

CONTRIBUIÇÃO DAS SUINICULTURAS NA SELECÇÃO E DISSEMINAÇÃO DE *ENTEROCOCCUS SPP* RESISTENTES ÀS TETRACICLINAS

Ana Nogueira

Aluna de monografia
Faculdade de Ciências da Saúde - UFP
11785@ufp.pt

Ana Dias

Aluna de monografia
Faculdade de Ciências da Saúde - UFP
13106@ufp.pt

Ricardo Silva

Técnico de Investigação
Faculdade de Ciências da Saúde - UFP
ricardos@ufp.pt

Ana R. Freitas

Investigadora
REQUIMTE, Faculdade de Farmácia - UP
anarpf@gmail.com

João Carlos Sousa

Professor catedrático
CEBIMED, Faculdade de Ciências da Saúde - UFP
jcsousa@ufp.pt

Luísa V. Peixe

Professora associada com agregação
REQUIMTE, Faculdade de Farmácia - UP
lpeixe@ff.up.pt

Carla Novais

Professora auxiliar
CEBIMED, Faculdade de Ciências da Saúde - UFP
Investigadora
REQUIMTE, Faculdade Farmácia - UP
cnovais@ufp.pt

RESUMO

Apesar dos antibióticos terem sido abolidos na União Europeia como promotores de crescimento, uma elevada percentagem de *Enterococcus* spp resistentes às tetraciclinas e genes que lhes conferem resistência (*tetM*, *tetL*, *tetS*) foram detectados em amostras animais e ambientais de suiniculturas portuguesas. Estes dados são preocupantes e podem estar associados a um elevado consumo destes antibióticos em medicina veterinária. A presença de tais estirpes em amostras de ar e de estrume usado como fertilizante agrícola pode ainda promover a sua dispersão fora das explorações animais.

PALAVRAS-CHAVE: *Enterococcus* spp; resistência a tetraciclinas; suiniculturas; genes *tet*.

ABSTRACT

Although antibiotics were banned from European Union as animal growth promoters, a high percentage of *Enterococcus* spp resistant to tetracyclines and genes conferring resistance to these agents (*tetM*, *tetL*, *tetS*) were detected in animal and environmental samples collected in Portuguese piggeries. These data are of concern and might be associated to the consumption of high amounts of these antibiotics in veterinary medicine. The presence of such strains in air and manure used as fertilizer in agriculture might promote their dissemination outside the animal production setting.

KEY-WORDS: *Enterococcus* spp; tetracycline resistance; piggeries; *tet* genes.

1. INTRODUÇÃO

Os antibióticos têm sido frequentemente usados no ambiente de exploração animal com vários fins: terapêutico, profilático, metafilático e como promotores de crescimento. A sua utilização abusiva em doses subterapêuticas levou à selecção de microrganismos patogénicos e comensais resistentes a estas moléculas e ainda à manutenção de clones e/ou elementos genéticos particulares, alguns dos quais partilhados entre o nicho animal e humano (Donabedian et al., 2003; Wegener, 2003; Johnsen et al., 2005; Katsunuma et al., 2008). Dado que a cadeia alimentar ou o contacto directo com os animais podem ser responsáveis pela ligação entre estes dois tipos de hospedeiros, foi despertada uma preocupação na União Europeia que aboliu progressivamente, nas duas últimas décadas, o uso de antibióticos como promotores de crescimento animal, tendo este processo terminado em Janeiro de 2006 com a proibição do uso de monensina, avilamicina, salinomocina e flavomicina (Regulamento EC Nº1831/2003 do parlamento Europeu). Embora alguns trabalhos tenham demonstrado uma diminuição de microrganismos resistentes aos antibióticos após a aplicação desta medida (Aarestrup et al., 2001; Boerlin et al., 2001), ainda são muitos os estudos que descrevem resultados contraditórios (Heuer et al., 2002), eventualmente justificáveis por características epidemiológicas particulares de cada região geográfica, associadas quer ao ambiente de produção animal quer aos próprios microrganismos (uso/resistência a antisépticos, presença/resistência a metais, maior virulência ou capacidade de colonização, entre outros). Adicionalmente, o facto de muitas infecções humanas associadas a bactérias zoonóticas com resistência múltipla terem aumentado em alguns países, reforçou o cepticismo de muitos relativamente à eficácia da abolição dos promotores de crescimento (Phillips et al., 2004). Casewell et al (2003) também chamaram a atenção sobre a diminuição do bem-estar animal apesar dos esforços para melhorar as condições nos locais de produção, aumentando, desta forma, o uso de agentes antimicrobianos na medicina veterinária para o tratamento de infecções como mastites, pneumonias ou gastroenterites. Esta medida contribuiu, seguramente, para a persistência de microrganismos patogénicos (*Salmonella* sp., *Campylobacter* sp. e *Escherichia coli*) e comensais com resistência aos antibióticos quer no intestino nos animais quer no ambiente, uma vez que a utilização do estrume animal ou de efluentes das explorações na agricultura facilitam a dispersão de tais estirpes, que posteriormente ainda podem atingir águas profundas ou superficiais por processos de lixiviação ou escorrência dos solos contaminados (Chee-Sanford et al., 2001; Casewell et al., 2003; Koike et al., 2007; Sapkota et al., 2007).

