

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *Enterococcus* sp. ISOLADOS DE
CARÇAÇAS SUÍNAS NA ETAPA DE PRÉ-RESFRIAMENTO**

THAIS DE CAMPOS

PORTO ALEGRE

2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *Enterococcus* sp. ISOLADOS DE
CARÇAÇAS SUÍNAS NA ETAPA DE PRÉ-RESFRIAMENTO**

Autora: Thais de Campos^{*}

**Dissertação apresentada como requisito
para obtenção do grau de Mestre em
Ciências Veterinárias, especialidade na área
de Bacteriologia Aplicada.**

**Orientadora: Dra. Marisa Ribeiro de Itapema
Cardoso**

PORTO ALEGRE

2013

^{*} Médica Veterinária

Campos, Thais de
Resistência antimicrobiana de Enterococcus sp.
isolados de carcaças suínas na etapa de pré-
resfriamento / Thais de Campos. -- 2013.
87 f.

Orientadora: Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,
Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Suínos. 2. Resistência antimicrobiana. 3.
Enterococcus. I. Cardoso, Marisa Ribeiro de Itapema
, orient. II. Título.

Thais de Campos

Resistência antimicrobiana de *Enterococcus* sp. isolados de carcaças suínas na etapa de pré-resfriamento

Aprovado em 12 de março de 2013.

APROVADO POR

Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso
Orientadora e Presidente da Comissão

APROVADO POR

Dr. David Emílio dos Santos Neves de Barcellos
Membro da Comissão

APROVADO POR

Dra. Gertrudes Corção
Membro da Comissão

APROVADO POR

Dra. Jalusa Deon Kich
Membro da Comissão

*“Aos meus pais, Luiz e Rosi,
razão maior de minha existência e
exemplos de amor ...”*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, razão de tudo o que somos e fazemos, por estar sempre ao meu lado.

A Marisa Cardoso, pela orientação, ensinamentos, amizade e paciência.

Aos meus pais, Luiz e Rosi, e meus irmãos, Leonardo e Luiz Felipe, pelo amor incondicional, incentivo, apoio constante e carinho fundamentais em minha vida.

Ao meu noivo, Maiquel, pelo amor, incentivo, apoio incondicional, companheirismo e suporte emocional, além dos “sacrifícios e concessões”.

Aos colegas e amigos do laboratório de Medicina Veterinária Preventiva: Caroline Pissetti, Daniel Paim, Débora Pellegrini, Lilian Kolling, Andreia Ferronato, Gabriela Werlang, Vanessa Dias, Graciela Volz, Héber Hein, Cristiane Moraes, Priscila Guerra, Tatiane Vieira, Waldemir Santiago, Mônica Maciel, Everton Juffo, Jane Both, Juliana Velasco e Joaquim Paredes, pela amizade, carinho e companheirismo.

Resistência antimicrobiana de *Enterococcus* sp. isolados de carcaças suínas na etapa de pré-resfriamento

Autora: Thais de Campos

Orientadora: Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

RESUMO

A presença de bactérias resistentes a antimicrobianos vem sendo monitorada de forma cada vez mais frequente em produtos de origem animal, com o intuito de evitar a disseminação dessas cepas para humanos via cadeia alimentar. O gênero *Enterococcus* encontra-se entre os patógenos mais relevantes nas infecções hospitalares em humanos e tem capacidade de adquirir resistência a diversos antimicrobianos. No presente estudo foi avaliada a frequência de isolamento e a resistência antimicrobiana de *Enterococcus* sp. de carcaças suínas na etapa de pré-resfriamento, em três matadouros-frigoríficos localizados no estado de Santa Catarina. Dois ciclos de amostragem foram conduzidos em cada estabelecimento resultando em 252 suabes de carcaças. A partir dessas amostras, foram obtidos 240 isolados de *Enterococcus* sp. identificados por testes fenotípicos e pela detecção do gene *tuf* e *ddl*_{*E.faecalis*} pela técnica de reação em cadeia da polimerase. Todos os isolados de *Enterococcus* sp. foram testados quanto à resistência a antimicrobianos pela técnica de difusão em ágar. A espécie mais prevalente foi *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), presente em 90,83% das amostras de carcaça. Foi observada resistência à tetraciclina (42,5%), eritromicina (26,7%), estreptomicina (20,4%), ciprofloxacina (13,8%), cloranfenicol (12,1%) e a gentamicina (10,4%). Não foram encontrados isolados resistentes à vancomicina, teicoplanina e ampicilina. Os isolados que apresentaram perfil intermediário e resistente aos antimicrobianos ciprofloxacina e eritromicina, no teste de disco-difusão, foram submetidos à determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Em relação à ciprofloxacina, das 25 cepas com resistência intermediária no teste de disco-difusão, todas apresentaram CIM na concentração limítrofe (1,56 µg/mL), entre a sensibilidade e resistência, enquanto nas 74 cepas intermediárias frente à eritromicina, apenas duas apresentaram valor limítrofe máximo (4 µg/mL). Conclui-se que o gênero

Enterococcus está presente em carcaças suínas na etapa de pré-resfriamento, sendo a espécie *E. faecalis* a mais encontrada. Apesar de existirem isolados resistentes a antimicrobianos usados na terapêutica humana, os resultados indicam que isolados resistentes a vancomicina, teicoplanina e ampicilina não estão presentes em carcaças suínas nos abatedouros estudados.

Palavras-chave: suínos, resistência antimicrobiana, *Enterococcus*

Antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolated from swine carcasses at the pre-chill stage

Author: Thais de Campos

Advisor: Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

ABSTRACT

The presence of antimicrobial-resistant bacteria has been increasingly monitored in animal products in order to prevent the spread of these strains to humans through the food chain. The genus *Enterococcus* is among the most important pathogens in hospital infections in humans and is able to acquire resistance to several antibiotics. In the current study, the frequency of isolation and antimicrobial resistance of *Enterococcus* sp. from swine carcasses at the pre-chill stage in three slaughterhouses located in the state of Santa Catarina were evaluated. Two sampling cycles were performed at each establishment and 252 carcass swabs were taken. A total of 240 strains of *Enterococcus* sp. were identified by phenotypic testing and by PCR detection of *tuf* and *ddl* genes. All *Enterococcus* isolates were tested for resistance against antimicrobials by the agar diffusion technique. The most prevalent species was *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), present in 90.83% of the carcass samples. Tetracycline (42.5%), erythromycin (26.7%), streptomycin (20.4%), ciprofloxacin (13.8%), chloramphenicol (12.1%) and gentamicin (10.4%) resistance was observed. No isolates were found resistant to vancomycin, teicoplanin and ampicillin. The isolates with intermediate and resistant profile to antimicrobials ciprofloxacin and erythromycin were further subjected to minimum inhibitory concentration (MIC) determination. Regarding ciprofloxacin, all the 25 strains with intermediary resistance profile in the disk diffusion test presented MIC at the limit concentration (1.56µg/mL) between sensitivity and resistance, while from 74 intermediary resistant strains against erythromycin only two presented MIC at the limit concentration (4 µg/mL). It is concluded that the genus *Enterococcus* is present in swine carcasses during the pre-chill stage and the species *E. faecalis* is the most prevalent. Although resistance against antimicrobials used for the human treatment has been found, the results

indicate that isolates resistant to vancomycin, teicoplanin and ampicillin are not present on pig carcasses from those abattoirs.

Keywords: swine, pork, antimicrobial resistance, *Enterococcus*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Contagem de <i>Enterococcus</i> sp. em carcaças amostradas na etapa de pré-resfriamento em três matadouros-frigoríficos (A, B, C) de Santa Catarina, 2010-2011.....	53
Tabela 2 – Frequência de resistência a antimicrobianos de <i>Enterococcus</i> isolados de carcaças na etapa de pré-resfriamento, em três matadouros-frigoríficos (A, B, C) de Santa Catarina, 2010-2011	55
Tabela 3 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) de isolados de <i>Enterococcus</i> sp. intermediários e resistentes á ciprofloxacina e eritromicina no teste de disco-difusão	56

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. Gênero <i>Enterococcus</i>	15
2.2. Enterococos nos Alimentos	18
2.3. Importância clínica de <i>Enterococcus</i>	20
2.4. Resistência a antimicrobianos	23
2.5. <i>Enterococcus</i> spp. e a resistência a antimicrobianos.....	28
2.5.1. Resistência aos glicopeptídeos	32
2.5.2. Resistência aos β-lactâmicos	33
2.5.3. Resistência aos aminoglicosídeos	34
2.5.4. Resistência ao cloranfenicol	37
2.5.5. Resistência às estreptograminas.....	37
2.5.6. Resistência aos macrolídeos	38
2.5.7. Resistência às fluoroquinolonas	39
2.5.8. Resistência à tetraciclina.....	40
2.6. O uso de antimicrobianos em suínos	41
3. ARTIGO - Resistência de <i>Enterococcus</i> sp. isolados de carcaças suínas na etapa de pré-resfriamento frente á antimicrobianos	44
RESUMO	44
ABSTRACT	45
INTRODUÇÃO	46
MATERIAIS E MÉTODOS	47
<i>Delineamento experimental</i>	47
<i>Colheita das amostras</i>	48
<i>Quantificação e isolamento de Enterococcus</i>	48
<i>Confirmação Molecular do gênero Enterococcus sp. e da espécie Enterococcus faecalis</i>	49
<i>Teste de sensibilidade a antimicrobianos em isolados de Enterococcus</i>	50
<i>Análise estatística</i>	51

RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
CONCLUSÃO.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
4. CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1. INTRODUÇÃO

A carne suína consolidou-se como a mais importante fonte de proteína animal no mundo após 1978 e a produção mundial cresceu numa taxa de 3,1% nos últimos 46 anos. A produção suína mundial encontra-se em torno de 102 milhões de toneladas por ano, concentrando-se, em sua maior parte, na China, União Europeia e Estados Unidos. Entre os alimentos de origem animal, a produção de suínos no Brasil, ocupa o quarto lugar no mundo, produzindo 3,36 mil toneladas de carne suína e, os estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Paraná destacam-se como principais produtores de suínos do país. Em 2012, o Brasil exportou cerca de 580 mil toneladas de carne suína, cujos principais destinos foram países como Ucrânia, Rússia e Hong Kong (ABIPECS, 2012).

Dados da Organização de Alimentos e Agricultura das Nações Unidas (FAO) revelam que a carne mais consumida no mundo é a suína, representando 39% do total do consumo mundial de proteína animal. Sendo que, o maior consumo per capita anual de carne suína é verificado entre os países da União Europeia e, enquanto na Áustria, o consumo anual médio da carne suína é de 76 kg per capita, no Brasil o consumo é de 15,1Kg per capita/ano (ABIPECS, 2012).

