
Ana Cristina Martins Nogueira

Pesquisa de genes que conferem resistência a inibidores da síntese proteica em *Enterococcus*
sp oriundos do ambiente de suiniculturas.

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2010

Ana Cristina Martins Nogueira

Pesquisa de genes que conferem resistência a inibidores da síntese proteica em *Enterococcus*
sp oriundos do ambiente de suiniculturas.

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2010

Ana Cristina Martins Nogueira

Pesquisa de genes que conferem resistência a inibidores da síntese proteica em *Enterococcus* sp oriundos do ambiente de suiniculturas.

Declaração de Originalidade

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

Ana Cristina Martins Nogueira

Monografia apresentada à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de licenciada em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof. Doutora Carla Novais

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

Resumo

Enterococcus sp fazem parte da flora bacteriana gastrointestinal normal do Homem e dos animais, podendo ocasionalmente provocar infecções, sobretudo em indivíduos com imunossupressão ou outros factores de predisposição como a utilização de catéteres ou cirurgia, pelo que o aparecimento de resistências neste género poderão dificultar o seu tratamento. Os isolados provenientes de animais de explorações ou de carcaças de animais para consumo humano e do próprio ambiente das explorações registam uma elevada incidência de bactérias resistentes a antibióticos. Esta situação constitui uma preocupação crescente uma vez que a utilização de antibióticos na produção animal pode seleccionar bactérias (comensais ou patogénicas) resistentes a estes agentes antimicrobianos. Na União Europeia, os antibióticos foram abolidos como promotores de crescimento, o que faria prever uma diminuição da ocorrência de resistência aos antibióticos. No entanto, continuamos a assistir a uma elevada percentagem de *Enterococcus sp* resistentes a várias classes destas moléculas nomeadamente aos aminoglicosídeos, tetraciclina, macrólidos, lincosamidas e estreptograminas do grupo B (MLS_B).

Neste estudo procedeu-se à caracterização, por PCR, de genes de resistência aos aminoglicosídeos, tetraciclina, macrólidos, lincosamidas e MLS_B em isolados de *Enterococcus sp* oriundos de 6 suiniculturas Portuguesas. Os isolados foram obtidos entre Abril de 2006 e Dezembro de 2007 de 84 amostras dos animais e ambiente das suiniculturas (material biológico de suínos, alimentos/medicamentos, resíduos com contaminação fecal, amostras das instalações das suiniculturas, entre outras). Registou-se, uma elevada incidência e diversificação destes genes, nomeadamente *tetM* (63%), *tetL* (53%), *tetS* (4%), *ermB* (52%) e *aac(6')-Ia-aph(2')* (4%). Estes genes foram encontrados nas várias suiniculturas estudadas, em diferentes amostras, espécies de *Enterococcus* e, com excepção de *aac6-aph2*, em isolados fenotipicamente resistentes e susceptíveis às tetraciclina e ao grupo MLS_B. Estes resultados constituem uma preocupação para a saúde pública, pois estes e/ou as bactérias que os possuem podem passar para o homem através do contacto directo com os animais, da cadeia alimentar ou de outros veículos como o ar.

“Pesquisa de genes que conferem resistência a inibidores da síntese proteica em *Enterococcus sp* oriundos do ambiente de suiniculturas.”

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a algumas pessoas, sem as quais não teria sido possível realizar o trabalho.

À Universidade Fernando Pessoa, Faculdade das Ciências da Saúde, pelo apoio financeiro que disponibilizou, tornando possível a parte experimental do presente estudo, assim como as instalações e material.

Ao REQUIMTE grupo Micro (Faculdade Farmácia da Universidade do Porto), por toda a colaboração que prestaram para com o presente estudo.

À Prof. Doutora Carla Novais, pela ajuda e disponibilidade que demonstrou em todo o trabalho.

Ao Dr. Ricardo Silva, técnico do laboratório de investigação que me apoiou em alguns momentos da parte experimental do trabalho.

Índice

1.	Introdução	7
1.1.	<i>Enterococcus sp</i> : características gerais e importância clínica	7
1.2.	O ambiente de produção animal como reservatório de microorganismos resistentes aos antibióticos	8
1.3.	Aminoglicosídeos, Tetraciclinas e Macrólidos, Lincosaminas e Estreptograminas do grupo B	11
1.3.1.	Mecanismos de acção	11
1.3.1.1.	Aminoglicosídeos	11
1.3.1.2.	Tetraciclinas	12
1.3.1.3.	Macrólidos, Lincosaminas e Estreptograminas do grupo B	13
1.3.2.	Mecanismos de resistência	15
1.3.2.1	Aminoglicosídeos	17
1.3.2.2	Tetraciclinas	18
1.3.2.3	Macrólidos, Lincosaminas e Estreptograminas do grupo B	19
2.	Objectivos	20
3.	Material e métodos	21
3.1.	Bactérias incluídas no estudo	21
3.2.	Pesquisa de genes de resistência a Aminoglicosídeos, Tetraciclinas e a Antibióticos do grupo MLS _B	22
3.2.1	Condições de amplificação	23
3.2.2	Visualização dos produtos de amplificação	25
4.	Resultados	26

5. Discussão e Conclusão	32
6. Bibliografia	34

Anexos

Índice de Tabelas e Figuras

Tabela 1. Sequência nucleotídica dos <i>primers</i> utilizados nas reacções de PCR	22
Tabela 2. Condições utilizadas para amplificação dos genes que conferem resistência a aminoglicosídeos	23
Tabela 3. Condições utilizadas para amplificação dos genes que conferem resistência às Tetraciclinas	24
Tabela 4. Condições utilizadas para amplificação dos genes que conferem resistência aos Macrólidos	24
Tabela 5. Distribuição dos genes <i>tetM</i> , <i>tetL</i> , <i>tetS</i> e <i>ermB</i> por isolados com diferentes susceptibilidades às Tetraciclinas e aos Macrólidos	29
Tabela 6. Combinações de genes predominantes nas suiniculturas estudadas	30
Figura 1: Mecanismo de acção dos aminoglicosídeos	11
Figura 2: Mecanismo de acção das Tetraciclinas	12
Figura 3: Mecanismo de acção dos MLS _B	13
Figura 4: Incidência dos diferentes genes nas suiniculturas em estudo	27
Figura 5. Distribuição dos genes observados pelas diferentes espécies	28
Figura 6. Reacções de PCR representativas da amplificação dos genes obtidos que codificam para a resistência a macrólidos (A), tetraciclinas (B e C) e aminoglicosídeos (D)	31

Lista de abreviaturas

AAD- Adeniltransferases

AAC- Acetiltransferases

APH – Fosfotransferases

ERG- *Enterococcus sp* resistente aos glicopéptidos

LAP- Leucina Aminopeptidase

MFS - Major Facilitator Superfamily

MLS_B - Macrólidos, Lincosamidas e Estreptograminas do grupo B

PCR- Polimerase Chain Reaction

PYR – Pirrolidonil Arilamidase

1. Introdução

1.1. *Enterococcus sp*: características gerais e importância clínica

Enterococcus sp são cocos de Gram positivo, que podem apresentar-se como células individuais, aos pares ou em cadeias curtas. São anaeróbios facultativos, com capacidade de crescerem entre 10 e 45°C. Crescem em meios contendo 6,5% de NaCl, hidrolisam a esculina em presença de 40% de sais biliares e são positivos para as enzimas Pirrolidônil Arilamidase (PYR) e Leucina Aminopeptidase (LAP). Possuem um habitat natural muito diversificado uma vez que têm grande resistência a agentes físicos e químicos. Sobrevivem e crescem em ambientes como o solo, água, alimentos e no intestino de mamíferos, aves e insectos. (Ferreira, W et al. 2000; Sousa, J. 2005)

Dentro do género *Enterococcus* já foram descritas mais de 20 espécies, nomeadamente *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. avium*, *E. mundtii*, *E. pseudoavium*, *E. cecorum*, *E. malodoratus*, *E. raffinosus*, *E. columbae*, *E. saccharolyticus*, *E. dispar*, *E. sulfureus*, *E. asini*, *E. vilorum*, *E. haemoperoxidus*, *E. moraviensis*, *E. ratii*, *E. porcinius* (Ferreira, W et al. 2000).

Apesar da sua abundância no intestino do homem e animais, *Enterococcus sp* não são frequentemente patogénicos, estando sobretudo associados a indivíduos com imunossupressão ou outros factores de predisposição como a utilização de catéteres ou cirurgia (Ferreira, W et al. 2000). No entanto, nas últimas décadas, a dificuldade de tratar infecções enterocócicas fez destas bactérias um importante desafio nas unidades hospitalares de todo o mundo (Ferreira, W et al. 2000).

Para além das suas resistências naturais, *Enterococcus sp* estão frequentemente envolvidos em eventos de disseminação horizontal, acumulando e partilhando genes de resistência aos antibióticos, o que os torna bons indicadores de resistência bacteriana a estas moléculas (Leelapron, A. et al. 2008). Na literatura são vários os estudos que detectaram resistência aos antibióticos em isolados dispersos em vários nichos ecológicos (Chee-Sanford, J. et al. 2001; Boerlin, P. et al 2001; Novais, C. et al 2005).