As moléculas mais usadas como agentes terapêuticos em veterinária pertencem ao grupo das tetraciclinas, tendo sido registados elevados valores de consumo na Europa (DANMAP, 2006), nomeadamente em Portugal onde foram utilizadas cerca de 40 toneladas (animais de produção e companhia) só no ano de 2006 (INFARMED, 2007). Estes valores compreendem-se pelo facto de estarmos perante fármacos economicamente vantajosos e serem considerados de largo espectro, pois têm actividade não só em diferentes géneros bacterianos como também em alguns protozoários (Chopra e Roberts., 2001). Estes dados associados ao facto de estas moléculas terem sido usadas nos últimos 50 anos nas medicinas humanas e veterinárias, justificam os elevados valores de resistência encontrados em alguns estudos portugueses e internacionais (Aarestrup et al., 2000; Peters et al., 2003; Novais et al., 2005; Poeta et al., 2006).

Neste sentido, sendo as tetraciclinas largamente usadas na produção animal em Portugal, foi objectivo do presente estudo avaliar o papel das suiniculturas como reservatório de *Enterococcus* spp resistentes às tetraciclinas e do seu possível impacto na disseminação de tais bactérias quer para o ambiente quer para o Homem.

2. MÉTODOS

2.1. COLHEITA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS

Em Maio e Dezembro de 2007, foram colhidas 42 amostras de animais e ambiente de duas suiniculturas com diferentes tipos de produção (intensiva-SI e extensiva-SE) no Norte e Sul de Portugal. As amostras da SI (n=34) abrangeram oito áreas: **(i)** sala dos machos- fezes (n=1); **(ii)** sala de cobrição-ração de comedouros (n=2), doseador de ração (n=1), bebedouros (n=1), zaragoas rectal, narina e pata (n=3), fezes (n=1) e fossa (n=1); **(iii)** sala de gestação-fezes (n=1) e ar (n=1); **(iv)** 2 maternidades-fezes das porcas parideiras (n=2), comedouro (n=1), zaragatoa da pele de leitão (n=1), zaragoas de parede e pavimentos (n=3), zaragoas de fossa (n=1) e ar (n=1); **(v)** salas lavadas e desinfectadas- zaragoas do local de permanência dos leitões e sistema de ventilação (n=2) e ar (n=1); **(vi)** sala de engorda de suínos para abate- fezes e zaragatoa rectal (n=2) e ar (n=1); **(vii)** amostras que influenciam diferentes pontos da suinicultura- ração da embalagem para as salas de cobrição e gestação (n=1), água não tratada antes de ir para bebedouros (n=1), água para bebedouros tratada com cloro e UV (n=1); **(viii)** amostras influenciadas por diferentes pontos da suinicultura- lagonagens (n=2) e esterco seco usado posteriormente por agricultores (n=1). Entre as amostras da SE (n=8) foram incluídas terra utilizada por suínos de várias idades (n=2), terra em fase de pousio (não usada por suínos no momento da colheita) (n=1), resíduos sólidos contaminados com fezes (n=1), chorume (n=1), água de bebedouros de suínos com menos de 6 meses, da área de permanência das porcas parideiras e local do pousio (n=3).