A carne suína, assim como produtos cárneos processados, podem veicular micro-organismos patogênicos ao homem. Entre os patógenos que são reconhecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como os mais significativos, em termos de impacto à saúde das populações, estão incluídos as salmonelas, os enterococos e os coliformes (ANVISA, 2008).

Os micro-organismos pertencentes ao gênero *Enterococcus* não possuem potentes fatores de virulência encontrados em outras bactérias Gram-positivas patogênicas, como *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, no entanto, possuem um arsenal de características diferenciais, que contribuem para sua virulência e os tornam efetivos patógenos oportunistas, com grande expressão e representatividade tanto no meio médico, veterinário quanto em alimentos (GILMORE, 2002; GIRAFFA, 2002). *Enterococcus* sp. são micro-organismos emergentes, que apresentam importante relevância

clínica entre os patógenos comumente envolvidos nas infecções hospitalares devido à capacidade em expressar resistência a vários antimicrobianos e, a habilidade em colonizar diferentes habitats com condições ambientais adversas. A possibilidade de que esses micro-organismos resistentes a antimicrobianos sejam veiculados via cadeia alimentar os coloca como objeto de grande atenção da saúde pública (BERTRAND et al., 2000; DZIDIC et al., 2008).

O processamento de produtos cárneos tem início com os procedimentos de abate dos animais, iniciando-se nesta fase, portanto, a contaminação bacteriana inerente ao processo que mesmo quando moderada, deve ser considerada prejudicial, uma vez que, proporcionam um meio de cultivo ideal ao crescimento microbiano e, alguns micro-organismos quando presentes no alimento “*in natura*” são capazes de se multiplicar durante alguns dos processos de conservação do alimento, tais como pasteurização, fermentação e refrigeração (GIRAFFA et al., 2002). De acordo com Borch et al (1996) as principais fontes de contaminação durante o abate de suínos estão associadas às origens fecais e ambientais.

O elevado uso – terapêutico, metafilático, profilático e aditivo zootécnico – de antimicrobianos na produção animal contribuí para o aumento dos índices de resistência através da pressão de seleção exercida sobre micro-organismos comensais e patogênicos (SCHWARZ & CHASLUS-DANCLA, 2001; TENOVER, 2001). Os *Enterococcus* são intrinsecamente resistentes a uma gama de antimicrobianos de uso terapêutico (ASLAM et al., 2010; CULEBRAS et al., 2010; ZOU et al., 2011) e, apresentam capacidade em adquirir, transferir e disseminar seus genes de resistência (FRACALANZZA et al., 2007).

Enterococcus resistentes aos antimicrobianos já foram isolados em uma série de alimentos, de origem animal, que acabam por sua vez servindo como reservatórios destes micro-organismos resistentes (FRANZ et al., 2001; DZIDIC et al., 2008; RIBOLDI et al., 2008). De acordo com Vignaroli et al (2011) os *Enterococcus* resistentes à antimicrobianos quando ingeridos, tem a capacidade de transferir seus genes de resistência a microbiota endógena dos humanos, bem como para bactérias transitórias, incluindo patógenos e, sugerem a carne como ambiente adequado para uma ampla faixa de transferência da resistência antimicrobiana “*in vivo*”.

A competitividade no mercado e a valorização mundial da carne suína exigem que o conceito de qualidade e inocuidade de alimentos seja observado. Sendo assim, o monitoramento da resistência frente a antimicrobianos em bactérias patogênicas ou oportunistas é essencial para avaliar o risco de transferência de cepas ou genes de resistência para humanos por meio da cadeia produtiva de alimentos.

Diante do exposto, o trabalho teve por objetivo determinar a frequência de isolamento de *Enterococcus* sp. em carcaças de suínos, na etapa de pré-resfriamento e avaliar a resistência antimicrobiana dos isolados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Gênero *Enterococcus*

Enterococcus spp. constituem um diverso, complexo e importante grupo de micro-organismos amplamente distribuído na natureza, devido à capacidade de se desenvolver e sobreviver em condições adversas (GIRAFFA, 2002; VALENZUELA, 2009). O principal habitat desse micro-organismo parece ser o trato gastrointestinal de humanos e animais, onde estes representam uma parcela significativa da microbiota intestinal (AARESTRUP et al., 2002; CASSENEGO et al., 2010), variando em abundância (10^2 a 10^8 /g de conteúdo digestivo) de indivíduo para indivíduo e ao longo do trato gastrointestinal (OGIER & SERROR, 2008). Podem ser comumente encontrados no solo, água, alimentos e animais (TEIXEIRA & FACKALAM, 2003; HAN et al., 2011). Embora algumas linhagens sejam utilizadas na manufatura de alimentos, muitas cepas podem ser patogênicas, causando infecções tanto em humanos quanto em animais (GIRAFFA, 2002, SCOT et al., 2002, HENRIQUE, 2007). Pelo fato de ser encontrado em uma variedade de ambientes, o gênero tem sido utilizado como indicador de contaminação fecal tanto na água quanto em alimentos (AARESTRUP et al., 2002; CASAL et al., 2009; LÓPEZ et al., 2009; RIBOLDI et al., 2009).

O nome enterococo originou-se da palavra francesa *entérocoque*, utilizada pela primeira vez por Thiercilin em 1899, em publicação francesa, com o intuito de enfatizar a origem intestinal desta bactéria Gram-positiva (MURRAY, 1990). Inicialmente este gênero foi classificado como *Streptococcus* do grupo D de Lancefield, mas estudos de hibridização DNA-DNA e DNA-rRNA, realizados na década de 1980 mostraram diferenças genotípicas entre enterococos e estreptococos. Em 1984, Schleifer & Kilpper-Bälz demonstraram claramente que essas bactérias deveriam ser classificadas separadamente, sugerindo a criação do gênero *Enterococcus* (MURRAY, 1990; OGIER & SERROR, 2008; EUZÉBY, 2010).

Atualmente, são conhecidas 41 espécies pertencentes ao grupo *Enterococcus*: *E. aquimarinus*, *E. avium*, *E. asini*, *E. caccae*, *E. camelliae*, *E. canintestini*, *E. canis*, *E. casseliflavus*, *E. cecoum*, *E. columbae*, *E. devriesei*, *E. díspar*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. gilvus*, *E. haemopeeroxidus*, *E. hermannienseis*, *E. hiraе*, *E. italicus*, *E. malodocatus*, *E. maravunsi*, *E. mundtii*, *E. pallens*, *E. phoeniculicola*, *E. porcini*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus*, *E. ratti*, *E. saccharominimus*, *E. sacharolyticus*, *E. seriolicida*, *E. sileacus*, *E. solitarius*, *E. sulfurius*, *E. termitis*, *E. thailandicus*, *E. vellorium* e *E. viikkienseis* (FACKLAM et al, 2007; SHEWMAKER et al., 2011; EUZÉBY, 2012) e, de acordo com Naser et al (2005), as espécies *E. faecalis* e *E. faecium* são as mais comuns. *E. faecalis* é a espécie dominante no ambiente clínico, estando envolvida em aproximadamente 90 % das infecções enterocócicas em humanos; enquanto que *E. faecium* é responsável por menos de 5% das infecções (TAVARES, 2000; ANTONELLO et al., 2010). O fato de *E. faecalis* estar comumente envolvido nos casos de infecção enterocócica em humanos está relacionado aos fatores de virulência associados à espécie (KLEIN, 2003; FISCHER & PHILLIPS, 2009).

Enterococos são componentes da microbiota intestinal, podendo ser encontrados em quase todos os animais, desde insetos a humanos. Esta bactéria pode ser isolada de vegetações e superfícies aquáticas que tenham sido contaminadas por excrementos de animais ou por esgoto não tratado (GILMORE, 1994). A população de enterococos nas fezes de humanos é estimada em aproximadamente 10^8 Unidades Formadoras de Colônia (UFC/g) (RICE et al., 1995). As espécies *E. faecalis* e *E. faecium* são comumente encontradas no TGI de humanos e animais, enquanto *E. mundtii* e *E. casseliflavus* são comuns em plantas e vegetais, podendo ocorrer de forma transitória no intestino de humanos e animais (DEVRISE et al, 2006). Já *E. durans*, *E. avium*, *E. raffinosus* podem ser encontrados em alimentos (CASSENEGO et al, 2011). A diversidade dos enterococos está diretamente relacionada aos ambientes onde estes podem ser encontrados (AARESTRUP et al, 2002).

O gênero *Enterococcus* consiste de cocos Gram-positivos, que podem se apresentar na forma de cadeias curtas, aos pares ou como células únicas (RIZZOTI et al, 2009; CULEBRAS et al., 2010; ZOU et al 2011). São

anaeróbios facultativos e tipicamente distinguíveis dos demais cocos Gram-positivos pela sua capacidade de crescimento em uma ampla faixa de temperatura, entre 10°C e 45°C, e por suportar variações de pH, sendo a temperatura ótima de crescimento 37°C em pH 9.6. Todos os representantes deste gênero apresentam crescimento em meio contendo 6,5% de cloreto de sódio e na presença de 40% de sais biliares, produzem a enzima leucina-aminopeptidase (LAP) e, sua maioria hidrolisa o substrato pirrolidônio- β -naftilamida (PYR). Não possuem enzima citocrômica e, portanto, são catalase-negativo, salvo algumas cepas que podem produzir uma pseudocatalase (MURRAY, 1990; KONEMAN et al, 2001; FACKLAM et al, 2002; CÔRREA et al., 2005). Pertencem ao grupo de organismos conhecidos como bactérias ácidas lácticas (BAL) produtoras de bacteriocinas (FISHER & PHILLIPS, 2009).

A identificação presuntiva deste gênero durante muitos anos foi baseada na morfologia conforme coloração de Gram, capacidade de crescimento na presença da bile, hidrólise da esculina e crescimento em meio contendo 6,5% de NaCl. Atualmente, esta identificação foi complementada pela adição de outros testes bioquímicos, tais como produção da PYR, suscetibilidade a vancomicina, teste da bile-esculina, assim como crescimento em 10°C e 45°C, pois cepas do gênero *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus* apresentam reações positivas frente aos testes utilizados anteriormente e podem ser isolados de infecções humanas (FACKLAM, SHAM, TEIXEIRA, 1999).