1.2. O ambiente de produção animal como reservatório de microrganismos resistentes aos antibióticos

O desenvolvimento de resistências aos antibióticos está associado a mutações espontâneas e à transferência horizontal de elementos genéticos móveis e mobilizáveis que possuem determinados genes. Estes eventos conferem variabilidade genética aos microrganismos, vantajosa em ambientes com elevada pressão selectiva (Chopra, I. et al. 2001).

O uso generalizado de antibióticos no ambiente de produção animal, como agentes terapêuticos veterinários, profiláticos ou promotores de crescimento tem, nos últimos 50 anos, seleccionado isolados bacterianos com resistência múltipla. Muitas destas moléculas são mal absorvidas a nível gastrointestinal, sendo excretadas praticamente inalteradas nas fezes. Este fenómeno conduz à sua acumulação no meio ambiente e à contaminação do homem e outros seres vivos (Chee-Sanford, J.C. et al. 2001; Casewell et al, 2002).

Tem sido proposto que os microrganismos resistentes aos antibióticos e/ou os seus elementos genéticos (plasmídeos, integrões, transposões) portadores de genes de resistência podem passar para os humanos através da cadeia alimentar ou por contacto directo com os animais, constituindo este problema um desafio à saúde pública. (Aarestrup, F.M. et al. 2001). Esta preocupação está não só associada a bactérias zoonóticas patogénicas mas também a bactérias comensais como *Enterococcus sp* e *Escherichia coli* (Casewell, M. et al 2002). Suínos, aves, bovinos, peixes e outros animais associados à produção intensiva podem ser reservatório de várias famílias e géneros bacterianos (*Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus spp*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, entre outros) e de uma diversidade de elementos genéticos (genes vários, plasmídeos, integrões e transposões) associados à resistência aos antibióticos (Antunes, P. e al 2006; Wegener, H et al. 1999). Por exemplo, em estudos realizados em Portugal com *Salmonella* verificou-se que os isolados de origem animal possuíam uma maior incidência de resistência aos antibióticos do que isolados de origem humana. Entre estas resistências encontram-se aquelas associadas aos antibióticos tetraciclina, estreptomicina, ampicilina e sulfonamidas. Tal facto não é de surpreender, uma vez que estes antibióticos têm sido muito utilizadas na produção animal em Portugal e em outros países (Antunes, P. et al 2006; Antunes, P. et al 2004; Casewell, M. et al 2002). Outros estudos

européus, verificaram que o uso indiscriminado de avoparcina como promotor de crescimento animal, até 1997, seleccionou fora do ambiente hospitalar a presença de *Enterococcus sp* resistentes aos glicopéptidos (ERG), especulando-se que muitos dos ERG associados a infecções nosocomiais provinham do nicho animal (Wegener, H. 2003; Johnsen, P. et al. 2004; Novais, C. et al 2005; Donabelian, S. et al 2003). Alguns estudos relatam o aparecimento dos mesmos elementos genéticos quer em isolados de animais quer em isolados de humanos. Por exemplo, um clone de *Salmonella Typhimurium* possuindo um integrão com OXA-30 que confere resistência aos antibióticos β -lactâmicos foi encontrado nestes dois nichos ecológicos (Antunes, P. e al 2004). O mesmo clone de *Enterococcus sp* com resistência à gentamicina foi observado em isolados de aves para consumo humano e em fezes de humanos saudáveis (Novais, C. et al 2006). Muitos outros exemplos podem ser encontrados na literatura (Donabedian, S. et al 2003; Johnsen, P. et al 2004; Aaerstrup, F. et al 2000).

Vários estudos também evidenciaram o impacto dos antibióticos no meio ambiente, registando-se a presença de várias moléculas (Ex: tetraciclinas, macrólidos, glicopéptidos, aminoglicosídeos), em amostras de águas subterrâneas, solos, vegetação que se encontram nas imediações de ambientes de produção animal (Chee-Sanford, J.C. et al. 2001).

O possível impacto dos antibióticos e das bactérias resistentes na saúde pública, ao longo das últimas duas décadas, impeliu a União Europeia a abolir progressivamente a utilização de antibióticos como promotores do crescimento animal, tendo este processo culminado em Janeiro de 2006 (Regulamento EC nº1831/2003 do Parlamento Europeu).

No entanto, o aumento de infecções verificadas nos animais levou a um aumento da quantidade de antibióticos usada como agentes veterinários. De facto, países como a Dinamarca consumiram 121,1 toneladas de antibióticos na produção animal em 2007, nomeadamente tetraciclinas, aminoglicosídeos, macrólidos, penicilinas, cefalosporinas de 2ª e de 3ª geração (DANMAP, 2007). O último documento do INFARMED (INFARMED, 2007) também registou em Portugal um consumo de 166287,9 toneladas de antibióticos para uso animal onde se destacam moléculas como a oxitetraciclina, doxiciclina e colistina. Este elevado consumo em diferentes regiões geográficas faz com que ainda possamos encontrar na

produção animal bactérias com resistência aos antibióticos e seus respectivos genes em valores acima dos desejados.

A persistência de clones com resistência múltipla, após a abolição de antibióticos como promotores de crescimento animal, em explorações que possuíam programas de desinfecção rigorosos também foi descrita em algumas regiões. Na Noruega e na Dinamarca foram estudadas aves de cinco quintas, cujas instalações onde se encontravam os animais tinham sido previamente limpas e desinfectadas. A elevada ocorrência de *Enterococcus sp* resistentes à vancomicina após a abolição da avoparcina como promotor do crescimento foi, no entanto, detectada (Heuer. et al. 2002). A presença de outras moléculas no ambiente de produção animal como desinfectantes, metais e outros elementos ainda não estudados, podem ser responsáveis pela manutenção de elementos genéticos que transportam simultaneamente genes de resistência a estes e aos antibióticos. Um dos exemplos é a administração de suplementos de cobre como promotores de crescimento. Em *Enterococcus sp* já se observou que o mesmo plasmídeo transporta simultaneamente o gene *tcrB* (resistência ao cobre), *vanA* (resistência aos glicopéptidos) e *ermB* (resistência a macrólidos, lincosamidas e estreptograminas do grupo B) (Hasman, H. et al 2002).

Em alguns países, a abolição dos promotores de crescimento teve um impacto significativo. Na Dinamarca foi estudado qual o resultado desta medida em *Enterococcus sp* com isolados recolhidos de explorações de suínos e de frangos para quatro antibióticos (avilamicina, eritromicina, vancomicina e virgiamicina). Este estudo demonstrou uma diminuição da ocorrência de resistência a estes antibióticos, que se deveu, essencialmente, à ausência da pressão selectiva exercida pelo uso destas moléculas como promotores do crescimento animal.

No entanto, não é ainda possível prever se a ocorrência da resistência aos antibióticos irá desaparecer até um limite indetectável devido a esta medida, uma vez que múltiplos factores podem estar a intervir na manutenção da selecção de microrganismos resistentes aos antibióticos (Aarestrup, F.M. et al. 2001).

1.3. Aminoglicosídeos, Tetraciclina e Macrólidos, Lincosamidas e Estreptograminas do grupo B

1.3.1. Mecanismos de acção

1.3.1.1. Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são antibióticos inibidores da síntese proteica, muito utilizados para o tratamento de infecções graves provocadas por bactérias de Gram positivo (Ex: *Enterococcus sp*) e de Gram negativo (Ex: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*), normalmente em associação com antibióticos anti-parietais. Após atingirem o citoplasma bacteriano, por transporte activo dependente de energia, ligam-se à subunidade 30S ribossomal, induzindo uma alteração da síntese proteica e a criação de proteínas anómalas *non sense* associadas a uma alteração da permeabilidade celular (Figura 1), o que justifica o seu mecanismo bactericida (Hermann, T. 2007; Osswald, W. et al 2001).

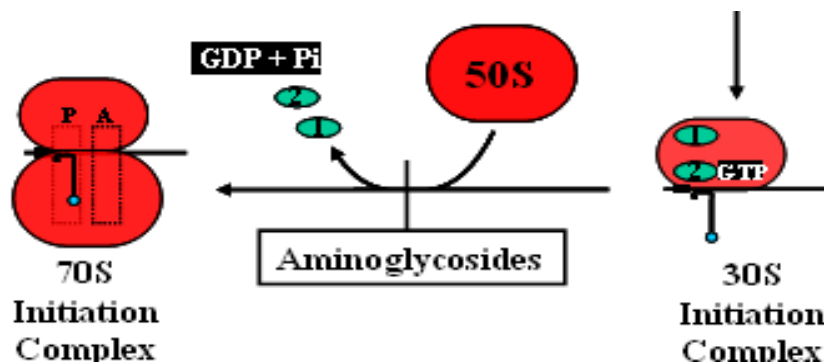


Figura 1: Mecanismo de acção dos aminoglicosídeos (figura adaptada de pathmicro.med.sc.edu/pptbact2002/Antibioticsmayer.ppt)

Na terapêutica os aminoglicosídeos usam-se, na forma salificada, quer em humanos quer em animais por via endovenosa ou via intramuscular, uma vez que estes em meio fisiológico comportam-se como polícatiões, sendo absorvidos em cerca de 1% e penetrando na célula num grau muito diminuído (Sousa, J. 2005).