As amostras foram enriquecidas em 225ml de água peptonada (25g das sólidas e 25 ml das líquidas) durante 18h a 37°C e posteriormente semeadas (100 µl) em meio de Slanetz-Bartley com (16 µg/ml de tetraciclina, 1000µg/ml de estreptomicina, 125µg/ml de gentamicina, 8µg/ml de eritromicina, 6µg/ml de vancomicina ou 16µg/ml ampicilina) e sem antibióticos (37°C, 48h de incubação). As amostras de ar foram apenas colhidas em meio de Slanetz-Bartley sem antibiótico usando o colectores MAS-100 (Merck). De cada placa foi guardada uma colónia de cada morfologia para estudos posteriores.

2.2. AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS

A avaliação da susceptibilidade aos antibióticos foi realizada pelo método de difusão em agar com discos de tetraciclina (30µg) e minociclina (30µg) segundo as regras de CLSI (CLSI, 2006). As estirpes *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 foram usadas como controlos.

2.3. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS GENES QUE CONFEREM RESISTÊNCIA ÀS TETRACICLINAS

A identificação do género foi realizada utilizando metodologia previamente descrita por Facklam e Collins (1989), tendo sido avaliada a presença de cocos de Gram positivo, ausência de catalase, hidrólise da esculina e crescimento em NaCl a 6,5%. A caracterização da espécie (*E. faecium*, *E. faecalis*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. durans* e *E. hirae*) e de diferentes genes que conferem resistência às tetraciclina (*tetM*, *tetL*, *tetO*, *tetS*, *tetK*) foi realizada pelo método de Polymerase Chain Reaction (PCR) com condições previamente descritas (Satake et al, 1997; Aarestrup et al., 2000; Arias et al, 2006).

3. RESULTADOS

3.1 ISOLADOS BACTERIANOS E AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS

Das 214 placas de Slanetz-Bartley usadas para amostras de SI, 79% (n=169/214) apresentaram uma contagem superior a 300 Unidades Formadoras de Colónias (UFC), 14% (n=30/214) menor que 30 UFC e 7% (n=15/214) entre 30 e 300 UFC. Na maioria dos casos, as placas que apresentaram menor crescimento foram aquelas suplementadas com vancomicina, gentamicina ou ampicilina. O crescimento bacteriano foi menor nas 56 placas de Slanetz-Bartley usadas na SE, detectando-se uma contagem abaixo de 30 UFC em 59% (n=33/56), acima de 300 UFC em 32% (n=18/56) e 9% (n=5/56) entre 30 e 300 UFC. As placas que apresentaram maior crescimento foram aquelas que não tinham antibiótico ou que foram suplementadas com tetraciclina ou eritromicina.

Enterococcus spp (n=103 da SI e n=48 da SE) foram isolados em 37 (31 SI e 6 SE) de 42 amostras (88%) e identificados como *E. faecium* (n=81), *E. hirae* (n=27), *E. faecalis* (n=10), *E. gallinarum* (n=7), e *Enterococcus* spp (n=26). Nas amostras da SE não se observaram as espécies *E. faecalis*, *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*.

Ausência de susceptibilidade à tetraciclina e minociclina foi detectada na maioria dos isolados das diferentes suiniculturas: (i) tetraciclina- 86% (n=89/103) resistentes e 1% (n=1/103) com resistência intermédia na SI; 81% (n=39/48) resistentes e 2% (n=1/48) com resistência intermédia na SE; (ii) minociclina- 71% (n=74/103) resistentes e 31% (n=15/48) com resistência intermédia na SI; 72% resistentes (n=35/48) e 8% (n=4/48) com resistência intermédia na SE). Os isolados resistentes são oriundos de amostras colhidas nos diversos locais das suiniculturas e foram seleccionados não só em placas de Slanetz-Bartley suplementadas com tetraciclina, mas também naquelas sem antibióticos ou com eritromicina, ampicilina, gentamicina ou estreptomina.

3.2. CARACTERIZAÇÃO DOS GENES QUE CONFEREM RESISTÊNCIA ÀS TETRACICLINAS

O gene mais frequentemente encontrado nos dois tipos de suinicultura foi o *tetM* (82% n=84/103 na SI e 52% n=25/48 na SE), seguido de *tetL* (33% n=34/103 na SI e 25% n=12/48 na SE) e *tetS* (1% n=1/103 na SI). Embora em muitos isolados estes genes tenham sido detectados isoladamente, 32% (n=33/103) dos *Enterococcus* spp da SI e 17% (n=8/48) dos da SE apresentaram simultaneamente *tetM* e *tetL*.