A identificação das espécies pertencentes ao gênero *Enterococcus*, a partir de testes bioquímicos convencionais foi inicialmente proposta por Facklam & Collins (1989), modificada por Facklam & Sham (1995) e atualizada por Teixeira e Facklam (2003). A diferenciação das espécies é feita a partir da avaliação das características fenotípicas, baseada principalmente em três provas bioquímicas que incluem fermentação do manitol, do sorbitol e dehidrolação da arginina (TEIXEIRA & FACKLAM, 2003). No entanto, identificar espécies de *Enterococcus* é bastante complexo, uma vez que muitos isolados, especialmente os de origem ambiental não são prontamente identificados a partir de suas características fenotípicas. A dificuldade de identificar as espécies usando apenas provas bioquímicas ocorre devido à heterogeneidade observada no gênero, o que acaba por não proporcionar resolução satisfatória. Métodos fenotípicos são, muitas vezes, incapazes de

detectar alterações no genoma bacteriano, que podem ocorrer em uma mesma espécie via aquisição de plasmídeos ou mutações genéticas espontâneas, sem que haja alteração do fenótipo (ON & BAGGESEN 1997; DEVRIFE, 2006; COSTA et al., 2009). Sendo assim, os métodos moleculares tornam-se essenciais na confirmação dos enterococos, e a caracterização dos genes 16S e 23S rRNA pode ser utilizada com sucesso nas diferentes espécies de *Enterococcus* (DEVRIESE et al., 2006). Porém, *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* apresentam 99,8% de similaridade no seu 16 S rRNA (OGIER & SERROR, 2008) assim, métodos alternativos como a amplificação por PCR dos genes D-Alanina-D-Alanina Ligase (*ddl*) e de resistência à vancomicina (*van*) (DUKTA-MALEN et al., 1995), amplificação de espaços Inter gênicos de rRNA (NAIMI et al., 1997), sequenciamento dos genes *ddl* (OZAWA et al., 2000), gene da chaperonina 60 (*cpn60*) (GOH et al., 2000), gene da enzima de conversão da angiotensina (*ace*) (DUH et al., 2001), gene da superóxido desmutase (*sodA*) (JACKSON et al., 2004), gene da ATP sintetase (*atpA*) (NASER et al., 2005), subunidade alfa tRNA fenilalanila sintetase (*pheS*), subunidade alfa RNA polimerase (*rpoA*) (NASER et al., 2005b) têm sido propostos. Já na diferenciação intra-espécies tem se utilizado técnicas como fingerprinting de proteínas, amplificação randômica de DNA polimórfico (RAPD-PCR), gel de eletroforese de campo pulsado (PFGE) e análises com enzimas de restrição (KLEIN, 2003; FORTINA, 2007). A identificação correta é necessária a fim de controlar as espécies que podem estar causando doença, auxiliando principalmente em um tratamento eficaz (DUTKA-MALEN et al., 1995; KAK & CHOW, 2002; JACKSON et al., 2004).

2.2. Enterococos nos Alimentos

A distribuição de enterococos na natureza indica seu potencial de adaptação e de crescimento sob diversas condições ambientais sendo comumente encontrados como contaminantes naturais de alimentos (POETA et al., 2006). Esta capacidade de adaptação a diferentes substratos e condições de crescimento tais como pH extremos, salinidade e temperatura, incluindo resistência à temperatura de pasteurização de algumas espécies, contribui para que sejam encontrados em qualquer alimento de origem animal, alimentos

processados crus, ou que tenham sido submetidos ao tratamento térmico, sendo portanto, encontrados em qualquer ponto do fluxograma de produção de diversos tipos de alimentos (FRANZ et al., 2003; ANVISA, 2008).

Além disso, os enterococos tem apresentando significativa importância na tecnologia do processamento de alimentos, uma vez que se caracterizam como linhagens homofermentativas produtoras de ácido lático, que, além de conferir sabor ácido característico de produtos fermentados, nos quais desenvolvem importante papel no processo de maturação e enriquecimento do sabor, produz características organolépticas únicas (FRANZ et al., 2003; GIRRAFA et al., 2003; GAMA, 2008). Adicionalmente, as bactérias ácido lácticas podem produzir substâncias antimicrobianas, como bacteriocinas (entorricinas), conferindo aos produtos maturados melhor qualidade sanitária (FOULQUIÉ-MORENO, 2003; ANVISA, 2008, GAMA, 2008). Em alguns produtos, principalmente os lácteos, os enterococos podem ser utilizados como culturas “*starters*” ou iniciadoras e probióticas (SCHIMIDT, 2009; MEDEIROS, 2011). Essas características demonstram a capacidade destes micro-organismos atuarem de forma positiva, contribuindo no desenvolvimento de aroma e sabor característico, levando a uma qualidade diferenciada aos produtos (FRANZ et al., 2003). Entretanto, a seleção de cepas de enterococos para serem utilizados no processamento de alimentos tem sido uma difícil tarefa devido ao risco potencial que esses micro-organismos oferecem à saúde humana (GIRAFFA, 2003; FOULQUIÉ-MORENO et al., 2006; POETA et al, 2006). Os enterococos resistentes a antimicrobianos encontram-se amplamente distribuídos nos alimentos e tem sido detectados em carnes e produtos derivados, leite, produtos lácteos dentre outros produtos destinados ao consumo humano (FOLQUIÉ-MORENO et al., 2006).

Medeiros (2011) ressalta que o gênero *Enterococcus* também está associado à deterioração de alimentos, principalmente os cárneos, e o fato do *Enterococcus* estar presente no trato gastrointestinal dos animais pode torná-lo um potencial contaminante durante o processo de abate. Em produtos lácteos, a presença de *Enterococcus* é indicativa de condições higiênicas inadequadas tanto na produção, quanto no processamento, sendo que as fontes de contaminação podem ser diversas: água, equipamentos de processamento e tanques de estocagem que tiveram contato com fezes (OGIER et al., 2008). O

uso de *Enterococcus* como indicador de higiene e contaminação fecal é atribuído ao fato deste gênero ser mais tolerante à refrigeração quando comparado a *Escherichia coli* e demais coliformes, pois permanecem viáveis mais tempo na refrigeração de carcaças (INGHAM & SCHMIDT, 2000), no entanto seu uso como indicador de contaminação fecal é limitado, pois apresentam alta resistência ao calor, sobrevivem no ambiente extra-intestinal e, ao contrário do grupo de coliformes totais e fecais, não existe nível estabelecido para relacionar a sua presença e a qualidade higiênica em um determinado produto (VAIL et al., 2003).

Estudos sobre a cadeia epidemiológica têm mostrado que alimentos, principalmente de origem animal, comercializados no mundo inteiro, podem ser reservatórios de enterococos resistentes e, desta forma, acabam contribuindo na propagação da resistência antimicrobiana à população humana via cadeia alimentar (BERTRAND et al. 2000; AAESTRUP et al., 2007; DZIDIC et al., 2008; JENSEN et al., 2011).

2.3. Importância clínica de *Enterococcus*

As infecções hospitalares são consideradas um problema de saúde pública que acomete mais de 15% dos pacientes internados e tem se agravado com o aumento da resistência bacteriana (SILVA, 2003; OLIVEIRA & BETTCHER, 2010). *Enterococcus* spp. fazem parte da microbiota do trato gastrointestinal e geniturinário de humanos e animais, no entanto têm sido reconhecidos como patógenos em potencial para humanos desde a virada do século XX (CAUWERTS et al., 2007). Em 1912, esse micro-organismo começou a ser associado a uma série de infecções; e, a partir de 1920, vários relatos sobre sua patogenicidade passaram a ser publicados. Entretanto, o primeiro relato sobre a presença deste micro-organismo em pacientes com enterites, apendicites e meningites já havia sido feita por Thiercelin em 1899 (*apud* MURRAY, 1990; ANVISA, 2008).

Estudos recentes têm documentado a emergência dos enterococos como uma das principais causas de infecção nosocomiais, sendo que as principais síndromes clínicas associadas a estes micro-organismos são as endocardites, bacteremias, infecções do trato urinário, sepses neonatais e as

infecções de feridas cirúrgicas e crônicas como as úlceras por pressão (ZIRAKZADEH et al., 2006; CAUWERTS et al., 2007, DESHPANDE et al., 2007; HAYDEN et al., 2008; VALENZUELA et al., 2010; LARSEN et al., 2011; FALCI & DALAROSA, 2012). Nas infecções enterocócicas, geralmente se destacam as espécies *E. faecalis* (80%) e *E. faecium* (20%) ; outras espécies como *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* ou *E. raffinus* são menos frequentes (GAMA, 2008). Em estudo realizado no Brasil por Antonello et al. (2010), há descrição de um caso de meningite por *E. gallinarum*, espécie comumente encontrada no trato gastrointestinal de aves e que raramente causa infecção em humanos. De acordo com Werner et al. (2008) *E. faecalis* e *E. faecium* estão entre os quatro patógenos mais isolados em infecções hospitalares em todo mundo e o gênero *Enterococcus* representa a segunda maior causa de infecções hospitalares, tanto nos EUA quanto na Europa (OGIER & SERROR, 2008).

A maior parte das infecções por enterococos origina-se da microbiota normal do paciente, seja a partir de sua translocação através da barreira epitelial do intestino, via intravenosa, abscessos, ou, ainda, a partir de infecções do trato urinário (GAMA, 2008; OGIER & SERROR, 2008). De modo geral, os enterococos causam infecções mais graves em pacientes internados e que estão recebendo terapia antimicrobiana há algum tempo, indivíduos com doenças graves, pacientes imunocomprometidos e idosos (HÖRNER et al., 2005; ABRIOUEL et al., 2008). As infecções enterocócicas estão associadas a uma letalidade que pode chegar a 20 a 30%, representando um grave problema nas instituições de saúde, especialmente pela possibilidade de disseminação a partir de portadores saudáveis e pela escassez de opções terapêuticas eficazes (PANGALLO et al., 2008; BENDER et al., 2010).

O aumento da severidade das infecções causadas por enterococos se dá a partir de vários fatores, mas decorre principalmente devido à múltipla resistência a antimicrobianos que estes micro-organismos apresentam em virtude do uso indiscriminado dos mesmos, ato que contribui com a sua sobrevivência e disseminação no ambiente hospitalar. O emprego de dispositivos que alteram as barreiras físicas de defesa dos seres humanos, como cateteres urinários e intravasculares também contribui para o estabelecimento do micro-organismo. Portanto, a capacidade de sobrevivência

e adaptabilidade dos enterococos em uma diversidade de ambientes deve ser considerada fator-chave no desencadeamento das infecções. No ambiente hospitalar, um fator significativo adicional é que a transmissão pode ocorrer a partir da própria mão dos trabalhadores em saúde e dos equipamentos (VANCANNEYT et al., 2002; FRANZ et al., 2003).