As moléculas de aminoglicosídeos mais utilizadas na terapêutica de infecções provocadas por microorganismos que lhes são sensíveis são a estreptomina, neomicina, paromomicina, canamicina e gentamicina (Osswald, W. et al 2001).

1.3.1.2. Tetraciclina

Em 1947, foram descobertas as tetraciclina e desde então esta família de antibióticos é amplamente utilizada no tratamento de um grande leque de microorganismos de Gram positivo e de Gram negativo. A sua capacidade de atingir concentrações terapêuticas dentro das células eucarióticas faz com que pertençam ao reduzido número de antibióticos usados no tratamento de microorganismos intracelulares (Ex: *Listeria monocytogenes*, *Chlamydia spp*, *Rickettsiae*) (Sousa, J. 2005). As suas propriedades antimicrobianas, reduzida toxicidade, baixo custo e fácil aplicação fazem com que as tetraciclina sejam largamente consumidas quer em medicina humana quer em veterinária (Chopra, I. et al. 2001). A principal via de administração das tetraciclina, quer no homem quer em animais, é a via oral, embora em medicina veterinária seja muito utilizadas por via intramuscular (Chopra, I. et al. 2001; Osswald, W. et al 2001).

As tetraciclina inibem primariamente a síntese proteica bacteriana, actuando com grande afinidade ao nível da subunidade 30S ribossomal (Figura 2). Especificamente impedem a ligação do aminoacil-tRNA com o ribossoma bacteriano evitando o crescimento da cadeia peptídica. O facto de apenas inibirem o crescimento bacteriano faz deles antibióticos bacteriostáticos (Chopra, I. et al. 2001, Sousa, J. 2005; Auto, H. et al 1980).

Alguns exemplos deste grupo de antibiótico são a tetraciclina, oxitetraciclina, clorotetraciclina, doxiciclina e minociclina. (Osswald, W. et al 2001).

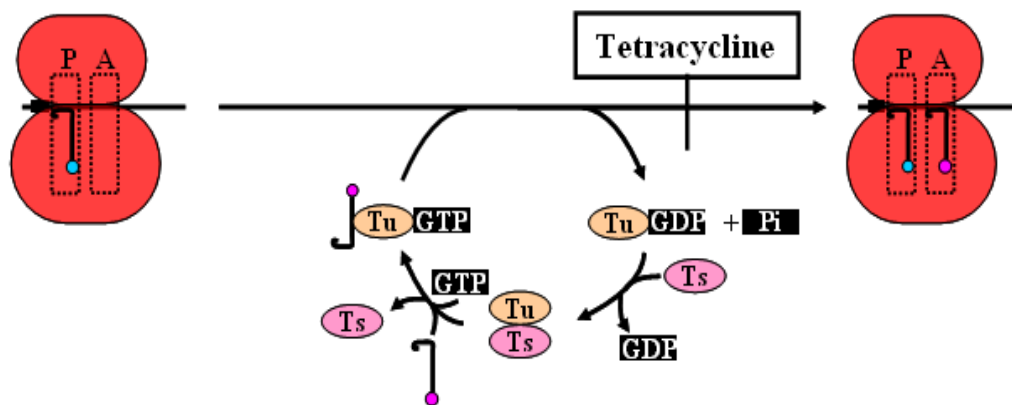


Figura 2: Mecanismo de acção das Tetraciclina (figura adaptada de pathmicro.med.sc.edu/pptbact2002/Antibioticsmayer.ppt)

1.3.1.3. Macrólidos, Lincosaminas e Estreptograminas do grupo B

O grupo MLS_B (Macrólidos, Lincosaminas e Estreptograminas do grupo B) necessita, como os demais antibióticos, de atravessar a parede celular e a membrana citoplasmática bacteriana para exercer as suas propriedades antimicrobianas. Os diferentes antibióticos que pertencem a este grupo possuem um mecanismo de acção semelhante, inibindo a síntese proteica das bactérias ao ligar-se reversivelmente à subunidade 50S do ribossoma (Figura 3). Especificamente bloqueiam o local P, impedindo a transpeptidase/translocação e provocando a libertação prematura do péptido. Como este péptido é libertado incompleto perde facilmente a sua função celular, o que leva à morte celular da célula bacteriana devido à falta de proteínas que lhe são vitais (Sousa, J. 2005; Auto, H. et al 1980; Osswald, W. et al 2001).

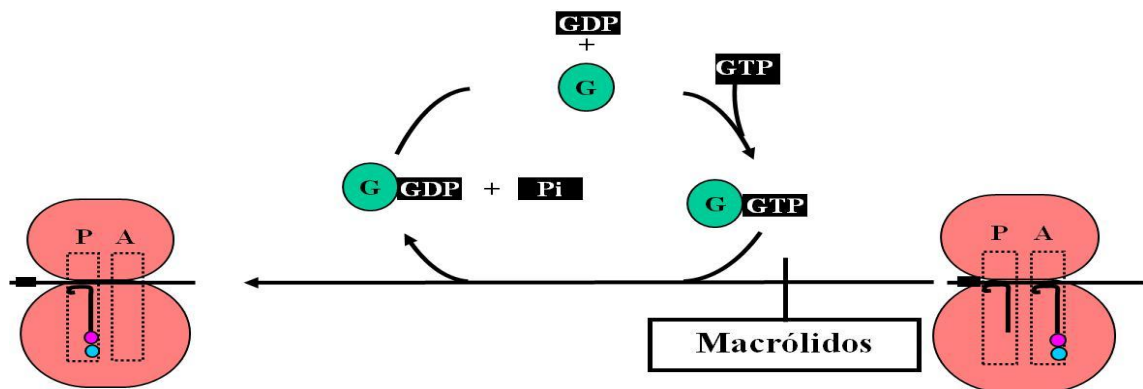


Figura 3: Mecanismo de acção dos MLS_B (figura adaptada de pathmicro.med.sc.edu/pptbact2002/Antibioticsmayer.ppt)

Embora este grupo de antibióticos tenha uma maior actividade face a bactérias de Gram positivo (Ex: *Streptococcus* spp; *Corynebacterium diphtheriae*; *Listeria monocytogenes*), são usados no tratamento de de alguns infecções por bactérias de Gram negativo como *Campylobacter* spp e *Legionella pneumophila* (Ex: eritromicina) ou *Bacteroides fragillis* (Ex: clindamicina). Tal como as tetraciclinas, têm uma actividade bacteriostática e atingem boas concentrações dentro das células eucariótas, podendo ser usados no tratamento de microrganismos intracelulares.

Dentro das famílias de MLS_B, os macrólidos são os mais consumidos quer em medicina humana quer em medicina veterinária.

Este grupo de antibióticos, a nível humano, é mal absorvido a nível gástrico, por este facto as preparações destes fármacos têm de possuir um revestimento gastroresistente, o que permite a sua dissociação no intestino delgado e posterior absorção. Outra das formas utilizadas para solucionar este inconveniente é a utilização por via oral de formas salificadas (ex: estearatos, succinatos). Em Medicina veterinária, estes antibióticos são maioritariamente administrados por via intramuscular. Os macrólidos mais utilizados são a eritromicina, claritromicina, azitromicina. (Sousa, J. 2005; Auto, H. et al 1980; Osswald, W. et al 2001).

1.3.2. Mecanismos de resistência

São vários os mecanismos de resistência que as bactérias podem adquirir e/ou desenvolver. De uma forma generalizada eles podem ser divididos em:

- **Naturais**

Este tipo de resistências é característico em todas as estirpes da mesma espécie. Por exemplo, a maioria das bactérias de Gram negativo são resistentes a moléculas de elevado peso molecular (ex: vancomicina, daptomicina) uma vez que estas não conseguem atravessar os canais de porina localizados na membrana externa (Auto, H.et al 1980; Sousa, J. 2001).

- **Adquiridas**

É um tipo de resistência bacteriana que aparece apenas em algumas estirpes de uma dada espécie. Estirpes bacterianas que no seu estado selvagem eram susceptíveis a um dado antibiótico e que devido à alteração do seu DNA e/ou à aquisição de determinados elementos genéticos portadores de genes de resistência, deixam de ser susceptíveis aos antibióticos.

As resistências adquiridas devem-se a modificações genéticas por:

- **Mutação**

Caracteriza-se pela modificação nucleotídica de uma sequência genómica que leva a alterações proteicas e, conseqüentemente à alteração do alvo do antibiótico ou de canais de transporte.

- **Aquisição exógena de DNA (transformação, transdução, conjugação)**

Algumas bactérias adquirem elementos genéticos de outras bactérias vizinhas, que lhe transmitem uma porção de DNA com genes que conferem resistência aos antibióticos.

Os genes adquiridos podem proporcionar à bactéria: (i) Diminuição da concentração intracelular do antibiótico (Exemplo: Tetraciclina- gene *tetA* e *tetB*); (ii) Destoxificação do antibiótico (Exemplo: aminoglicosídeos-enzimas acetiltransferases); (iii) Modificação do alvo (Exemplo: Eritromicina- produção de metilases) (Auto, H. et al 1980; Sousa, J. 2001).