Curiosamente, os genes estudados foram observados não só nas bactérias resistentes às tetraciclinas, mas também em algumas susceptíveis (4 *E. faecium* e 1 *E. gallinarum* com *tetM* e 2 *E. faecium* com *tetM* e *tetL* na SI). Por outro lado, 5 *E. faecium*, 1 *E. hirae* e 3 *Enterococcus* spp da SI e 7 *E. faecium*, 3 *E. hirae* e 2 *Enterococcus* spp da SE resistentes às tetraciclinas não apresentaram nenhum dos genes estudados (Tabela 1).

Os genes *tetO* e *tetK* não foram observados em nenhum isolado.

Tabela 1. Distribuição dos genes *tet* em *Enterococcus* spp com distintos perfis de susceptibilidade às tetraciclínas e oriundos de dois tipos de suinicultura.

| Tipo de suinicultura | Espécie | Nº isolados | Tipos de amostra | Susceptibilidade às tetraciclínas | Genes <i>tet</i> |
|----------------------|----------------------|--------------------|--|---|------------------|
| INTENSIVA | <i>E. faecium</i> | 5 | Maternidade (fezes e zaragatoa de parede); sala de cobrição (bebedouro e zaragatoa de narina) | R | - |
| | | 19 | Sala de gestação (ar); Sala de machos (fezes); Sala de engorda (fezes, zaragatoa rectal); sala de cobrição (bebedouro, zaragatoa narina); Maternidade (fezes, zaragatoa de leitão e parede); Ração para salas de cobrição e gestação; Lagonagem | R | M |
| | | 20 | Maternidade (fezes, comedouro, zaragatoa de leitão e de pavimento, fossa, ar); Sala de engorda (zaragatoa rectal); Sala de cobrição (fezes, fossa, doseador de ração); Salas lavadas e desinfectadas (zaragatoa do local dos leitões); Lagonagem; Esterco para agricultura | R | ML |
| | | 2 | Sala de machos (fezes); Maternidade (zaragatoa de pavimento) | S | - |
| | | 4 | Sala de cobrição (fezes, zaragatoa rectal e fossa) | S | M |
| | | 2 | Sala de cobrição (zaragatoa da pata) | S | ML |
| | <i>E. hirae</i> | 1 | Sala de cobrição (comedouro) | R | - |
| | | 4 | Maternidade (ar, zaragatoa de parede e de fossa); Sala de cobrição (zaragatoa rectal) | R | M |
| | | 1 | Ração para salas de cobrição e gestação | R | L |
| | | 5 | Sala de gestação (fezes, ar); Maternidade (zaragatoa de parede); Sala de engorda (zaragatoa rectal) | R | ML |
| | | 1 | Sala de gestação (ar) | S | - |
| | | <i>E. faecalis</i> | 8 | Sala de cobrição (fezes e fossa); Sala de gestação (fezes); Maternidade (zaragatoa de pavimento); Salas lavadas e desinfectadas (zaragatoa de ventilação); Água tratada com cloro e UV; Lagonagem; Esterco para agricultura | R |
| | 2 | | Sala de cobrição (fossa); Lagonagem | R | ML |
| | <i>E. gallinarum</i> | 5 | Água não tratada; Sala de cobrição (zaragatoa de pata) | R | M |
| | | 1 | Sala de cobrição (zaragatoa de pata) | R | S |
| | | 1 | Salas lavadas e desinfectadas (zaragatoa do local dos leitões) | S | M |

