*

gallinarum. Este gene está associado a baixas taxas de resistência à vancomicina, apresentando 3 isolados, inclusivamente susceptibilidade a este antibiótico.

Alguns estudos sugerem que as estirpes resistentes podem ser mantidas por serem seleccionadas por outros antibióticos, nomeadamente macrólidos e tetraciclina (Aarestrup FM, 2000). Segundo Aarestrup FM (2000) os genes *vanA* e *ermB* podem encontrar-se no mesmo plasmídeo. Desta forma o gene de resistência aos glicopéptidos (*vanA*) era transferido juntamente com o gene de resistência aos macrólidos (*ermB*). Assim, o elevado consumo de macrólidos era responsável pela manutenção das resistências aos glicopéptidos.

É ainda importante destacar que um isolado de *E. faecium* sensível à vancomicina das suiniculturas estudadas, corresponde a um clone está largamente disseminado em vários países europeus, encontrando-se inclusive em nichos hospitalares (Novais et al., 2005; Freitas et al., 2009). Da mesma forma, dois isolados de *E. faecalis* pertencem a complexos clonais também encontrados em isolados hospitalares. Estes clones, quando provenientes de hospitais, designadamente hospitais portugueses, não apresentaram susceptibilidade à vancomicina (Novais et al., 2005; Freitas et al., 2009).

Podemos concluir que as suiniculturas portuguesas são reservatório de *Enterococcus* spp com resistência múltipla aos antibióticos com interesse clínico e de genes de resistência a antibióticos com elevada capacidade de dispersão, sugerindo as medidas tomadas pela União Europeia na tentativa de eliminar estirpes resistentes na produção animal demonstraram não ser por si só suficientes.

VI. Bibliografia

Aarestrup, F.M. (2000). Characterization of Glycopeptide-Resistant *Enterococcus faecium* (GRE) from Broilers and Pigs in Denmark: Genetic Evidence that Persistence of GRE in Pig Herds Is Associated with Coselection by Resistance to Macrolides, *Journal of Clinical Microbiology*, 38(7), Julho, pp. 2774-2777.

Aarestrup, F.M., Agerso, Y., Gerner-Smidt, P., Madsen, M. e Jensen, L.B. (2000). Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 37(2), Junho, pp. 127-37.

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

Amyes, S. (2007). Enterococci and streptococci, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29 (3), pp. 43-52.

Agersø, Y., Pedersen, A.G. e Aarestrup, F.M. (2006). Identification of Tn5397-like and Tn916-like transposons and diversity of the tetracycline resistance gene *tet(M)* in enterococci from humans, pigs and poultry, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57, pp. 832-839.

Arias, C.A., Robredo, B., Singh, K.V., Torres, C., Panesso, D. e Murray, B.E. (2006). 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*, *Journal of Clinical Microbiology*, 44(4), pp. 1567-1570.

Bonten, M.J.M., Willems, R. e Weinstein, R. A. (2001). Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from?, *Lancet Infectious Diseases*, 1, Dezembro, pp. 314-25.

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

Center for Science in the Public Interest (1999). Antibiotic Resistance Project. Washington, D.C., CSPI.

Chopra, I. e Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance, *Microbiology Molecular Biology Reviews* 65(2), Junho, pp. 232-260.

Chow, J.W. (2002). Aminoglycoside Resistance in Enterococci, *Aminoglycoside Resistance in Enterococci*, 31, pp. 586-9.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2006). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard. Ninth edition. Document M2-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Coque, T.M., Willems, R.J.L., Fortun, J., Top, J., Diz, S., Loza, E., Canton, R. e Baquero, F. (2005). Population structure of *Enterococcus faecium* causing bacteremia in a Spanish University Hospital: setting the scene for a future increase in vancomycin resistance?, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(7), Julho, pp. 2693-2700.

Courvalin, P. (2006). Vancomycin Resistance in Gram Positive Cocci, *Clinical Infectious Diseases*, 42, pp. 25-34.

DANMAP (2006). Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark., Denmark, Danish Veterinary Laboratory.

DANMAP (2007). Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark., Denmark, Danish Veterinary Laboratory.