Os diferentes genes podem estar incluídos em elementos genéticos que lhes conferem mobilidade. Entre eles encontram-se os:

- **Transposições**

São sequências de DNA de cadeia dupla, com capacidade de promover a sua própria transposição entre plasmídeos ou de um plasmídeo para o cromossoma e vice-versa. Alguns têm ainda a capacidade de se transporem para outras células bacterianas, denominando-se neste caso de transposições conjugativas. São constituintes presentes no cromossoma bacteriano, de plasmídeos e de bacteriófagos

- **Integrões**

Elementos genéticos mobilizáveis por plasmídeos e transposições, com capacidade de adquirirem múltiplas cassetes de genes de resistência a antibióticos e substâncias biocidas (sais de amónio quaternário).

- **Plasmídeos**

Elementos genéticos circulares e com replicação autónoma do DNA cromossomal bacteriano, que podem possuir pelo menos um genes que confere resistência aos antibióticos.

Existem dois grupos básicos de plasmídeos:

- **Conjugativos:** Possuem um gene chamado *tra*, que lhes permite iniciar a conjugação, isto é, a sua transferência para outras bactérias.

- **Não-conjugativos:** Não têm a capacidade de iniciar a conjugação, logo, não existe movimento independente para outra bactéria. No entanto podem ser transferidos com plasmídeos ou transposões conjugativos durante o processo de conjugação (Auto, H.et al 1980; Sousa, J. 2001).

De seguida passam-se a descrever alguns dos mecanismos de resistência associados aos antibióticos incluídos no presente estudo.

1.3.2.1. Aminoglicosídeos

As bactérias podem apresentar resistência aos aminoglicosídeos através dos seguintes mecanismos de resistência:

(i) **Inactivação enzimática:** Capacidade de inibir a acção das moléculas de aminoglicosídeos através de modificações químicas da sua estrutura. As enzimas dividem-se em 3 grandes grupos: fosfotransferases (APH), adeniltransferases (AAD), acetiltransferases (AAC). Existem enzimas como *aph(3')-IIIa* que apenas inactivam uma molécula dos aminoglicosídeos (grupos hidroxilo (-OH)) e outras que actuam em diferentes moléculas desta família como a *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* que inactiva grupos -NH₂ e hidroxilo(-OH)) (Hermann, T. 2007; Sousa, J. 2005.)

(ii) **Impermeabilidade da membrana citoplasmática:** O antibiótico não tem capacidade de atravessar os invólucros bacterianos de forma a atingir o local de acção, a subunidade ribossomal 30S bacteriana (Hermann, T. 2007).

(iii) **Alteração do local alvo:** Mutações no local de ligação do ribossoma impedindo uma ligação eficaz do antibiótico (Hermann, T. 2007).

1.3.2.2. Tetraciclina

Conhecem-se três mecanismos de resistência principais às Tetraciclina:

(i) **Bombas de efluxo:** São sistemas proteicos de transporte activo que conferem capacidade às bactérias para expulsarem o antibiótico para o exterior, não permitindo a sua concentração no citoplasma, o que confere protecção ao ribossoma no interior da célula bacteriana. Como exemplo de genes que codificam para bombas de efluxo em bactérias Gram positivo pode referir-se o *tetL*.

O efluxo do antibiótico funciona devido a uma proteína de exportação da *major facilitator superfamily* (MFS), ou seja, a proteína catalisa a troca de um protão por um complexo constituído pelo antibiótico ligado a um catião-metálico bivalente, que não permite a concentração do antibiótico no citoplasma bacteriano (Chopra et al. 2001; Auto, H. et al 1980).

(ii) **Protecção ribossomal por proteínas:** Está associada à produção de uma proteína plasmática que interfere com a ligação do antibiótico ao seu alvo, ou seja, as proteínas conferem protecção ribossomal à acção das tetraciclina (Ex: genes *tetM* e *tetO*).

A protecção ribossomal é efectuada por uma proteína solúvel, que possui homologia com as GTPases que intervêm na síntese proteica, essencialmente com os factores de elongação EF-Tu e EF-G (Chopra et al. 2001; Auto, H. et al 1980).

(iii) **Inactivação enzimática das tetraciclina:** Este é um mecanismo pouco frequente e tem sido representado apenas pelo gene *tetX* (Sousa, J. 2005, Chopra et al. 2001). Este gene codifica para uma proteína citoplasmática que modifica quimicamente as tetraciclina na presença de oxigénio e NADPH, devido à homologia que a mesma possui com o NADPH exigido pela célula bacteriana (Chopra et al. 2001; Auto, H. et al 1980).

1.3.2.3. Macrólidos, Lincosamidas e Estreptograminas do grupo B (MLS_B)

A resistência aos macrólidos, lincosamidas e estreptograminas do grupo B pode ser mediada por vários mecanismos (alteração do local alvo, inativação enzimática, bombas de efluxo) e genes (*erm*, *mef*, *vat*, entre outros).

(i) **Alteração do local alvo:** Um dos mecanismos mais disseminados é a alteração do local alvo, mediada pelos genes *erm* que podem pertencer a vários tipos (Ex: *ermA*, *ermB*, *ermC*, *ermF*, etc...). Esta resistência deve-se à N.N'-dimetilação da adenina na posição 2058 no rRNA 23S mediada pela produção de enzimas (metilases) diminuindo significativamente a afinidade da ligação do antibiótico ligação. Os genes *erm* podem ter uma localização cromossômica ou plasmídica (Auto, H.et al 1980; Sousa, J. 2005; Sousa, J. 2001).

As células bacterianas são simultaneamente resistentes a macrólidos, lincosamidas e estreptograminas do grupo B, quando as metilases se exprimem constitutivamente, fenótipo cMLS_B.

Quando as metilases só são sintetizadas na presença de um indutor (macrólidos de 14 e 15 átomos), os genes exprimem-se integrados num operão indutível, possuindo o fenótipo MLS_B indutível (iMLS_B) (Auto, H.et al 1980; Sousa, J. 2001).

(ii) **Inativação Enzimática:** Trata-se de um mecanismo de resistência que possui pouco significado clínico, que se traduz na modificação do antibiótico pela actividade de enzimas esterases I e II codificadas por genes (Ex: *ereA*, *ereB*), levando a quebra do anel lactónico nos macrólidos de 14 átomos (Auto, H.et al 1980; Sousa, J. 2005).

(ii) **Bombas de efluxo:** Consiste num tipo de resistência que resulta do efluxo de macrólidos de 14 e 15 átomos no anel lactónico, devido a produção de proteínas pelos genes (*mef*), na membrana citoplasmática (Auto, H.et al 1980; Sousa, J. 2005).

2. Objectivos

Apesar de na última década os antibióticos terem sido progressivamente proibidos na União Europeia como promotores do crescimento animal, vários estudos ainda detectam a presença de bactérias com resistência múltipla em diversas partes do mundo (Chee-Sanford, J.C. et al. 2001; Aarestrup, F.M. et al. 2001).

Neste sentido e, tendo em conta a escassez de dados Portugueses relativos à incidência de bactérias resistentes aos antibióticos em alguns sectores da produção animal do nosso país, tem vindo a ser desenvolvido nos Laboratórios de Microbiologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa e da Faculdade de Farmácia do Porto o estudo da resistência a antibióticos em *Enterococcus sp* oriundos de suiniculturas portuguesas com produção intensiva e extensiva.

No seguimento deste trabalho e com o objectivo de caracterizar geneticamente algumas das resistências encontradas, foi objectivo do presente estudo pesquisar em, *Enterococcus sp* pertencentes a diferentes espécies, a presença de genes que conferem resistência a tetraciclina, aminoglicosídeos e ao grupo MLS_B, antibióticos inibidores da síntese proteica frequentemente administrados aos animais de produção em Portugal (INFARMED, 2007).

3. Material e Métodos:

3.1. Bactérias incluídas no estudo

Entre Abril de 2006 e Dezembro de 2007, foram obtidas 84 amostras oriundas de 5 suiniculturas com produção intensiva (A, B, C, D, E) e de 1 com produção extensiva (F) no Norte, Centro e Sul de Portugal. As amostras foram divididas em cinco grupos de acordo com a sua natureza:

- (i) Suínos (n=21; fezes, zaragatoa de narinas, unha e de superfície dos animais);
- (ii) Alimentação/medicamentos (n=22, ração, água, medicamentos e antisépticos)
- (iii) Resíduos (n=21; lagonagem, águas residuais, estrume e fossa séptica);
- (iv) Amostras de instalações e equipamentos da suinicultura (n=19-ar, pisos/paredes de salas desinfectadas e não desinfectadas, pó de salas com animais, solo, recipientes próprios para a distribuição da comida);
- (v) Rio colector de águas residuais tratadas de suiniculturas (n=1).

Das 84 amostras, foram guardados, para posterior caracterização 473 *Enterococcus sp* incluídos no presente estudo para pesquisa de genes que conferem resistência a antibióticos inibidores da síntese proteica. Estes isolados começaram a ser previamente estudados nos Laboratórios de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto e da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa, tendo sido identificados como *E. faecium* (n=171), *E. faecalis* (n=78), *E. hirae* (n=73), *E. gallinarum* (n=14), *E. casseliflavus* (n=5) e *Enterococcus sp* (n=132). Todas as espécies apresentaram valores superiores a 50% de diminuição de susceptibilidade a antibióticos como tetraciclina, minociclina, eritromicina ou quinupristina-dalfopristina (Fig1) (Novais et al., artigo em preparação).