| Tipo de suinicultura | Espécie | Nº isolados | Tipos de amostra | Susceptibilidade às tetracilinas | Genes <i>tet</i> |
|----------------------|-------------------------|-------------|--|----------------------------------|------------------|
| | <i>Enterococcus spp</i> | 3 | Sala de cobrição (bebedouro); Salas lavadas e desinfectadas (zaragatoa de ventilação); Maternidade (zaragatoa de parede) | R | - |
| | | 11 | Sala de cobrição (comedouro, bebedouro, fossa, fezes); Maternidade (comedouro, fossa); Lagonagem | R | M |
| | | 4 | Sala de cobrição (zaragatoa rectal); Maternidade (fezes, zaragatoa de pavimento); Sala de engorda (zaragatoa rectal) | R | ML |
| | | 1 | Lagonagem | I | - |
| | | 3 | Salas lavadas e desinfectadas (zaragatoa dolocal dos leitões); Lagonagem; Esterco | S | - |
| EXTENSIVA | <i>E. faecium</i> | 7 | Terra (usada por suínos, pousio) | R | - |
| | | 11 | Terra usada por suínos; Fezes; Chorume | R | M |
| | | 7 | Terra (usada por suínos, pousio), Fezes, Chorume; Bebedouro | R | ML |
| | | 1 | Fezes | R | L |
| | | 3 | Terra usada por suínos; Chorume | S | - |
| | <i>E. hirae</i> | 3 | Terra (usada por suínos, pousio) | R | - |
| | | 3 | Terra usada por suínos; Fezes | R | M |
| | | 3 | Terra usada por suínos; Chorume | R | ML |
| | | 1 | Terra usada por suínos | R | L |
| | | 5 | Terra por usada por suínos, Fezes, Chorume; Bebedouro | S | - |
| | <i>Enterococcus spp</i> | 2 | Fezes, chorume | R | - |
| | | 1 | Chorume | R | M |
| | | 1 | Bebedouro | I | - |

Legenda: R- resistente; I- resistência intermédia; S-susceptível

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Elevadas percentagens de resistência a tetracilinas foram observadas em *Enterococcus spp* isolados de animais e do ambiente de suiniculturas portuguesas, confirmando os dados de outros estudos europeus (Aarestrup et al., 2000; Peters et al., 2003; Agersø et al., 2006). O grande número de amostras que apresentarem bactérias resistentes é preocupante, sobretudo se tivermos em consideração que algumas destas estirpes conseguiram sobreviver em águas tratadas com UV usadas para o consumo animal e no ar inspirado pelos trabalhadores das explorações. Este último dado questiona-nos ainda sobre o impacto das suiniculturas na saúde pública das comunidades circundantes que podem estar expostas a tais microrganismos, tal como demonstrado por Gibbs et al (2006) ao ter detectado diversos géneros bacterianos com resistência a antibióticos no ar a jusante de suiniculturas americanas.

O crescimento de *Enterococcus* spp em placas suplementadas com antibióticos de diferentes classes evidencia que o uso destas moléculas no ambiente de produção animal tem um impacto positivo na selecção de bactérias simultaneamente resistentes a tetraciclina e outros agentes antimicrobianos. No entanto, o menor número de colónias observados nas placas de selecção associadas às amostras da suinicultura extensiva, sugere que esta parece ter um efeito menos marcante na selecção de bactérias resistentes quando comparada com a suinicultura de produção intensiva. Estas observações podem justificar-se pelo facto de, neste tipo de produção, se consumir uma quantidade de antibióticos mais reduzida e dos animais não estarem confinados a espaços de pequena dimensão que promovem o contacto mais frequente com bactérias fecais. Curiosamente, a maioria dos isolados da suinicultura de exploração extensiva apresentou resistência às tetraciclina, estando eventualmente estes valores associados a uma selecção por moléculas de oxitetraciclina e clortetraciclina surpreendentemente detectadas em algumas das amostras (terra usada por suínos e chorume) desta exploração (comunicação pessoal de Pena A., Lab. Bromatologia, Faculdade Farmácia de Coimbra).

Apesar de terem sido detectados vários genes que conferem resistência às tetraciclina, *tetM* parece ter uma disseminação mais marcante, corroborando outros estudos que o observaram quer em bactérias de Gram positivo quer em bactérias de Gram negativo (Chopra e Roberts, 2001). Uma vez que este gene está frequentemente associado a elementos genéticos móveis conjugativos (plasmídeos e transposões) encontrados em diferentes géneros bacterianos capazes de os trocar entre si (Chopra e Roberts, 2001), não será difícil compreender o sucesso da sua dispersão. Em contrapartida, a disseminação horizontal parece estar muitas vezes envolvida em fenómenos de recombinações genéticas que inviabilizam a expressão dos genes afectados, sendo esta umas das possíveis explicações que justificam a observação de *tetM* e/ou *tetL* em bactérias fenotipicamente sensíveis às tetraciclina. Embora os genes *tet* pesquisados sejam os mais comuns em *Enterococcus* spp, eles não foram encontrados em alguns isolados resistentes, sugerindo que outros tipos de *tet* ou mecanismos de resistência menos frequentes podem estar presentes nestas bactérias. É necessário ainda não esquecer que a quantidade de elementos genéticos associados à resistência às tetraciclina pode ser maior do que a observada, uma vez que o presente estudo não incluiu *Enterococcus* spp no estado viável mas não cultivável e não teve em consideração quer outros géneros bacterianos capazes de albergar tais genes quer disponibilidade de DNA livre com intervenção em eventos genéticos de transmissão horizontal, tal como sugerido por outros estudos (Agerso et al, 2006).