De Leener, E., Martel, A., De Graef, E.M., Top, J., Butaye, P., Haesebrouck, F., Willems, R. e Decostere, A. (2005). Molecular analysis of human, porcine, and poultry *Enterococcus faecium* isolates and their *erm(B)* Genes, *Applied Environmental Microbiology*, 71(5), Maio, pp. 2766-2770.

Dibner, J. J. e Richards J.D. (2005). Antibiotic Growth Promoters in Agriculture: History and Mode of Action, *Poultry Science*, 84, pp. 634-643.

Donabedian, S.M., Thal, L.A., Hershberger, E., Perri, M.B., Chow, J.W., Bartlett, P., Jones, R., Joyce, K., Rossiter, S., Gay, K., Johnson, J., Mackinson, C., Debess, E., Madden, J., Angulo, F. e Zervos, M.J. (2003). Molecular characterization of gentamicin-resistant enterococci in the United States: evidence of spread from animals to humans through food, *Journal of Clinical Microbiology*, 41(3), Março, pp. 1109-1111.

EARSS (2008). European Antimicrobial Resistance Surveillance System Annual Report 2007. Holanda, EARSS.

EFSA (2007). The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2006., *The EFSA Journal*, 130.

Fluit, A. C., Bruggen, J.T., Aarestrup, F.M., Verhoef, J. e Jansen, W.T.M. (2006). Priorities for antibiotic resistance surveillance in Europe, *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 12, pp. 410-417.

Fluit, A. C., Visser, M. R. e Schimitz, F-J. (2001). Molecular Detection of Antimicrobial Resistance, *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4), Outubro, pp. 836-871.

Franz, C., Holzapfel, W. e Stiles, M. (1999). Enterococci at the crossroads of food safety?, *International Journal of Food Microbiology*, 47, pp. 1-24.

Freitas, A.R., Novais, C., Baquero, F., Coque, T.M. e Peixe, L. (2009). International spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (CC17, CC5) and *Enterococcus faecalis* CC2 among animals and humans, 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Helsinquia, Finlândia.

Garofalo, C., Vignaroli, C., Zandri, G., Zandri, L., Bordoni, D., Osimani, A., Clementi, F. e Biavasco, F. (2007). Direct detection of antibiotic resistance genes in specimens of chicken and pork meat, *International Journal of Food Microbiology*, 113, pp. 75-83.

Hastings, P.J., Rosenberg, S.M. e Slack, A. (2004). Antibiotic-induced lateral transfer of antibiotic resistance, *Microbiology*, 12(9), Setembro, pp. 401-404.

Hershberger, E., Oprea, S.F., Donabedian, S.M., Perri, M., Bozigar, P., Bartlett, P. e Zervos, M.J. (2005). Epidemiology of antimicrobial resistance in enterococci of animal origin, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55(1), pp. 127-130.

INFARMED. (2007). Relatório do Departamento de Medicamentos Veterinários - O Medicamento Veterinário Farmacológico. Abordagem Analítica. Lisboa, INFARMED.

Klare, I., Konstabel, C., Badstubner, D., Werner, G. e Witte, W. (2003). Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*, *International Journal of Food Microbiology*, 88, pp. 269-290.

Klein, G. (2003). Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract, *International Journal of Food Microbiology*, 88, pp.123-131.

Kaszanyitzky, É. J., Tenk, M., Ghidán, Á., Fehérvári, G.Y. e Papp, M. (2007). Antimicrobial susceptibility of enterococci strains isolated from slaughter animals on the data

of Hungarian resistance monitoring system from 2001 to 2004, *International Journal of Food Microbiology*, 115, pp. 119-123.

Kümmerer, K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part II, *Chemosphere*.

Lukášová, J. e Sustackova, A (2003). Enterococci and Antibiotic Resistance, *Acta veterinária*, 72, pp. 315-323.

Machado, E., Coque, T.M., Cantón, R., Sousa, J.C. e Peixe, L. (2008). Antibiotic resistance integrons and extended-spectrum b lactamases among *Enterobacteriaceae* isolates recovered from chickens and swine in Portugal, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(2), Maio, pp. 296-302.

Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E. e Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health, *International Journal of Food Microbiology*, 106, pp. 1-24.

NORM/NORM-VET (2007). NORM/NORM-VET 2006 Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway, Oslo.

Novais, C., Coque, T. M., Costa, M. J., Sousa, J. C., Baquero, F. e Peixe, L.V. (2005). High occurrence and persistence of antibiotic resistant enterococci in poultry food samples in Portugal, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56, pp. 1139-1143.

Novais, C., Coque, T. M., Boerlin, P., Herrero, I., Moreno, M.A., Dominguez, I. e Peixe, L.V. (2005). Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* Clone in Swine, Europe, *Emerging Infectious Diseases*, 11(12), Dezembro, pp. 1985-1987.

Ogier, J.C. e Serror, P. (2007). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus, *International Journal of Food Microbiology*, 126(3), Setembro, pp. 291-301.

Phillips I. (2007) Withdrawal of growth-promoting antibiotics in Europe and its effects in relation to human health, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30, pp. 101-107.

Phillips, I., Casewell, M., Cox, T., De Groot, B., Friis, C., Jones, R., Nightingale, C., Preston, R., e 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), Janeiro, pp. 28-52.

Poeta, P., Costa D., Sáenz, Y., Klibi, N., Ruiz-Larrea, F., Rodrigues, J. e Torres, C. (2005). Characterization of Antibiotic Resistance Genes and Virulence Factors in Faecal Enterococci of Wild Animals in Portugal, *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 52, Maio, pp. 396-402.

Poeta, P., Costa, D., Rodrigues, J. e Torres, C. (2006). Antimicrobial resistance and the mechanisms implicated in faecal enterococci from healthy humans, poultry and pets in Portugal, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 27(2), Fevereiro, pp. 131-137.

Portillo, A., Ruiz-Larrea, F., Zarazaga, M., Alonso, A., Martinez, J.L. e Torres, C. (2000). Macrolide resistance genes in *Enterococcus* spp, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(4), Abril, pp. 967-971.

Satake, S., Clark, N., Rimland, D., Nolte, F. e Tenover (1997). Detection of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples by PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, 35(9), Setembro, pp. 2325-2330.

Shepard, B. D. e Gilmore, M. S. (2002). Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance, *Microbes and Infection*, 4, pp. 215-224.

Sousa, J.C. e Ferreira, W. (2000). *Microbiologia* Volume 2, 1ª edição. Lidel.

Summers, A. O. (2006). Genetic Linkage and Horizontal Gene Transfer, the Roots of the Antibiotic Multi-Resistance Problem, *Animal Biotechnology*, 17(2), pp. 125-135.

Treitman, A.N., Yarnold, P.R., Warren, J. e Noskin, G.A. (2005). Emerging incidence of *Enterococcus faecium* among hospital isolates (1993 to 2002), *Journal of Clinical Microbiology*, 43(1), Janeiro, pp. 462-463.

Wegener, H. C., Aarestrup, F.M., Jensen, L.B., Hammerum, A.M. e Bager, F. (1999). Use of Antimicrobial Growth Promoters in Food Animals and *Enterococcus faecium* Resistance to Therapeutic Antimicrobial Drugs in Europe, *Emerging Infectious Diseases*, 5(3), Maio, pp. 329-335.

Witte, W. (2000). Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 14, pp. 321-325.

Woodford, N., Adebiyi, A.A., Palepou, M.I. e Cookson, B.D. (1998). Diversity of *vanA* Glycopeptide Resistance Elements in Enterococci from Humans and Nonhuman Sources, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(3), Março, pp. 502–508.

Anexo 1

Comunicações em congressos internacionais

C. Novais, A. R. Freitas, T. M. Coque, A. Nogueira, R. Silva, **A. Dias**, J. C. Sousa e L. Peixe.
2008. *Portuguese piggeries as reservoir of antibiotic multi-resistant enterococci*. ASM
Conference on Antimicrobial Resistance in Zoonotic Bacteria and Foodborne Pathogens.
Dinamarca, 15 e 18 de Junho de 2008

Anexo 2

Artigo em revista nacional

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