3.2. Pesquisa de genes que conferem resistência a Aminoglicosídeos, Tetraciclina e a Antibióticos do grupo MLS_B

A pesquisa de genes que conferem resistência aos aminoglicosídeos (*aac(6')-Ie-aph(2'')*-Ia, *aph(2'')*-Ib, *aph(2'')*-Ic, *aph(2'')*-Id, *aph(3')*-IIIa), às tetraciclina (*tetM*, *tetL*, *tetO*, *tetK*, *tetS*) e ao grupo MLS_B (*ermA*, *ermB*, *ermC*) foi realizada recorrendo a 4 PCR *multiplex* usando condições previamente descritas (Sutcliffe et al. 1996, Aarestrup et al., 2000; Vakulenko et al., 2003) (Tabelas 1, 2, 3 e 4). Para todas as reacções foram usados controlos positivos: *E. faecalis* estirpe Delaware para *aac(6')-aph(2'')*; *Enterococcus faecium* SF11770 para *aph(2'')*-Ib; *Enterococcus gallinarum* SF9117 para *aph(2'')*-Ic; *Enterococcus casseliflavus* SF11300 para *aph(2'')*-Id; *E. faecium* RC714 para *aph(3')*-IIIa; H252.2 para *tetM*, *tetL*; SN8 para *tetS*; H446511.1 para *ermB* gentilmente cedidos pela Doutora Teresa Coque do Hospital Ramón y Cajal de Madrid e pela Prof. Doutora Luísa Peixe da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Tabela 1. Sequência nucleotídica dos *primers* utilizados nas reacções de PCR

Objectivo	Primers	Sequências	Referência Bibliográfica
Amplificação dos genes de resistência aos aminoglicosídeos	<i>aac(6')-Ie-aph(2'')</i> -IaF <i>aac(6')-Ie-aph(2'')</i> -IR <i>aph(2'')</i> -IbF <i>aph(2'')</i> -IbR <i>aph(2'')</i> -IcF <i>aph(2'')</i> -IcR <i>aph(2'')</i> -IdF <i>aph(2'')</i> -IdR <i>aph(3')</i> -IIIaF <i>aph(3')</i> -IIIaR	-5'-CAT TAT ACA GAG CCT TGG GAA GAT G-3' 5'-GTC TTA AAA AAC TGG CAA TAT CTC GTT-3' 5'-CTT GGA CGC TGA GAT ATA TGA GCA C-3' 5'-GTT TGT AGC AAT TCA GAA ACA CCC TT-3' 5'-CCA CAA TGA TAA TGA CTC AGT TCC C-3' 5'-CCA CAG CTT CCG ATA GCA AGA G-3' 5'-GTG GTT TTT ACA GGA ATG CCA TC -3' 5'-CCC TCT TCA TAC CAA TCC ATA TAA CC -3' 5'-GGC TAA AAT GAG AAT ATC ACC GG-3' 5'-CTT TAA AAA ATC ATA CAG CTC GCG-3'	Vakulenko et al., 2003
Amplificação dos genes de resistência às tetraciclina	<i>tetM</i> F <i>tetM</i> R <i>tetL</i> F <i>tetL</i> R <i>tetO</i> F <i>tetO</i> R <i>tetS</i> F <i>tetS</i> R <i>tetK</i> F <i>tetK</i> R	5' GTT AAA TGA TGT TCT TGG AG-3' 5' CTA AGA TAT GGC TCT AAC AA-3' 5' CAT TTG GTC TTA TTG GAT CG-3' 5' ATT ACA CTT CCG ATT TCGG-3' GAT GGC ATA CAG GCA CAG AC-3' 5' CAA TAT CAC CAG AGC AGG CT-3' 5' TGG AAC GCC AGA GAG GTA TT-3' 5' ACA TAG ACA AGC CGT TGA CC-3' 5'- TTA GGT GAA GGG TTA GGT CC-3' 5'- GCA AAC TCA TTC CAG AAG CA-3'	Aarestrup et al (2000)
Amplificação dos genes de resistência aos macrólidos	<i>ermA</i> F <i>ermA</i> R <i>ermB</i> F <i>ermB</i> R <i>ermC</i> F <i>ermC</i> R	5'-TCT AAA AAG CAT GTA AAA GAA-3' 5'-TGA TTA TAA TTA TTT GAT AGC TTC-3' 5'- CAT TTA ACG ACG AAA CTG GC-3' 5'- GGA ACA TCT GTG GTA TGG CG-3' 5'- TCA AAA CAT AAT ATA GAT AAA-3' 5'- TAA CTG CTA AAT TTG TTA TAA TCG-3'	Soltani et al., 2000; Sutcliffe et al, 1996; Lim et al

“Pesquisa de genes que conferem resistência a inibidores da síntese proteica em *Enterococcus sp* oriundos do ambiente de suiniculturas.”

3.2.1. Condições de Amplificação

Tabela 2. Condições utilizadas para amplificação dos genes que conferem resistência a aminoglicosídeos.

Reagentes	Marca	Reagentes- concentração stock	Reagentes- concentração final	Tamanho do produto amplificado	Condições do termociclador
Água ultra pura	-----	-----	-----		95°C-10min (1ciclo). 94°C-60s, 52°C- 60s, 72°C- 3min, (30 ciclos).
Tampão de PCR	Promega	5X	1 X		
MgCl ₂	Promega	25 mM	2mM		
aac(6')-Ie-aph(2'')-IaF	Alphagene	100 µM	0,5 µm	778pb	
aac(6')-Ie-aph(2'')-IR	Alphagene	100 µM	0,5 µm		
aph(2'')-IbF	Alphagene	100 µM	0,5 µm	867pb	
aph(2'')-IbR	Alphagene	100 µM	0,5 µm		
aph(2'')-IcF	Alphagene	100 µM	0,5 µm	444pb	
aph(2'')-IcR	Alphagene	100 µM	0,5 µm		
aph(2'')-IdF	Alphagene	100 µM	0,5 µm	641pb	
aph(2'')-IdR	Alphagene	100 µM	0,5 µm		
aph(3'')-IIIaF	Alphagene	100 µM	0,5 µm	523pb	
aph(3'')-IIIaR	Alphagene	100 µM	0,5 µm		
dNTP	FriLabo	10 mM	0,2mM		
Taq Polimerase	Promega	5 U/ul	1,25 U		

“Pesquisa de genes que conferem resistência a inibidores da síntese proteica em *Enterococcus sp* oriundos do ambiente de suiniculturas.”

Tabela 3. Condições utilizadas para amplificação dos genes que conferem resistência às Tetraciclinas

Objectivo	Reagentes	Marca	Reagentes-concentração stock	Reagentes-concentração final	Tamanho do produto amplificado	Condições do termociclador
Caracterização dos genes de resistência às Tetraciclinas Genes <i>tetM</i> , <i>tetL</i> , <i>tetO</i>	Água ultra pura	-----	-----	-----	620 bp	95°C-10min (1ciclo). 94°C-30s, 52°C- 30s, 72°C- 30 s, (25 ciclos). 72°C-10min (1 ciclo)
	Tampão de PCR	Promega	5X	1 X		
	MgCl ₂	Promega	25 mM	2mM		
	<i>tetM</i> F	Alphagene	100 µM	0,5 µM	795 bp	
	<i>tetM</i> R	Alphagene	100 µM	0,5 µM		
	<i>tetL</i> F	Alphagene	100 µM	0,5 µM	437 bp	
	<i>tetL</i> R	Alphagene	100 µM	0,5 µM		
	<i>tetO</i> F	Alphagene	100 µM	0,5 µM		
	<i>tetO</i> R	Alphagene	100 µM	0,5 µM		
	dNTP	FriLabo	10 mM	0,2mM		
Taq Polimerase	Promega	5 U/ul	1,25 U			
Caracterização dos genes de resistência às Tetraciclinas Genes <i>tetK</i> , <i>tetS</i>	Água ultra pura	-----	-----	-----	622 bp	72°C-10min (1 ciclo)
	Tampão de PCR	Promega	5X	1 X		
	MgCl ₂	Promega	25 mM	2mM		
	<i>tetS</i> F	Alphagene	100 µM	0,5 µM	689 bp	
	<i>tetS</i> R	Alphagene	100 µM	0,5 µM		
	<i>tetK</i> F	Alphagene	100 µM	0,5 µM		
	<i>tetK</i> R	Alphagene	100 µM	0,5 µM		
	dNTP	FriLabo	10 mM	0,2mM		
	Taq Polimerase	Promega	5 U/ul	1,25 U		

Tabela 4. Condições utilizadas para amplificação dos genes que conferem resistência aos Macrólidos.