Não são raros os casos em que plasmídeos e transposões transportam para além dos genes que conferem resistência a tetraciclina outros associados a diferentes classes de antibióticos como macrólidos ou aminoglicosídeos (Teuber et al., 2003; Cochetti et al., 2008), promovendo a selecção de bactérias com resistência múltipla e contribuindo para a complexidade da epidemiologia da resistência aos antibióticos. Este problema é agravado quando tais microrganismos estão associados a amostras não confinadas às fronteiras das suiniculturas, como o esterco que é posteriormente usado em agricultura como fertilizante natural.

Estes e outros resultados semelhantes de um estudo do nosso grupo em isolados oriundos de frangos para consumo humano (Novais et al., 2005), reforçam a ideia de que os humanos saudáveis estão em constante exposição a bactérias resistentes a antibióticos através da cadeia alimentar, contacto directo com os animais ou ambiente. Apesar do esforço na União Europeia em diminuir o consumo de antibióticos no ambiente de produção animal pela abolição dos promotores de crescimento, sendo evidente que esta medida isoladamente não parece ser eficaz na eliminação de tais estirpes. O facto de, no presente estudo, se terem detectado *Enterococcus* spp resistentes a tetraciclina nas rações que ainda se encontravam, dentro do recipiente original, sugere que estas bactérias podem ser continuamente introduzidas nas explorações. Desta forma, são imprescindíveis estudos mais alargados que incluam uma avaliação multidimensional de possíveis mecanismos envolvidos na selecção/disseminação de bactérias resistentes.

tes aos antibióticos que terão que ser adaptados à epidemiologia local de cada área geográfica e, adicionalmente, monitorizar, em períodos regulares, o impacto das explorações animais no ambiente.

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP FM, Agerso Y, Gerner-Smidt P, Madsen M, Jensen LB. (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. *In: Diagnostic Microbiology Infectious Diseases* 37(2), Junho, pp.127-137.
- AARESTRUP FM, Seyfarth AM, Emborg HD, Pedersen K, Hendriksen RS, 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. *In: Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 45(7), Julho, pp. 2054-2059.
- AGERSØ Y, Wulff G, Vaclavik E, Halling-Sørensen B, Jensen LB. (2006). Effect of tetracycline residues in pig manure slurry on tetracycline-resistant bacteria and resistance gene *tet(M)* in soil microcosms. *In: Environment International*, 32(7), Setembro, pp.876-882.
- 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*. *In: Journal of Clinical Microbiology*, 44(4), Abril, pp. 1567 – 1570.
- BOERLIN P, Wissing A, Aarestrup FM, Frey J, Nicolet J. (2001). Antimicrobial growth promoter ban and resistance to macrolides and vancomycin in enterococci from pigs. *In: Journal Clinical Microbiology*. 39(11), Novembro, pp. 4193-4195.
- CASEWELL M, Friis C, Marco E, McMullin P, Phillips I. (2003). The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *In: Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 52(2), Agosto, pp. 159-161.
- CHEE-SANFORD JC, Aminov RI, Krapac IJ, Garrigues-Jeanjean N, Mackie RI. (2001). Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities. *In: Applied Environmental Microbiology*. 67(4), Abril, pp.1494-1502.
- CHOPRA I, Roberts M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *In: Microbiology Molecular Biology Reviews* 65(2), Junho, pp. 232-260.
- 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.
- COCHETTI I, Tili E, Mingoia M, Valardo PE, Montanari MP. (2008). *erm(B)*-carrying elements in tetracycline-resistant pneumococci and correspondence between Tn1545 and Tn6003. *In: Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 52(4), Abril, pp. 1285-1290.
- DANISH Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme. (2006). DANMAP 2006— *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 SM, Thal LA, Hershberger E, Perri MB, Chow JW, Bartlett P, Jones R, Joyce K, Rossiter S, Gay K, Johnson J, Mackinson C, Debess E, Madden J, Angulo F, Zervos MJ. (2003). Molecular characterization of gentamicin-resistant Enterococci in the United States: evidence of spread from animals to humans through food. *In: Journal Clinical Microbiology* 41(3), Março, pp. 1109-1113.
- FACKLAM R., D. Collins. (1989). Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *In: Journal Clinical Microbiology*, 27(4), Abril, pp. 731-734.
- GIBBS SG, Green CF, Tarwater PM, Mota LC, Mena KD, Scarpino PV. (2006). Isolation of antibiotic-resistant bacteria from the air plume downwind of a swine confined or concentrated animal feeding operation. *In: Environ Health Perspectives*, 114(7), Julho, pp. 1032-1037.