Estudos demonstram que as infecções urinárias são as mais frequentes infecções causadas por enterococos, representando 70% das infecções em humanos; a espécie mais reportada nestes casos é *E. faecalis* responsável por mais de 90% das infecções, seguido por *E. faecium*. Uma possível explicação para esta predominância pode ser a elevada virulência de *E. faecalis* (D'AZEVEDO et al., 2006; BENDER et al., 2010). As infecções intra-abdominais e pélvicas são as mais prevalentes após as urinárias; e a bacteremia constitui o terceiro tipo mais comum de infecção causada por este micro-organismo (ANVISA, 2008).

O aumento do número de pacientes infectados e colonizados por *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE) é um fenômeno mundial (FALCI & DALAROSA, 2012). Os primeiros casos de VRE foram inicialmente relatados no final de 1980 na França e no Reino Unido e, desde então, ocorreu a disseminação por todo o mundo (AARESTRUP et al., 2002, WERNER et al., 2008). O VRE constitui uma preocupação para profissionais da área da saúde em razão da sua crescente incidência (SOUZA et al., 2012). Em estudo recentemente realizado por Falci & Dalarosa (2012), foi observado um aumento significativo no número de casos, tanto de colonização quanto de infecção em diversos hospitais de maior porte no Rio Grande do Sul, caracterizando-se um surto de VRE neste estado. Somente na cidade de Porto Alegre foram detectados 11 casos em 2009 (a partir de julho); 235 casos em 2010; e 254 casos em 2011 (período de janeiro a junho) e, atualmente, a incidência combinada de colonização/infecção é de 3/1000 pacientes hospitalizados. Outro estudo conduzido por Oliveira & Bettecher (2010) em um hospital público, demonstrou que entre 122 pacientes portadores de VRE, 22 (18,04%) desenvolveram infecção hospitalar por VRE. Apesar de terem sido isoladas cinco espécies de VRE, apenas *E. faecalis* (63,6%) e o *E. faecium* (31,8%) foram causadores de infecção cujos sítios foram: trato urinário (72,8%),

corrente sanguínea (9,9%), tecidos moles (9,0%), trato respiratório (4,5%) e feridas cirúrgicas (4,5%).

A alta prevalência de casos envolve resistência não só à vancomicina, mas aos novos antimicrobianos o que torna a terapêutica ainda mais limitada (KOBAYASHI et al., 2010), deste modo as infecções causadas por *Enterococcus* sp. conferem grande ameaça a saúde pública, principalmente pela dificuldade da erradicação das mesmas a partir do uso de antimicrobianos, uma vez que estes micro-organismos podem apresentar elevados níveis de multirresistência (BENDER et al., 2010; VIGNAROLI et al., 2011).

Muito embora a aquisição nosocomial e a subsequente colonização pelos enterococos, especialmente os VREs, sejam enfatizadas entre os indivíduos hospitalizados, esta também ocorre nas comunidades, onde diferentes animais, alimentos e meio ambiente são considerados importantes reservatórios atuando como fontes de disseminação fora dos ambientes hospitalares (AARESTRUP et al., 2001; GAMBAROTTO, 2001).

Enterococcus causam infecções oportunistas em todas as espécies de animais e, está comumente envolvido nas infecções de feridas cirúrgicas, trato urinário, otite em cães e, mastite em bovinos. A espécie *E. faecalis* é a mais comumente isolada a partir de animais domésticos e aves (QUINN, 2011) e, os *E. faecium* resistentes à vancomicina, isolados a partir de animais, conferem importante problema de saúde pública (DANMAP, 2005).

2.4. Resistência a antimicrobianos

Ao longo da história, as doenças infecciosas tem conferido uma grande ameaça à saúde humana e animal. Sendo assim, a introdução de agentes antimicrobianos em meados de 1930 e em 1940 revolucionou a medicina humana pelo fato de reduzir substancialmente as taxas de mortalidade e morbidade das doenças bacterianas (GUARDABASSI & KRUSE, 2010). Paralelamente, a saúde animal, assim como a produtividade, melhorou expressivamente (BOERLIN & WHITE, 2010). No entanto logo foi observado que as bactérias podiam tornar-se resistentes aos antimicrobianos e que esta era uma consequência natural e inevitável da utilização destes agentes antimicrobianos associados ao fato desta exposição selecionar micro-

organismos resistentes (GUARDABASSI & KRUSE, 2010). Nas últimas décadas, o sucesso do tratamento das infecções humanas tem sido ameaçado pela aquisição de resistência bacteriana resultante do uso incorreto e abusivo destas moléculas (DONABEDIAN et al., 2003; ERBAY et al., 2005; JOHNSEN et al., 2005; KATSUNUMA et al., 2008). De acordo com Weese (2006), a resistência aos antimicrobianos pode ser considerada um dos principais problemas em medicina, estando associada ao aumento das taxas de mortalidade e dos custos do tratamento.

A resistência antimicrobiana pode ser definida através de critério genético, microbiológico, bioquímico e clínico. De acordo com o critério microbiológico, uma cepa é considerada resistente quando apresenta “*in vitro*” capacidade de multiplicação em concentrações maiores do que os pontos de corte estabelecidos para as cepas filogeneticamente relacionadas. Já em relação ao critério clínico “*in vivo*” um isolado é considerado resistente quando a terapia antimicrobiana instituída não resulta em sua eliminação. Quando consideramos esse critério, a resistência depende de outros fatores tais como: sítio da infecção, dosagem do antimicrobiano, tempo de tratamento e estado imunológico do hospedeiro (GUARDABASSI & COURVALIN, 2006; BLAHA, 2011).

As bactérias tem desenvolvido vários mecanismos para neutralizar a ação dos agentes antimicrobianos, baseando-se em quatro categorias principais: o antimicrobiano pode ser impedido de atingir seu alvo em razão de sua baixa capacidade de penetração na célula bacteriana; bombas de efluxo, gerais ou específicas, podem expulsar o antimicrobiano das células; o antimicrobiano pode ser inativado por meio de modificação ou degradação, antes ou depois da penetração na célula; e o alvo do antimicrobiano pode ser modificado ou a ativação de uma via alternativa pode suprir o alvo dispensável (ALEKSHUM & LEVY, 2007; BOERLIN & WHITE, 2010).

A resistência aos antimicrobianos pode ser de dois tipos: intrínseca ou adquirida. Sendo que a resistência intrínseca ou natural decorre de um fator inerente estrutural ou funcional associado com a espécie bacteriana, um gênero ou grande grupo e está baseada em genes presentes no cromossomo, que tipicamente não são transferíveis. Já a resistência adquirida é resultante de alterações genéticas no genoma bacteriano e que podem ser consequência de

uma mutação ou por aquisição horizontal de genes exógenos. As bactérias podem adquirir genes de resistência pela captura de DNA (transformação), via bacteriófagos (transdução) ou pela transferência de célula para célula (conjugação), sendo este último mecanismo o mais importante para transferência de genes de resistência devido ao seu vasto espectro de hospedeiros e a localização frequente de genes de resistência em elementos genéticos móveis como plasmídeos e transposons (CETINKAYA et al., 2000, TEIXEIRA & FACKLAM, 2003; GUARDABASSI & KRUSE, 2010).

Os plasmídeos são elementos genéticos que se replicam independentemente do cromossomo e podem ser transferidos entre as bactérias pela conjugação. Já os transposons são elementos genéticos capazes de trocar de lugar no cromossoma de uma bactéria, ou migrarem entre o cromossoma e o plasmídeo, mas não apresentam capacidade de replicação autônoma e não são transferidos entre as bactérias se não estiverem inseridos nos plasmídeos. Os cassetes gênicos são formados pela integração de genes no integron e são elementos geneticamente imóveis que acumulam e expressam genes de resistência sendo que, estes são comumente encontrados em plasmídeos e transposons (SCHWARZ et al., 2006).

É importante destacar que a resistência a certos agentes antimicrobianos pode ser selecionada mesmo quando se utiliza outro agente, pela seleção cruzada e pela co-seleção. A seleção cruzada refere-se à presença de um único gene de resistência ou mutação conferindo resistência a dois ou mais grupos de antimicrobianos, que em geral pertencem à mesma classe antimicrobiana. Já a co-seleção deve-se a coexistência de genes distintos ou mutações na mesma cepa bacteriana conferindo resistência a diferentes classes de antimicrobianos (GUARDABASSI & KRUSE, 2010).

Bactérias ambientais e bactérias comensais não patogênicas podem desempenhar importante papel como reservatórios ou veículos de genes de resistência entre os patógenos (VAN DEN BOGAARD et al., 2000). Genes de resistência podem se propagar rapidamente entre as bactérias, mesmo pertencentes a gêneros distintos. Existem evidências que, se uma bactéria ingerida colonizar o intestino por apenas um curto período de tempo, esta é capaz de transferir seus genes de resistência para bactérias patogênicas. Tais evidências causam preocupação quanto à possível propagação de

determinantes de resistência aos antimicrobianos de micro-organismos comensais aos patógenos humanos (WITTE, 1998; BOERLIN & WHITE, 2010).

O uso indiscriminado de antimicrobianos contribui para seleção de bactérias resistentes (SCHWARZ, 2001). Sendo assim, a possível transferência da resistência antimicrobiana de cepas bacterianas originadas de animais para o homem tem mobilizado instituições internacionais tais como Organização Mundial da Saúde (OMS), Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), Organização Internacional de Epizootias (OIE) e Codex Alimentarius (LOPES et al., 2006; ANVISA, 2008; GUARDABASSI & KRUSE, 2010).

Estudos publicados demonstram que a presença de micro-organismos multi-resistente não está concentrada somente no ambiente hospitalar, cepas resistentes são encontradas em outros nichos ecológicos, em humanos saudáveis e no ambiente de produção animal (SCHWARZ et al., 2001; WHO, FAO, OIE, 2003; HASMAN et al., 2006). Na produção animal, o aparecimento de cepas resistentes se deve ao uso excessivo de moléculas de antimicrobianos em medicina veterinária, até mesmo como aditivos zootécnicos. A preocupação em relação à presença destes elementos no ambiente animal se dá principalmente devido ao risco de transferência de micro-organismos multi-resistentes e seus elementos genéticos móveis para humanos seja através da cadeia alimentar ou contato direto com os animais, pela ingestão de alimentos de origem animal e, até mesmo, pelo ambiente contaminado (AARESTRUP et al., 2001, CASEWELL et al., 2003).