Reagentes	Marca	Reagentes-concentração stock	Reagentes-concentração final por reação de 50ul	Tamanho do produto amplificado	Condições do termociclador
Água ultra pura	-----	-----	-----	645 pb	95°C-10min (1ciclo). 94°C-30s, 53°C- 30s, 72°C- 30 s, (25 ciclos). 72°C-10min (1 ciclo).
Tampão de PCR	Promega	5X	1 X		
MgCl ₂	Promega	25 mM	2mM		
<i>ermA</i> F	Alphagene	100 µM	0,5 µM	424 pb	
<i>ermA</i> R	Alphagene	100 µM	0,5 µM		
<i>ermB</i> F	Alphagene	100 µM	0,5 µM	642 pb	
<i>ermB</i> R	Alphagene	100 µM	0,5 µM		
<i>ermC</i> F	Alphagene	100 µM	0,5 µM		
<i>ermC</i> R	Alphagene	100 µM	0,5 µM		
dNTP	FriLabo	10 mM	0,2mM		
Taq Polimerase	Promega	5 U/ul	1,25 U		

3.2.2. Visualização dos produtos de amplificação:

Os produtos de amplificação da reacção de PCR foram corridos por electroforese horizontal num gel de agarose a 2% em Tris Acetato EDTA.(TAE1X) contendo 0,01% de *Sybr Safe* (Invitrogen). Foram aplicados 10 a 15µl de cada amostra na corrida de electroforese assim como 3 µl de um marcador de DNA (Hyper Lader IV- Bioline). As corridas de electroforese decorreram a 110V durante 45 minutos. Os resultados foram visualizados num transiluminador e adquiridos digitalmente com programa *Quantati one* version 4.6.1 Buidl 055. (BioRad).

4. Resultados:

Nas suiniculturas estudadas foram observados três genes que conferem resistência às tetraciclinas (Fig.4; Fig.5; Fig.6): *tetM* e *tetS* associados ao mecanismo de proteção ribossomal e *tetL* que codifica para uma bomba de efluxo. Todos estes genes foram encontrados nas seis suiniculturas, sendo *tetM* e *tetL* os mais predominantes. A suinicultura C foi aquela que possuía um maior número de isolados com estes genes.

O único gene que confere resistência a macrólidos, lincosamidas e estreptograminas do grupo B encontrado foi *ermB* (Fig.4; Fig.5). Este também foi observado em todas as suiniculturas embora a C, mais uma vez, apresentasse um maior número de isolados com este gene.

Os genes que codificam para a resistência aos aminoglicosídeos foram apenas pesquisados em isolados que apresentaram resistência à gentamicina. Foram encontrados em todas as suiniculturas com exceção da F. (Fig.4; Fig.5).

O único gene encontrado associado à resistência à gentamicina foi *aac(6')-Ie-aph(2'')* que codifica para uma enzima bifuncional que confere resistência a todos os aminoglicosídeos com exceção da estreptomicina. Alguns dos isolados apresentaram este gene simultaneamente com *aph(3')-IIIa*, que confere resistência à canamicina (Fig.6).

Os genes *tetO*, *tetK*, *ermA*, *ermC*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic* e *aph(2'')-Id* não foram observados em nenhum isolado.

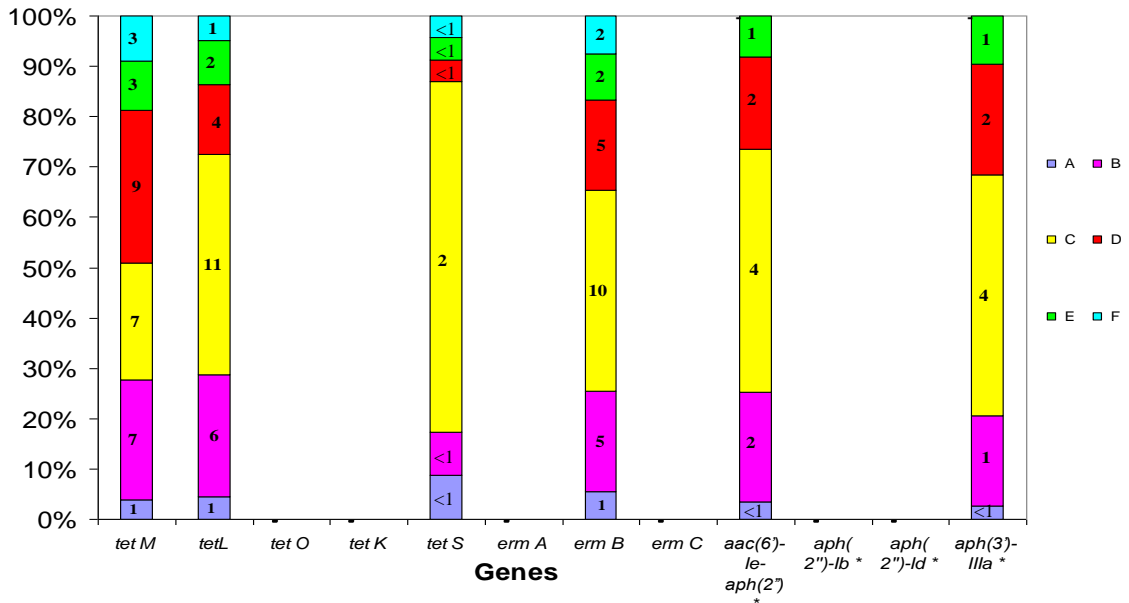


Figura 4: Incidência dos diferentes genes nas suiniculturas em estudo.* Genes apenas pesquisados em bactérias que eram resistentes à gentamicina. Os números dentro das barras correspondem à porcentagem dos isolados possuidores do gene indicado relativamente ao número de isolados totais.

Como se pode verificar na Figura 5, os genes de resistência estudados estão distribuídos por várias espécies de *Enterococcus*. No entanto, aquela que parece ter maior propensão para acumular estes genes é *E. faecium*, destacando-se elevadas percentagens associadas à presença de *tetM*, *tetL* e *ermB*.

E. faecalis é a segunda espécie com maior capacidade de acumular genes de resistência. Destaca-se, no entanto, pelo facto de ser aquele que mais adquire *aac(6')-Ie-aph(2'')*.

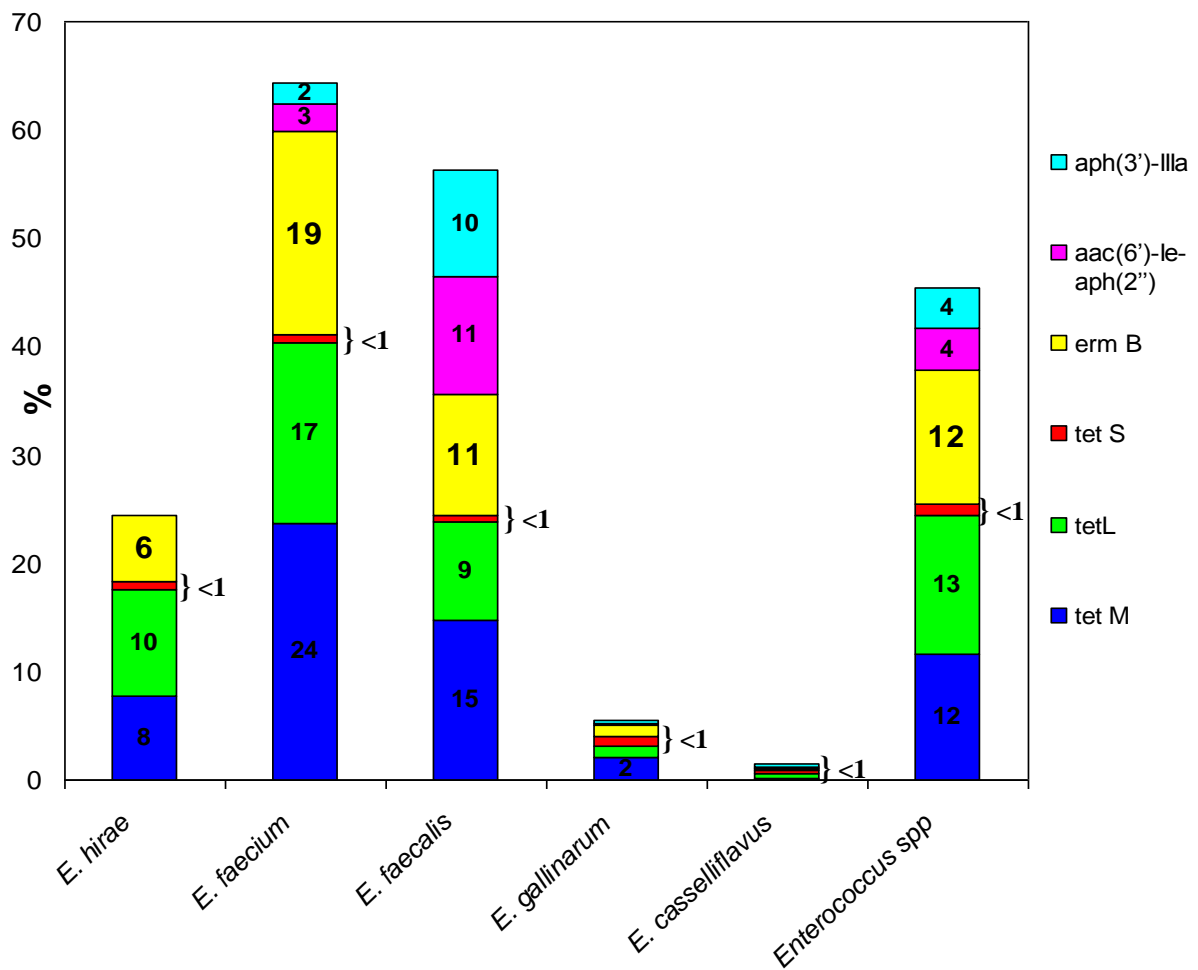


Figura 5. Distribuição dos genes observados pelas diferentes espécies. Os números dentro de cada barra correspondem à percentagem de isolados de uma dada espécie com o gene indicado face ao número total de isolados.