- HEUER OE, Pedersen K, Jensen LB, Madsen M, Olsen JE. (2002). Persistence of vancomycin-resistant enterococci (VRE) in broiler houses after the avoparcin ban. *In: Microbial Drug Resistance*. 8(4), Dezembro, pp. 355-361.
- INFARMED. (2007). Relatório do Departamento de Medicamentos Veterinários - O Medicamento Veterinário Farmacológico. Abordagem Analítica. Lisboa, INFARMED.
- JOHNSEN PJ, Østerhus JI, Sletvold H, Sørum M, Kruse H, Nielsen K, Simonsen GS, Sundsfjord A. (2005). Persistence of animal and human glycopeptide-resistant enterococci on two Norwegian poultry farms formerly exposed to avoparcin is associated with a widespread plasmid-mediated *vanA* element within a polyclonal *Enterococcus faecium* population. *In: Applied Environmental Microbiology*, 71(1), Janeiro, pp. 159-168.
- KATSUNUMA Y, Hanazumi M, Fujisaki H, Minato H, Kataoka Y, Sawada T, Hashimoto Y, Yonemochi C. (2008). Comparison of pulsed-field gel electrophoresis patterns of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* and enterococci isolates from the feces of livestock and livestock farmers in Japan. *In: Journal General Applied Microbiology*, 54(1), Fevereiro, pp. 39-50.
- KOIKE S, Krapac IG, Oliver HD, Yannarell AC, Chee-Sanford JC, Aminov RI, Mackie RI. (2007). Monitoring and source tracking of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater adjacent to swine production facilities over a 3-year period. *In: Applied Environmental Microbiology*, 73(15), Agosto, pp. 4813-4823.
- NOVAIS C, Coque TM, Costa MJ, Sousa JC, Baquero F, Peixe LV. (2005). High occurrence and persistence of antibiotic-resistant enterococci in poultry food samples in Portugal. *In: Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 56(6), Dezembro, pp. 1139-1143.
- PETERS J, Mac K, Wichmann-Schauer H, Klein G, Ellerbroek L. (2003). Species distribution and antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from food of animal origin in Germany. *In: International Journal Food Microbiology*, 88(2-3), Dezembro, pp. 311-314.
- PHILLIPS I, Casewell M, Cox T, De Groot B, Friis C, Jones R, Nightingale C, Preston R, Waddell J. (2004). Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *In: Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 53(1), Janeiro, pp. 28-52.
- POETA P, Costa D, Rodrigues J, Torres C. (2006). Antimicrobial resistance and the mechanisms implicated in faecal enterococci from healthy humans, poultry and pets in Portugal. *In: International Journal Antimicrobial Agents*. 27(2), Fevereiro, pp. 131-137.
- SAPKOTA AR, Curriero FC, Gibson KE, Schwab KJ. (2007). Antibiotic-resistant enterococci and fecal indicators in surface water and groundwater impacted by a concentrated Swine feeding operation. *In: Environment Health Perspectives*, 115(7), Julho, pp. 1040-1045.
- SATAKE, S., Clark, N., Rimland, D., Nolte, F. e Tenover. (1997) Detection of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples by PCR, *In: Journal of Clinical Microbiology*, 35(9), Setembro, pp. 2325 – 2330.
- TEUBER M, Schwarz F, Perreten V. (2003). Molecular structure and evolution of the conjugative multiresistance plasmid pRE25 of *Enterococcus faecalis* isolated from a raw-fermented sausage. *In: International Journal Food Microbiology*, 88(2-3), Dezembro, pp. 325-329.
- WEGENER HC. (2003). Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *In: Current Opinion Microbiology*, 6(5), Outubro, pp. 439-445.