As infecções são a primeira preocupação no que se refere à ingestão de alimentos contaminados com bactérias resistentes. Uma bactéria resistente que contamina a carcaça durante o abate e ultrapassa as barreiras existentes durante o processamento do alimento, assim, como as barreiras naturais do TGI, pode colonizar e multiplicar-se (APPLEY et al., 2001). São conhecidas duas rotas importantes de transferência de resistência antimicrobiana de animais aos seres humanos, uma direta quando bactérias resistentes infectam os seres humanos e outra indireta quando os genes de resistência são transferidos horizontalmente à população bacteriana humana a partir da cadeia alimentar (DE LEENER et al., 2005; HENKES, 2010).

Conscientes de que a resistência antimicrobiana é um problema multifatorial e que é necessário haver o controle da resistência antimicrobiana em bactérias originadas de animais, principalmente aqueles destinados a alimentação humana, a OMS dividiu os micro-organismos considerados prioritários para o monitoramento de resistência em duas categorias: os zoonóticos, incluindo *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp.; e os indicadores de contaminação fecal, *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp. (ANVISA, 2008).

Desde 1999, o Japão conta com o programa denominado “*Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System (JVARM)*” no qual as bactérias para testes de resistência tem coleta contínua, inclusive os micro-organismos zoonóticos (*Campylobacter* e *Salmonella*) e os indicadores (*E. coli* e *Enterococcus*) isolados de excrementos de animais saudáveis com a finalidade de estimar os riscos à saúde pública e animal. De forma semelhante, a União Europeia criou programas específicos de vigilância nacional para monitorar o consumo de antimicrobianos e desenvolvimento de resistência antimicrobiana e, com a finalidade de padronizar os testes de sensibilidade nos diferentes países europeus foi criado o projeto Resistência a Antibióticos em bactérias de Origem Animal II (ARBAO-II) focado no monitoramento de agentes zoonóticos e bactérias comensais em bovinos, suínos, aves e alimentos de origem animal (VALOIS et al., 2010).

Em 2005, foi aprovado pela Comissão do Codex Alimentarius, o Código de Práticas para minimizar e Conter a Resistência a Antimicrobianos (CAC/RCP 61-2005) com o objetivo de reduzir os possíveis efeitos que o uso de antimicrobianos em animais de produção possa causar na saúde pública. Contendo informações para os médicos veterinários enfatizando tanto o uso prudente quanto o controle de vendas de antimicrobianos a partir da vigilância instituída em cada país (CODEX ALIMENTARIUS, 2005). No Brasil, a magnitude do problema da resistência antimicrobiana não é completamente conhecida, mas diversos pesquisadores brasileiros tem evidenciado o grande impacto das infecções causadas por estes patógenos no sistema hospitalar do país (OPLUSTIL et al., 2001; DALLA-COSTA et al., 2003). Frente ao problema da resistência antimicrobiana está em vigor, desde 2004, o Programa Nacional da Resistência Bacteriana em Frangos (PREBAF) inicialmente proposto para os gêneros *Salmonella* e *Enterococcus* e estendido aos gêneros *Listeria* e

Campylobacter isolados de carcaças de frango comercializadas no país (ANVISA, 2004; ANVISA, 2008). Porém, para alimentos de origem suína não existem monitoramentos implantados pelos órgãos oficiais no que se diz respeito ao controle de resistência antimicrobiana.

Em 2006, entrou em funcionamento no Brasil a Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde (RM) vinculada à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em parceria com a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) e com a Coordenação Geral dos Laboratórios de Saúde Pública (CGLAB/SVS/MS) com o objetivo de tornar a assistência à saúde mais efetiva por meio do uso adequado de antimicrobianos e da detecção, prevenção e controle da emergência de resistência microbiana em serviços de saúde no país (ANVISA, 2006).

2.5. *Enterococcus* spp. e a resistência a antimicrobianos

A natureza ubíqua dos *Enterococcus* spp. torna estes micro-organismos resistentes às condições ambientais adversas facilitando a sua colonização em uma diversidade de nichos ecológicos, o que garante a sua ampla distribuição na natureza. Desta forma, estes micro-organismos podem funcionar como vetores na propagação de resistência antimicrobiana a partir da cadeia alimentar e, estas características representam um desafio no controle de estirpes patogênicas multi-resistentes (AARESTRUP et al., 2002; FRACALANZA et al., 2007; RIBOLDI et al., 2009; VIGNAROLI et al., 2011). *Enterococcus* são intrinsecamente resistentes a uma gama de antimicrobianos de uso terapêutico (ASLAM et al., 2010; COLLIGNON et al., 2010; LÓPEZ et al., 2010; ZOU et al., 2011). Além disso, a disseminação de resistência adquirida está ligada ao fato deste micro-organismo ter capacidade de adquirir e transferir marcadores de resistência através de genes presentes em plasmídeos e transposons (RIZZOTTI et al., 2009).

Mesmo que o uso de agentes antimicrobianos na medicina humana, na produção animal e na medicina veterinária não seja responsável pela origem da resistência antimicrobiana, tem contribuído na propagação de bactérias resistentes (JENSEN et al., 2010) e, de acordo com Lopes et al., (2005), o uso massivo de antimicrobianos tanto no sistema de saúde como na produção

animal é considerado o principal responsável pelo aumento da incidência de enterococos resistentes. O uso de antimicrobianos como gentamicina, tetraciclina e eritromicina associados à ração animal podem gerar pressão seletiva resultando em cepas multi-resistentes às quais podem ser liberadas no ambiente contribuindo na disseminação dos genes de resistência (CORRÊA et al., 2005). Em estudo conduzido por Boerlin et al., (2001), foram comparados os níveis de resistência de cepas de *Enterococcus* isoladas de fezes de suínos antes e após a proibição do uso de tilosina como aditivo zootécnico. Nesse estudo, observou-se diminuição clara de resistência frente aos macrolídeos, lincosamida e tetraciclina nas cepas isoladas após o banimento da tilosina.

As principais classes de antimicrobianos utilizadas em animais apresentam análogos usados em humanos e, portanto podem ser capazes de induzir resistência cruzada. Nos últimos anos, duas classes têm recebido atenção científica: as estreptograminas e os glicopeptídeos. Desde 1975, a virginiamicina é um aditivo alimentar aprovado com o intuito de promover crescimento ou controlar doenças em perus, suínos, bovinos e frangos. Porém seu análogo, Synercid[®], aprovado em setembro de 1999 pela Food and drug Administration (FDA), foi considerado, na época, o último recurso no tratamento de infecção septicêmica causadas por *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina e para infecções de tecidos moles provocadas por *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*. Esse fato implicou em um maior monitoramento do uso de virginiamicina nos animais, pois seu uso pode ter resultado no desenvolvimento de resistência à estreptogramina, prejudicando a terapia com Synercid[®] em humanos (BOERLIN & WHITE, 2010). Alguns estudos têm demonstrado que a frequência de resistência de enterococos de origem animal à vancomicina têm diminuído após a proibição do uso da avoparcina como promotor de crescimento (AARESTRUP et al., 2001; BOERLIN et al., 2001) apesar ainda serem recuperados enterococos resistentes, vários anos após a sua proibição (HAMMERUM et al., 2004).

A propagação zoonótica de resistência antimicrobiana de estirpes de enterococos tem se tornado uma preocupação em saúde pública (ZOU et al., 2011); em relação aos enterococos os resultados demonstram que há comportamento distinto entre as espécies. No caso de *E. faecium*, isolados de origem animal ou alimentos e aqueles associados à infecções humanas

pertencem á diferentes grupos clonais, indicando que não há colonização prolongada em humanos de estirpes bacterianas proveniente de animais (HAMMERUM, 2012). Entretanto, evidências de transferência de genes de resistência à vancomicina entre cepas de origem animal e de humanos, tanto no intestino de camundongos como no de humanos voluntários, foram encontradas (LESTER et al., 2006; LESTER & HAMMERUM, 2010). O principal gene de resistência à vancomicina (*vanA*) está presente em um transposon (Tn/546), o qual, na maioria das vezes, está localizado em plasmídeos (HAMMERUM, 2012). Esse tipo de localização, provavelmente, contribui para a mobilidade dos genes de resistência em isolados de origem diversa. Em relação á *E. faecalis*, a situação parece ser diferente, pois uma elevada similaridade de pulsotipos e perfis de multilocus sequence typing (MLST) foi encontrada entre isolados de suínos e humanos (LARSEN et al., 2011), o que leva a supor que essa espécie pode oferecer risco de colonização direta aos humanos.

A crescente disseminação de *Enterococcus* resistentes é problemática, pois as opções de tratamento de infecções graves causadas por estas bactérias são muito limitadas (COLLIGNON et al., 2010). Os *Enterococcus* são intrinsecamente resistentes a penicilinas semissintéticas, cefalosporinas, baixos níveis de aminoglicosídeos, clindamicina e sulfametoxazol-trimetoprim, além disso, frequentemente apresentam resistência adquirida ao cloranfenicol, eritromicina, altos níveis aminoglicosídeos, glicopeptídeos, tetraciclinas, fluoroquinolonas e vancomicina (MURRAY, 1990; KAYSER, 2003; RICE et al., 2003).

Na prática médica, os principais agentes antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções enterocócicas são ampicilina e seus derivados ou, vancomicina, sendo comum a associação da ampicilina com os aminoglicosídeos, devido a sua atividade sinérgica (COLLIGNON et al., 2010). Outros agentes como os macrolídeos e as tetraciclinas parecem apresentar uma atividade relativamente fraca, já a quinupristina/dalfopristina mostram-se especialmente ativa contra *E. faecium* porém, a maioria da cepas de *E. faecalis* é resistente a este antimicrobiano. Já a linezolida é ativa contra a maioria dos enterococos (ELIOPOULOS, 2003; MOELLERING, 2005).

Um dos problemas da resistência dos enterococos consiste na associação de resistência a antimicrobianos, particularmente entre isolados VRE. Nesse grupo, a resistência associada entre as opções terapêuticas para infecções graves, incluindo ampicilina, altas concentrações de aminoglicosídeos e linezolida têm sido comumente relatada. Estudos realizados no Brasil relatam um crescente aumento da resistência de *Enterococcus* (D'AZEVEDO et al., 2004; TITZE-DE-ALMEIDA et al., 2004; HORNER et al., 2005; PALAZZO et al., 2006; BENDER et al., 2010; KOBAYASHI et al., 2011; PINTO et al., 2011; SOUZA et al., 2012).