Na Tabela 5 evidencia-se a distribuição dos genes *tetM*, *tetL*, *tetS* e *ermB* por isolados com diferentes susceptibilidades às tetraciclina e aos macrólidos. Embora o gene *tetM* tenha sido encontrado fundamentalmente em bactérias resistentes às tetraciclina (91%), também foi observado em isolados com resistência intermédia (1%) ou sensíveis (8%) a estes antibióticos. A mesma situação se verificou para o *tetL* e *tetS*. Estavam fundamentalmente associados a *Enterococcus sp* resistentes às tetraciclina (94% e 75% respectivamente) embora também tenham sido detectados em isolados sensíveis (6% e 25%, respectivamente). De uma forma geral, os isolados sensíveis e resistentes portadores de genes *tet* encontravam-se distribuídos por todas as suiniculturas estudadas.

A resistência aos macrólidos, associada ao gene *ermB*, verificou-se fundamentalmente em bactérias resistentes (77%) à eritromicina, mas também em bactérias com resistência intermédia (11%) e sensíveis (12%) a este antibiótico. Tal como os genes *tet*, *ermB* encontrava-se disseminado pelas bactérias resistentes e sensíveis da maioria das suiniculturas estudadas.

Tabela 5. Distribuição dos genes *tetM*, *tetL*, *tetS* e *ermB* por isolados com diferentes susceptibilidades às Tetraciclinas e aos Macrólidos.

Gene	Susceptibilidade aos antibióticos	% de isolados	Suiniculturas
	Tetraciclinas		
tetM	R	91%	A,B,C,D,E,F
	I	1%	A
	S	9%	C,D,E
tetL	R	94%	A,B,C,D,E,F
	I	0%	
	S	6%	C,D,E
tetS	R	75%	A,B,C,D,E,F
	I	0%	
	S	25%	C
	Macrólidos		
ermB	R	77%	A,B,C,D,F
	I	11%	A,B,C,D,F
	S	12%	B,C,D,E

R- Resistentes, I-Com resistência intermédia; S- Susceptíveis

Foram observadas várias combinações de genes que conferem resistência aos antibióticos nos *Enterococcus sp* estudados (Tabela 6). A mais predominante foi *ermB* + *tetM* + *tetL* (18%) e a menos predominante foi *ermB* + *tetM* + *aac(6')-Ie-aph(2'')* + *aph(3')-IIIa* (4%). As diversas combinações de genes foram observadas em todas as espécies, suiniculturas e na maioria das amostras (animais, alimentos e medicamentos, resíduos e amostras de instalações e equipamentos) estudadas.

Tabela 6. Combinações de genes predominantes nas suiniculturas estudadas.

Genótipo	% de isolados	Espécies	Tupo de amostras (n°; suiniculturas)
<i>ermB</i> + <i>tetM</i> + <i>tetL</i>	18% (85/473)	<i>E. faecium</i> (n=40); <i>E. faecalis</i> (n=16); <i>E. hirae</i> (n=16); <i>Enterococcus spp</i> (n=14)	Animais (n=14; C, D, E, F); Resíduos (n=14; A,B,C,D,E,F); Instalações e equipamento (n=10; B,C,D,E); Alimentos/Medicamentos (n=9; B,C,F),
<i>tetM</i> + <i>tetL</i>	11% (54/473)	<i>E. faecium</i> (n=26); <i>E. faecalis</i> (n=3); <i>E. hirae</i> (n=12); <i>Enterococcus spp</i> (n=13)	Animais (n=8;C,E); Resíduos (n=11;A,B,C,E); Instalações e equipamento (n=14;B,C,D,E,F); Alimentos/Medicamentos (n=2; B,D)
<i>ermB</i> + <i>tetL</i>	7% (32/473)	<i>E. faecium</i> (n=10); <i>E. hirae</i> (n=9); <i>Enterococcus spp</i> (n=13)	Animais (n=13;C,E,F); Resíduos (n=11;A,B,C,D,E,F); Instalações e equipamento (n=10;B,C,D,E); Alimentos/Medicamentos (n=12; B,C,F)
<i>ermB</i> + <i>tetM</i>	6% (28/473)	<i>E. faecium</i> (n=17); <i>E. faecalis</i> (n=2); <i>E. hirae</i> (n=3); <i>Enterococcus spp</i> (n=5)	Animais (n=5;D,E); Resíduos (n=5;A,B,C,E); Instalações e equipamento (n=7;B,D,E); Alimentos/Medicamentos (n=3; D,E,F)
<i>ermB</i> + <i>tetM</i> + <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> + <i>aph(3')-IIIa</i>	4% (20/473)	<i>E. faecium</i> (n=3); <i>E. faecalis</i> (n=11); <i>Enterococcus spp</i> (n=6)	Animais (n=4;C,E,F); Resíduos (n=9;A,B,C,E); Instalações e equipamento (n=3;B,C,E); Alimentos/Medicamentos (n=3; C,E)
<i>ermB</i> + <i>tetM</i> + <i>tetL</i> + <i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i> + <i>aph(3')-IIIa</i>	4% (17/473)	<i>E. faecium</i> (n=3); <i>E. faecalis</i> (n=11); <i>Enterococcus spp</i> (n=3)	Resíduos (n=6;B,C,F); Alimentos/Medicamentos (n=6;B,C,F)

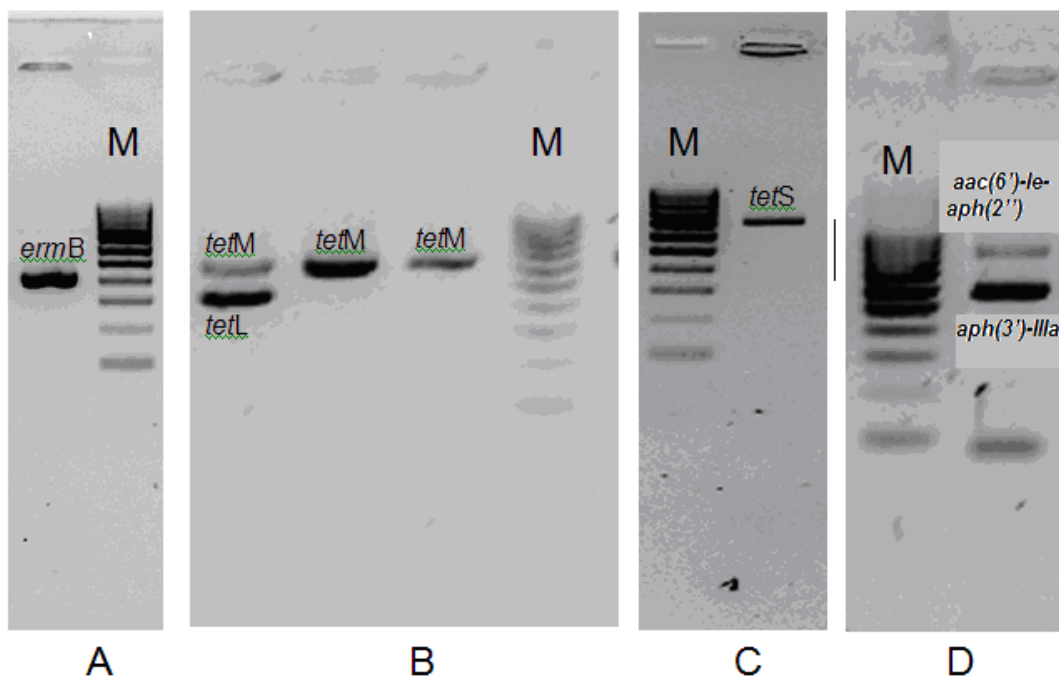


Figura 6. Reações de PCR representativas da amplificação dos genes obtidos que codificam para a resistência a macrólidos (A), tetraciclinas (B e C) e aminoglicosídeos (D). M-Marcador de DNA (Hyper Lader IV- Bioline). As banda do marcador diferem entre si de 100 bp oscilando entre 100bp e 1000bp.

5. Discussão e Conclusão

O objectivo do presente estudo prendeu-se com a pesquisa, em *Enterococcus sp* pertencentes a diferentes espécies, de genes que conferem resistência a tetraciclina, aminoglicosídeos e ao grupo MLS_B, antibióticos inibidores da síntese proteica frequentemente administrados aos animais de produção em Portugal.

À semelhança do que acontece em outros países (Aarestrup, F et al, 2000; Chee-sanford, J et al 2001; Agerso, Y et al 2006) observou-se uma elevada incidência e diversificação destes genes, nomeadamente *tetM*, *tetL*, *tetS*, *ermB*, *aac(6')-Ia-aph(2')*.