Altos índices de resistência têm sido relatados em cepas isoladas de alimentos, o que justifica a hipótese de que os *Enterococcus* de origem alimentar sirvam como reservatório de genes de resistência (FRACALLANZA et al., 2007; VALENZUELA et al., 2009; RIBOLDI et al., 2009). Em estudo realizado com carcaças de frango no Rio Grande do Sul, mais da metade das cepas de *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus* e *E. gallinarum* apresentaram perfis de multi-resistência sendo, os maiores índices observados frente aos antimicrobianos tetraciclina e eritromicina (FRAZZON et al., 2010). Em um estudo anterior, cepas de *E. faecalis*, *E. faecium* e *Enterococcus* spp. isoladas de alimentos demonstraram fenótipos de resistência a uma gama de antibióticos, como gentamicina, estreptomicina, ampicilina e vancomicina (RIBOLDI et al., 2009). Kretsinger et al., (2003) observaram resistência a alta concentração de gentamicina (HLAR) em cepas de *Enterococcus* oriundas de carnes suínas (24%), frango (72%) e bovina (4%), evidenciando, desta forma, que o uso corriqueiro da gentamicina na produção destas espécies animais pode ter contribuído para o aumento da resistência antimicrobiana presente nos isolados destes alimentos. A presença de enterococos resistentes à gentamicina (HLAR) e à quinupristina/dalfopristina foi relatada em amostras de carne suínas nos Estados Unidos por McClellan et al. (2001).

Estudos relatam que a falha terapêutica aumenta em 20% e a mortalidade em 25% em infecções causadas por isolados de *Enterococcus* resistentes aos aminoglicosídeos (FISHER et al., 2009). Costa et al. (2009) investigaram 38 isolados de *E. faecalis* oriundos da carne de frango e de infecção urinária pela técnica de RAPD-PCR, e observaram uma elevada

similaridade entre as amostras clínicas e alimentares, indicando uma possível rota de transmissão a partir dos alimentos.

2.5.1. Resistência aos glicopeptídeos

Representantes deste grupo a teicoplanina e a vancomicina são comumente utilizados na terapia das infecções causadas por *Staphylococcus aureus* resistentes à múltiplas drogas e *Enterococcus* (LOPES et al., 2009). A resistência à vancomicina em *Enterococcus* foi detectada após 40 anos do início do uso da droga (COLLIGNON et al., 2010). As cepas resistentes apresentam síntese de precursores da parede celular modificados, ou seja, de uma alteração do alvo D-alanil-D-alanina em D-alanil-D-lactato ou D-alanil-D-serina que apresenta baixa afinidade com a vancomicina (CETINKAA, 2000; FALK & MAYHALL, 2000; LAZO et al., 2006). As primeiras amostras clínicas de *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE) foram identificadas na década de 1980 na Europa e nos Estados Unidos (MURRAY, 2000). Cerca de dez anos mais tarde foram, pela primeira vez, isolados VRE no Brasil (ZANELLA et al., 1999; CONCEIÇÃO et al., 2011).

A importância de *Enterococcus* como patógeno hospitalar é crescente, especialmente nos Estados Unidos (EUA) onde cepas resistentes à vancomicina (VRE) são comuns (COLLIGNON et al., 2010). Foram descritos diferentes genes de resistência adquirida à vancomicina tais como, *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE*, *vanG* e *vanL* (WERNER et al., 2008; LÓPEZ et al., 2009). O mecanismo de resistência à teicoplanina não está bem elucidado, no entanto, o gene *vanA* induz um alto nível de resistência tanto a teicoplanina (CIM $\geq 16\mu\text{g/ml}$) quanto a vancomicina (CIM $\geq 64\mu\text{g/ml}$) (LAZO et al., 2006) sendo adquirido normalmente através do transposon *Tn1546* ou por membros da família relacionados como *Tn3*. Por outro lado, cepas que carregam o gene *vanB* são susceptíveis à teicoplanina e apresentam níveis variados de resistência a vancomicina. Esse gene localiza-se normalmente no cromossomo bacteriano, podendo ser carregado por plasmídeos e transposons (BAZET et al., 2005; EMANEIMI et al., 2008). Já o gene *vanD* determina um nível moderado de resistência tanto a vancomicina quanto a teicoplanina, localiza-se no

cromossomo e não é transferível. A resistência adquirida dos *Enterococcus* a vancomicina resulta em um sério desafio na terapêutica das infecções causadas por estes micro-organismos em toda a Europa, tendo em vista que muitos países registraram aumento de VRE ao longo do tempo (WERNER et al., 2008). Nos EUA, cepas de VRE são consideradas endêmicas em alguns hospitais (BONTEN et al., 2001; RICE, 2001). Billtröm et al. (2009) em estudo sobre a frequência da multi-resistência de *E. faecium* (clone CC17) dos isolados clínicos da Suécia, observaram um aumento considerável da resistência frente a gentamicina e a vancomicina entre os anos 2004 e 2007, período no qual o estudo foi conduzido.

Conceição et al. (2011) verificaram a evolução da resistência aos antimicrobianos entre isolados clínicos de enterococos em um hospital brasileiro, sendo que a incidência de *E. faecium* em 1.000 pacientes internados aumentou significativamente de 0,3 em 2006 para 2,3 em 2009. Da mesma forma foi observado um aumento significativo na taxa de VRE de 2,5% para 15,5%. Todos os VRE apresentaram genótipo *vanA* e MIC >256µg/mL para vancomicina. A maioria (89,5%) dos VRE pertencia à espécie *E. faecium* e apresentavam resistência à ampicilina e às quinolonas, sendo observado um aumento significativo na taxa de resistência a ampicilina, de 2,5% (2006) para 21,4% (2009).

Em estudo realizado na Itália com 154 cepas de *Enterococcus* resistentes aos glicopeptídeos (GRE) apresentando o gene *vanA* isoladas de seres humanos (69), animais (49) e alimentos (36) levou à conclusão que os GRE podem ser considerados reservatórios tanto de genes de resistência, quanto de virulência e que a presença do gene *vanA* em cepas de *E. faecium* oriundos de carnes, sugere fortemente o envolvimento dos alimentos na sua propagação (BIAVASCO et al., 2007).

2.5.2. Resistência aos β-lactâmicos

Os micro-organismos do gênero *Enterococcus* apresentam resistência intrínseca a alguns antimicrobianos do grupo dos β-lactâmicos (BARBOSA et al., 2009). A penicilina e, principalmente, a ampicilina exercem maior atividade frente a estes micro-organismos, seguidas pelos carbapenêmicos. As

cefalosporinas exercem menor atividade, sendo que seu uso, nas infecções enterocócicas, pode resultar em superinfecções (KAK & CHOW, 2002; LOPES et al., 2005; CASSANEGO, 2010).

O elevado nível de resistência aos β -lactâmicos deve-se, principalmente, à baixa afinidade das proteínas ligadoras de penicilina (PBP) ou devido á mutações nas PBP, tornando-as menos susceptível à inibição pelas penicilinas. *Enterococcus* spp. apresentam cerca de cinco tipos de PBP's; a PBP₅ possui uma afinidade intrinsecamente baixa aos β -lactâmicos (RICE et al., 2006). Fontana et al., (1996) descreveram *E. faecalis* produtores de β -lactamase codificadas pelo gene *blaZ*.

É comum que penicilinas, como a ampicilina, precisem ser combinadas com aminoglicosídeos nos casos de infecções graves por *Enterococcus*, como a endocardite e a bacteremia, já que, quando usadas isoladamente são incapazes de eliminar cepas de *Enterococcus* (COLLIGNON et al., 2010).

2.5.3. Resistência aos aminoglicosídeos

O grupo dos aminoglicosídeos incluem antimicrobianos tais como, amicacina, arbecacina, gentamicina, netilmicina, tobramicina e estreptomicina, considerados de extrema importância para terapêutica humana. No entanto, a terapia prolongada com aminoglicosídeos pode provocar insuficiência renal e danos neurológicos, devido ao efeito tóxico que estes antimicrobianos exercem, limitando sua utilização á infecções graves. Para cepas de *E. faecium* resistentes à ampicilina, deve ser utilizada a associação de um aminoglicosídeo com a vancomicina, porém, se a cepa apresentar elevado nível de resistência aos aminoglicosídeos, torna-se quase impossível a cura da infecção (COLLIGNON et al., 2010).

O primeiro isolado de *Enterococcus* apresentando elevado nível de resistência à gentamicina foi descrito, em 1980, a partir de isolado hospitalar, e a partir de então tem sido comumente encontrado em amostras clínicas e do TGI de humanos e animais (ZARRILLI et al., 2005).

Poucos estudos avaliaram as associações entre as cepas clínicas e as endêmicas de *E. faecalis*, nos seres humanos, animais e nos alimentos de origem animal. Estudo recentemente realizado por Larsen et al., (2011)

demonstrou que a emergência do alto nível de resistência a gentamicina (HLAR) coincidiu tanto em cepas de *E. faecalis* isoladas de pacientes com endocardite quanto nas cepas da população de suínos na Dinamarca, sugerindo que tanto a microflora intestinal dos seres humanos quanto dos suínos são reservatórios de *E. faecalis* de importância clínica. De acordo com Kasimoglu-Dogru et al. (2010), a possibilidade desta disseminação de resistência a partir da cadeia alimentar é preocupante, tendo em vista que os aminoglicosídeos em associação aos β -lactâmicos ou glicopeptídeos, são considerados antimicrobianos de eleição nas infecções enterocócicas.

Os aminoglicosídeos exercem seu efeito bactericida por interferirem na síntese proteica devido a ligação a fração 16S rRNA da subunidade ribossomal 30S (HERNÁNDEZ, 1998). Cada aminoglicosídeo possui um alvo distinto na subunidade ribossomal 30S, sendo, portanto, raro se observar qualquer tipo de resistência cruzada entre os diferentes antimicrobianos (Sáenz, 2004). *Enterococcus* spp. apresentam resistência intrínseca a baixos níveis de aminoglicosídeos, dificultando o transporte do antimicrobiano através da membrana celular. A principal forma de resistência ocorre devido à aquisição de genes de resistência que codificam enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs) que podem ser fosfotransferases, acetiltransferase ou nucleotidiltransferase (KAK & CHOW, 2002; EMANEINI et al., 2008). Estas enzimas impedem a ação do antimicrobiano, ao transformá-lo em um metabólito inativo e resultando em cepas com valores de CIM elevados (SÁENZ et al., 2004). As AMEs eliminam o efeito sinérgico bacteriano entre os agentes ativos na parede celular como os β -lactâmicos, glicopeptídeos e aminoglicosídeos (KOBAYASHI et al., 2011).