Estes foram detectados em simultâneo num elevado número de *Enterococcus sp* sugerindo que *tetM*, *tetL*, *tetS*, *ermB* ou *aac(6')-Ia-aph(2')* podem estar presentes nos mesmos elementos genéticos ou serem co-transferidos em eventos de disseminação horizontal. Se tivermos em consideração que os genes *tetM* e *ermB* são dos mais disseminados nas suiniculturas estudadas e que se encontram frequentemente em elementos genéticos conjugativos como Tn1545, Tn916, Tn5397 (*tetM*), Tn6003, Tn6002, ou Tn3872 (*ermB*), não é difícil de compreender a sua elevada co-dispersão (Agerso, Y. et al. 2006; Cochetti, I. et al. 2008).

A presença de genes *tet* e/ou *ermB* foi observada em bactérias fenotipicamente susceptíveis a tetraciclina e/ou macrólidos. A recombinação genética a que muitos elementos genéticos que os albergam estão sujeitos, pode levar a deleções ou inserções de porções de DNA em genes fundamentais para a expressão fenotípica da resistência. Também a presença de bactérias resistentes a tetraciclina e macrólidos em que não se encontraram os genes estudados, sugere que outros genes para além dos pesquisados podem estar presentes.

A elevada incidência dos genes *tet*, *erm* e *aac(6')-Ia-aph(2')* é uma preocupação para a saúde pública, pois estes e/ou as bactérias que os possuem podem passar para o homem através do contacto directo com os animais, da cadeia alimentar ou de outros veículos como o ar (Gibbs, S. et al. 2006, Donabedian et al 2003, Johnsen, P. et al 2004). Adicionalmente, quando os resíduos de origem animal são usados como fertilizantes em agricultura, podem

“Pesquisa de genes que conferem resistência a inibidores da síntese proteica em *Enterococcus sp* oriundos do ambiente de suiniculturas.”

disseminar os genes encontrados fora das fronteiras das suiniculturas, contaminando solos, águas e vegetais. Exemplos podem ser encontrados na literatura (Chee-Sanford J.C et al. 2001; Sapkota, R. et al. 2007).

É ainda preocupante, o facto de algumas bactérias resistentes aos antibióticos conseguirem sobreviver em amostras de águas tratadas com UV, em produtos antisépticos e em salas desinfectadas. Estes dados sugerem que estudos que avaliem a resistência a biocidas presentes no ambiente de produção animal (Ex. desinfectantes, antisépticos, metais) deverão ser futuramente realizados, para melhor compreender quer a sobrevivência/persistência destes microrganismos em locais mais hostis à sua multiplicação, quer a evolução da epidemiologia da resistência aos antibióticos neste nicho ecológico.

6. Bibliografia:

- Aaerstrup, F.M; Seyfarth, A.M; Emborg, H.D; Pedersen, K; Hendriksen, R.S; Bager, F. (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.
- Aaerstrup, F.M; Agero, Y; Gerner–Smidt, P; Madsen, M; Jensen, L. (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 (2000), pp 127–137.
- Agero, Y; Pedersen, A; Aaerstrup, F. (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(5), pp 832-839.
- Antunes, P; Machado, J; Peixe, L. (2006). Characterization of antimicrobial resistance and class 1 and 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from different sources in Portugal, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58, pp 297–304.
- Antunes, P; Machado, J; Peixe, L. (2004). Dissemination amongst humans and food products of animal origin of a *Salmonella typhimurium* clone expressing an integron-borne OXA-30 β -lactamase, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54, pp 429-434.
- Auto, H; Constant, A; Constant, J; (1980). *Antibióticos e Quimioterápicos*; 5ª edição, Edefal, pp 131-166.
- Boerlin, P; Wissing, A; Aaerstrup, F.M; Frey, J; Nicolet, J. (2001). Antimicrobial growth promoter ban and resistance to macrolides and vancomycin in enterococci from pigs, *Journal Clinical Microbiology*, 39(11), pp 4193-4195.

- Boerlin, P; Travis, R; Gyles, C; Smith, R; Lim, N; Nicholson, V; McEwen, S; Friendship, R; Archambault, M. (2005). Antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from swine in Ontario, *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), pp. 6753-6761
- Casewell, M; Friis, C; Marco, E; McMullin, P; Philips, I. (2002). The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health, *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 52(2), pp 159-161.
- Chee-Sanford, J.C; Aminov, R.I; Krapac, I.J; Garrigues-Jeanjean, N; Mackie, R.I. (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.
- Cochetti, I; Tili, E; Mingoia, M; Varaldo, P; Montanari, M. (2008). erm(B)-Carrying Elements in Tetracycline-Resistant Pneumococci and Correspondence between Tn1545 and Tn6003, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(4), p.p. 1285-1290.
- Chopra, I; Roberts, M; (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance, *Microbiology Molecular Biology Reviews*, 65(2), pp 232-260.
- Corrêa, A; Fuentefria, D; Corção, G. (2004). Resistência a antimicrobianos em *Enterococcus* isolados de amostras de suínos, *Acta Science Veterinariae*, 33(2), pp 155-159.
- Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme. (2007). DANMAP 2007— *Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark*. Copenhagen, Denmark, Danish Veterinary Laboratory.

- 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; Zervos, M.J. (2003). Molecular characterization of gentamicin-resistant Enterococci in the United States: evidence of spread from animals to humans through food, *J Clin Microbiol*, 41(3), pp 1109-13.
- Ferreira, W; Sousa, J; (2000). *Microbiologia*; Porto, Edições Lidel, Volume II, pp 60-62.
- Gibbs, S; Green, C; Tarwater, P; Mota, L; Mena, K; Scarpino, P. (2006). Isolation of antibiotic-resistant bacteria from the air plume downwind of a swine confinement concentrated animal feeding operation, *Environ Health Perspectives*, 114(7), pp 1032-1037.
- Hasman, H; Aarestrup, F. (2002). tcrB, a Gene Conferring Transferable Copper Resistance in *Enterococcus faecium*: Occurrence, Transferability, and Linkage to Macrolide and Glycopeptide Resistance, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, pp 1410-1416.
- Heuer, E; Pedersen, K; Jensen, L; Madsen, M; Olsen, J. (2002). Persistence of vancomycin-resistant enterococci (VRE) in broiler houses after the avoparcin ban, *Microbial Drug Resistance*, 8(4), pp 355-361.
- Hermann, T. (2007). Aminoglycoside antibiotics: old drugs and new therapeutic approaches, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64 (2007), pp 1841 – 1852.
- INFARMED. (2007). Relatório do Departamento de Medicamentos Veterinários - O Medicamento Veterinário Farmacológico, Abordagem Analítica, Lisboa, INFARMED.

- Johnsen, P; Osterhus, J; Sletvold, H; Sorum, M; Kruse, H; Nielsen, K; Simonsen, G; Sundsfjord, A. (2004). 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.
- Leelapron, A; Yodkamol, K; Waywa, D; Pattanachaiwit, S. (2008). A novel structure of Tn4001-truncated element, type V, in clinical isolates and multiplex PCR for detecting aminoglycoside resistance genes, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31, pp 250-254.
- Novais, C; Coque, T; Costa, J; Sousa, J; Baquero, F; Peixe, L. (2005). High occurrence and persistence of antibiotic-resistant enterococci in poultry food samples in Portugal, *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 56(6), pp 1139-1143.
- Novais, C; Coque, T; Sousa, J; Peixe, L. (2006). Antimicrobial resistance among faecal enterococci from healthy individuals in Portugal, *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 12 (11), pp. 1131 – 1134.
- Osswald, W. (2001). *Terapêutica Medicamentosa e as suas Bases Farmacológicas*; Porto, Porto Editora, 4ªedição, pp 853-947.
- Wegener, H; Aarestrup, F; Jensen, L; Hammerum, A; Bager, B. (1999). Use of Antimicrobial Growth Promoters in Food Animals and *Enterococcus faecium* Resistance to Therapeutic Antimicrobial Drugs in Europe, *Emerging Infectious Diseases*, 5(3), pp 329-325.
- Wegener, C. (2003). Antibiotics in animal feed and their role in resistance development, *Current Opinion Microbiology*, 6(5), pp 439-442.

- Sapkota, R; Curriero, F; Gibson, K; Schwab, K. (2007). Antibiotic-resistant enterococci and fecal indicators in surface waters and groundwater impacted by a concentrated swine feeding operation, *Environmental Health Perspectives*, 115(7), pp 1040-1045.
- Sousa, J. (2005). *Manual de Antibióticos Antibacterianos*; Porto, Edições Universidade Fernando Pessoa, pp 323-421.
- Sousa, J. (2001). *Antibióticos Antibacterianos*; Porto, Farmácia Portuguesa (ANF), 1ª edição, pp 136-192.
- Sutcliffe, J; Grebe, T; Tait-Kamradt, A; Wondrack, L. (1996). Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40, pp 2562-2566.
- Vakulenko, S.B; Donabedian, S.M; Voskresenskiy, A.M; Zervos, M.J; Lerner, S.A; Chow, J.W. (2003). Multiplex PCR for detection of aminoglycoside resistance genes in enterococci, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, pp. 1423-1426.

“Pesquisa de genes que conferem resistência a inibidores da síntese proteica em *Enterococcus sp* oriundos do ambiente de suiniculturas.”

Anexos