A maioria dos isolados clínicos de *Enterococcus* que apresenta níveis elevados de resistência aos aminoglicosídeos possui genes como, o *aph(2'')-Ic*, responsável pela resistência frente à gentamicina, tobramicina, canamicina, estando também relacionado a eliminação do sinergismo ampicilina/gentamicina que tem sido descrito em cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* (MAROTHI et al., 2005). O gene *aac(6')-Ic-aph(2'')*, resultante da fusão de dois genes ancestrais, codifica a enzima bifuncional que apresenta atividades tanto de acetilação quanto de fosforilação da molécula do antimicrobiano, permitindo a resistência a um amplo espectro de aminoglicosídeos entre eles,

gentamicina, tobramicina, amicacina e canamicina (MIRANDA et al., 2001; DONABEDIAN et al., 2003; ZARRILLI et al., 2005; EMANEINI et al., 2008).

Os genes *aph(2'')Ib* assim como o *aph(2'')Id*, detectado somente em isolados clínicos de *E. faecium* VRE, codificam uma fosfotransferase responsável pelo elevado nível de resistência à gentamicina, tobramicina, canamicina, netilmicina e arbecacina. Enquanto que o gene *aph(3'')-IIIa* codifica uma fosfotransferase que confere altos níveis de resistência à canamicina, o *ant(4')Ia* codifica uma nucleotransferase que confere resistência à tobramicina, amicacina, canamicina e arbecacina, encontrados tanto em *Enterococcus* quanto em *Staphylococcus*. E o gene *aac(6')Ii* codifica uma acetiltransferase capaz de eliminar o efeito sinérgico dos aminoglicosídeos e os β -lactâmicos (KAK & CHOW, 2002).

Como a estreptomicina é o antimicrobiano desta classe que apresenta a estrutura molecular mais distinta, os genes anteriormente citados não atuam frente a essa molécula; o mecanismo de resistência deve-se aos genes *ant(6)-Ia* e *ant(3'')-Ia*, que codificam nucleotransferases capazes de modificar a estrutura deste antimicrobiano, ou à mutação na subunidade ribossomal 30S, diminuindo sua capacidade de ligação ao antimicrobiano. De acordo com Marothi et al. (2005) mais de 90% dos isolados clínicos que apresentam resistência aos aminoglicosídeos possuem o gene *aac(6')-Ie-aph(2'')* e menos de 10% possuem *aph(2'')-Ic*, *aph(2'')-Id*, *aph(2'')Ib*, *ant(4')Ia*, *aph(3'')-IIIa* e *aac(6')-Ii*.

Muitos estudos relatam o aparecimento de *Enterococcus* HLAR, dentre estes podemos citar isolados do ambiente (MOORE et al., 2008), de alimentos (TANSUPHASIRI et al., 2006), de águas residuais (TALEBI et al., 2008) de hospitais (RUDY et al., 2005). Han et al. (2011) analisaram 1500 amostras de isolados de *Enterococcus* obtidas a partir de fezes de humanos e de animais, destinados ao consumo humano, nas quais foi observado um elevado nível de resistência aos aminoglicosídeos (HLAR). No mesmo estudo, os autores sugeriram, a partir de seus resultados que a restrição desta classe antimicrobiana na produção de animais, especialmente suínos e aves, seria benéfica no controle da disseminação das resistências encontradas.

2.5.4. Resistência ao Cloranfenicol

O cloranfenicol possui amplo espectro de atividade antimicrobiana, pois inibe a síntese de proteínas nos micro-organismos e, em menor grau, nas células eucarióticas. Na maioria dos *Enterococcus* spp. a resistência frente a este antimicrobiano é mediada pelo gene *catA*, que codifica a enzima inativadora cloranfenicol- acetiltransferase, cuja função é alterar a estrutura do antimicrobiano fazendo com que este perca a capacidade de ligação no ribossomo do micro-organismo (KAK & CHOW, 2002; LAZO et al, 2006; TOP et al., 2008). A presença do gene *catA* tanto em *Enterococcus* como em *Streptococcus* e *Staphylococcus* sugere, a transferência horizontal de resistência entre os diferentes gêneros bacterianos. Segundo Kak & Chow (2002), cerca de 50% das linhagens de *Enterococcus* apresentam resistência ao cloranfenicol, no entanto tem sido observada boa efetividade deste antimicrobiano em infecções causadas por VRE em humanos (KASIMOGLU-DOGRU et al., 2010).

2.5.5. Resistência às estreptograminas

A família das estreptograminas compreendem os antimicrobianos, micamicina, pristinamicina, oestreomicina e virginamicina, que atuam inibindo a síntese de proteínas por interferirem na subunidade 50S do ribossomo bacteriano. As pristinamicinas deram origem aos compostos semi-sintéticos quinopristina e dalfopristina (WITTE, 2000).

Quinopristina/dalfopristina é uma combinação de duas estreptograminas especialmente ativas contra cepas de *E. faecium*. No entanto, a maioria das cepas de *E. faecalis* são resistentes a quinopristina/dalfopristina sendo uma provável explicação o mecanismo de efluxo. Esta combinação permanece como um dos poucos tratamentos efetivos nas infecções por *E. faecium* multi-resistentes (COLLIGNON et al., 2010), no entanto já foram descobertos dois genes *vatD* e *vatE*, os quais codificam a resistência a quinopristina/dalfopristina nesta espécie (KOK & CHOW, 2002).

2.5.6. Resistência aos macrolídeos

Os representantes deste grupo são a eritromicina, claritromicina, clindamicina, roxitromicina e a azitromicina, antimicrobianos que apresentam efeito bacteriostático sobre os micro-organismos e que, em alguns casos, quando utilizados em concentrações elevadas ou em contato com micro-organismos muito sensíveis, apresentam efeito bactericida (FLUIT et al., 2001). São descritos diferentes mecanismos de resistência a esta classe, tais como modificação do alvo, efluxo ativo e a inativação enzimática (CAUWERTS et al., 2007), no entanto o principal mecanismo de resistência aos macrolídeos nos *Enterococcus* é conferido pela metilação da adenina na porção 23S da subunidade 50S do RNA ribossomal, codificada pelos genes *erm* (eritromicina ribossomo metilase) (CAUWERTS et al., 2007; EMANIENI et al., 2008; SCHWAISSER & BAUER, 2008; ZOU et al., 2011). Este fenótipo é usualmente mediado pelo gene *ermB* e, raramente, pelo gene *ermA*. Os genes *erm* conferem resistência cruzada ao grupo macrolídeo-lincosamidas-estreptograminas (MLS_B), importantes alternativas de tratamento das infecções em humanos (LEENER et al., 2004; SCHAWAIGER & BAUER, 2008; ZOU et al., 2011).

A resistência adquirida frente a estes antimicrobianos pelos *Enterococcus* tem sido frequentemente relatados nos isolados tanto de humanos quanto de animais, sendo, nestes casos, o fenótipo MLS_B codificado pelo gene *ermB* (LEENER et al., 2004, GUPTA et al., 2009). Frequentemente carregado juntamente com o gene *tetM* no transposon conjugativo *Tn* 1545 (LEENER et al., 2004). De acordo com Ermaneini et al. (2008) a resistência aos macrolídeos, principalmente à eritromicina, é frequente nos *Enterococcus*. Um alto nível de resistência a eritromicina também é relatada em *Enterococcus* isolados de animais (ZOU et al., 2011).

Outro mecanismo de resistência está associado ao gene *mefA* que codifica uma proteína que bombeia antimicrobianos para fora da célula. Este gene parece estar localizado em um elemento conjugativo e condiciona menores níveis de resistência a eritromicina do que o gene *ermB* (LAZO et al., 2006; TOP et al., 2008).

2.5.7. Resistência às fluoroquinolonas

As fluoroquinolonas, também conhecidas como quinolonas, 4-quinolonas, ácidos piridina- β -carboxílicos e ácidos carboxílicos quinolonas, formam um grupo amplo de antimicrobianos sintéticos. A primeira quinolona descrita foi o ácido nalidíxico, em 1962, e no período entre meados de 1960 e início de 1980 várias outras quinolonas foram aprovadas para o uso clínico (WALKER & DOWLING, 2010).

O núcleo quinolona acrescido do flúor deu ao grupo o nome “fluorquinolona”; a primeira fluorquinolona aprovada para uso em medicina foi o norfloxacin, seguido pelo ciprofloxacino. A primeira fluorquinolona aprovada para uso em animais foi a enrofloxacin, em 1988 nos EUA. Atualmente, existem oito fluorquinolonas aprovadas para o uso em medicina veterinária: danofloxacin, difloxacin, enrofloxacin, marbofloxacin, orbifloxacino, sarafloxacin, ibafloxacin e pradofloxacin (ambos apenas na Europa). Estas fluorquinolonas atualmente comercializadas para o uso em medicina veterinária são tipicamente bem absorvidas após a administração oral, apresentam grande distribuição, penetram praticamente em todas as células e tecidos do organismo e tem meia-vida de eliminação longa, possibilitando a administração do medicamento em intervalos de 24 ou 48 horas. Quando a concentração da droga (CIM) é alcançada, as fluorquinolonas são rapidamente bactericidas, apresentam taxa de morte dependente da concentração e podem manifestar efeito pós-antibioticoterapia (EPA) *in vivo* para algumas bactérias. No entanto, o potencial para seleção de resistência relativamente rápido em alguns patógenos torna-se uma desvantagem (WALKER & DOWLING, 2010).

A atividade do ciprofloxacino nos *Enterococcus* é moderada, e a resistência destes micro-organismos frente a este antimicrobiano é bastante comum. Apesar de algumas fluorquinolonas como o marbofloxacin e gatifloxacino serem bastante efetivas *in vitro* contra estes micro-organismos, frequentemente a resistência a uma fluorquinolona resulta em resistência a todas as drogas deste grupo. A resistência às fluorquinolonas desenvolve-se por modificação do alvo, menor permeabilidade, efluxo ou proteção do alvo, sendo que estes mecanismos podem ocorrer simultaneamente na mesma célula, induzindo a um grau de resistência muito elevado (WALKER &

DOWLING, 2010). A resistência as quinolonas em *Enterococcus* não está bem elucidada, quando comparada aos mecanismos de resistência dos *Staphylococcus* e *Streptococcus*, nos quais a resistência é mediada principalmente por alterações no sítio de interação da droga pelas enzimas DNA girase e topoisomerase IV (codificada por *grlA* e *grlB*) e/ou pela diminuição do acúmulo intracelular através do efluxo deste agente. Acredita-se que nos *Enterococcus* a resistência ocorra, basicamente, devido á mutações dos genes *parC* e *gyrA* (OYAMADA et al., 2006).

2.5.8. Resistência à tetraciclina

As tetraciclinas são antimicrobianos de amplo espectro, bacteriostáticos, que inibem a síntese proteica nos micro-organismos sensíveis. São comumente utilizados nas terapias humanas, na medicina veterinária e na agricultura (CHOPRA & ROBERTS, 2001; CAUWERTS et al., 2007; NEELA et al., 2009). Após a difusão através da membrana celular externa das bactérias, um processo ativo mediado por carreador transporta as drogas através da membrana citoplasmática interna e uma vez nas células, as tetraciclinas se ligam reversivelmente aos receptores da subunidade 30S do ribossomo, onde interferem com a ligação do RNA aminoacil-transportador ao complexo ácido ribonucleico (GIGUÉRE, 2010).

A resistência adquirida às tetraciclinas encontra-se disseminada entre as bactérias e micoplasmas o que tem reduzido consideravelmente a utilidade destes antimicrobianos. A maioria dos micro-organismos resistentes à tetraciclina carrega um ou mais dos 40 genes de resistência (CAUWERTS et al., 2006; KAZIMIERCZAK et al., 2009) presentes, frequentemente, em elementos transferíveis como plasmídeos, transposons, transposons conjugativos e/ou integrons (BOGUSLAWSKA et al., 2009). Segundo Giguère (2010), a resistência às tetraciclinas pode ser mediada por um dos três diferentes mecanismos: um efluxo de tetraciclina por meio de transferência transmembrana que resulta em menor concentração do antimicrobiano no citosol (considerado o mais comum); proteção ribossômica na qual as tetraciclinas não mais se ligam ao ribossomo bacteriano; ou devido à modificação química enzimática. Até o momento foram identificados oito

classes de genes envolvidos na resistência mediada por proteínas transmembrana, sendo as classes K e L encontradas nos gêneros *Enterococcus*, *Staphylococcus* e *Streptococcus* (BISMUTH et al., 1990)

A resistência à tetraciclina é um dos fenótipos de resistência adquirida muito frequente, encontrados em 65% dos *Enterococcus* isolados em alimentos por Roberts et al. (2003). O uso de baixas doses da tetraciclina como promotor de crescimento nos animais destinados à produção de alimentos tem contribuído no aumento da resistência frente a este antimicrobiano tanto nos micro-organismos patogênicos quanto nos ambientais (RAHMAN et al., 2008).

Existem três classes de genes que codificam resistência pela ligação da proteína ao ribossomo *tetO*, *tetS* e *tetM* considerado o mais comum, presente em *Tn916* e plasmídeos conjugativos (ZANEL et al., 2004) o que possibilita a sua ampla distribuição entre as espécies, inclusive as ambientais (RAHMAN et al., 2008). Rizzotti et al. (2009) demonstraram a habilidade de algumas cepas de *E. faecalis*, *E. faecium* e *E. durans* de transferirem determinantes de resistência à tetraciclina através dos transposons *Tn916* e *Tn1545*. Frazzon et al. (2009) detectaram em seu estudo a presença dos genes transferíveis *tetM* e *tetL* em amostras de *Enterococcus* isoladas de carcaças de frango. Corrêa et al. (2005) compararam a resistência antimicrobiana de *Enterococcus* isolados de fezes de suínos arraçoados e não arraçoados com os antimicrobianos tetraciclina e eritromicina e, observaram uma maior porcentagem de cepas resistentes e multi-resistentes no grupo de suínos arraçoados, nos quais todos os isolados mostram-se resistentes à tetraciclina. Esta diferença na predominância das espécies e perfis de resistência entre as diferentes amostras foi relacionada à dieta fornecida aos animais.

2.6. O uso de antimicrobianos em suínos

A aprovação e o licenciamento de antimicrobianos para uso em animais de produção são bastante complexos, pois devem assegurar que os produtos sejam confiáveis e seguros. As principais áreas de risco, consideradas na aprovação de medicamentos antimicrobianos para uso em animais, incluem a segurança ambiental, a segurança ocupacional e alimentar, a segurança do

animal-alvo, assim como a sua eficácia frente ao tratamento (TOLLEFSON et al., 2010).

A demanda por carne teve um substancial aumento durante os anos pós-guerra, resultando no aumento das unidades produtoras de suínos e à maior densidade populacional de animais. Conseqüentemente, houve um aumento do desafio relativo ao controle das doenças (BURCH et al., 2010).

Os antimicrobianos têm sido muito utilizados na suinocultura ao longo de várias décadas, alcançando um valor estimado de 1,7 bilhões de dólares, representando 34% do mercado mundial de antimicrobianos em saúde animal (VIVASH-JONES, 2000). As tetraciclina predominam na maior parte dos mercados, seguidas pelos grupos de compostos macrolídeos/ lincosamida/ pleuromutilina, sendo o uso de penicilinas e as combinações de trimetoprima/sulfonamidas e aminoglicosídeos também importantes (BURCH et al., 2010).

Segundo Guardabassi et al. (2010), os antimicrobianos sempre serão essenciais para manter a saúde, o bem-estar e a produtividade em suínos. O objetivo da indústria é produzir carne segura, não contaminada, com boa relação custo/benefício, ao mesmo tempo em que considera o bem-estar animal e os fatores relacionados ao consumidor e ao meio ambiente. Baseado nisso, a moderna indústria de suínos tem dado maior atenção a biossegurança, reduzindo o uso de antimicrobianos mediante a adoção de várias melhorias de manejo e criação, que incluem o uso de vacinas e práticas de produção segregada, que possibilitam o emprego do sistema “todos dentro/todos fora” (FRIENDSHIP et al., 2010).

De acordo com Guardabassi et al. (2010) é imprescindível que o uso e a eficácia dos antimicrobianos disponíveis para combater as doenças atuais e as que possam surgir sejam mantidos e, esta responsabilidade cabe principalmente aos médicos veterinários e criadores, que devem utilizar os antimicrobianos de forma responsável. Sendo assim vários países produtores de carne suína introduziram programas educativos para criadores, incluindo o registro de todos os tratamentos a fim de assegurar a obediência do período de carência (LEWIS-JONES, 1998), bem como a aplicação de normas mais rígidas, incluindo o monitoramento intenso da resistência antimicrobiana, em

especial dos micro-organismos com potencial zoonótico (FRIENDSHIP et al., 2010).

O uso de antimicrobianos na produção da carne suína levanta duas preocupações ao consumidor, as quais se incluem o receio da presença de resíduos na carne suína de antimicrobianos, que podem ser prejudiciais aos humanos e, o surgimento de bactérias resistentes aos antimicrobianos em consequência de seu uso na produção (FRIENDSHIP et al., 2010; DOWLING, 2010). Na produção de suínos geralmente os antimicrobianos são distribuídos por meio de um carregador (alimento ou água), no entanto, a injeção parenteral, também é utilizada por apresentar melhores resultados (FRIENDSHIP et al., 2010).

A grande maioria dos antimicrobianos utilizados em criações de suínos é adicionada ao alimento como promotor de crescimento (2 a 50mg/tonelada de alimento) ou para o uso subterapêutico (200g/tonelada de alimento ou menos) (FRIENDSHIP, 2010), representando cerca de 80% do consumo total. Porém, devido ao aumento das preocupações sobre os possíveis efeitos adversos a saúde pública em decorrência da disseminação da resistência, em razão do emprego de antimicrobianos como promotores de crescimento em animais pecuários, veterinários, órgãos de saúde pública, microbiologistas, e autoridades de fiscalização estão cada vez mais envolvidos na investigação e interpretação da epidemiologia e dos riscos que este padrão de uso pode gerar (SHRYOCK et al., 2010).

O impacto que o uso de antimicrobianos na indução de resistência em patógenos humanos não é completamente conhecido, porém estudos demonstram que a proibição do uso de antimicrobianos como aditivo na produção de suínos na Dinamarca contribuiu com a redução marcante da população de enterococos resistentes frente aos mesmos (WHO, 2000).

Segundo Martinez (2009) o uso intensivo de antimicrobianos na criação animal, agricultura e em hospitais leva à liberação de dois tipos de resíduos em grande quantidade nos ecossistemas naturais: os antimicrobianos e os genes de resistência, que podem influenciar na população de microorganismos destes locais. Alguns tipos de antimicrobianos não são biodegradáveis, permanecendo por longo período no ambiente (KÜMMERER, 2004) resultando na seleção de microorganismos resistentes (MARTINEZ, 2009).

3. ARTIGO

Resistência de *Enterococcus* sp. isolados de carcaças suínas na etapa de pré-resfriamento frente á antimicrobianos

Antimicrobial resistance of Enterococcus spp. isolated from swine carcasses at the pre-chill stage

Thais de Campos^{1*}, Caroline Pissetti¹, Jalusa Deon Kich², Marisa Cardoso¹

¹ Setor Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9090, 90540-000, Porto Alegre, RS, Brasil

² Embrapa Suínos e Aves, Caixa Postal 21, CEP 89700-000, Concórdia, SC, Brasil

* thais.ufrgs@gmail.com

RESUMO

A presença de bactérias resistentes a antimicrobianos vem sendo monitorada de forma cada vez mais frequente em produtos de origem animal, com o intuito de evitar a disseminação dessas cepas para humanos via cadeia alimentar. O gênero *Enterococcus* encontra-se entre os patógenos mais relevantes nas infecções hospitalares em humanos e tem capacidade de adquirir resistência a diversos antimicrobianos. No presente estudo foi avaliada a frequência de isolamento e a resistência antimicrobiana de *Enterococcus* sp. de carcaças suínas na etapa de pré-resfriamento, em três matadouros-frigoríficos localizados no estado de Santa Catarina. Dois ciclos de amostragem foram conduzidos em cada estabelecimento resultando em 252 suabes de carcaças. A partir dessas amostras, foram obtidos 240 isolados de *Enterococcus* sp. identificados por testes fenotípicos e pela detecção do gene *tuf* e *ddl*_{*E.faecalis*} pela técnica de reação em cadeia da polimerase. Todos os isolados de

Enterococcus sp. foram testados quanto a resistência a antimicrobianos pela técnica de difusão em ágar. A espécie mais prevalente foi *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), presente em 90,83% das amostras de carcaça. Foi observada resistência à tetraciclina (42,5%), eritromicina (26,7%), estreptomicina (20,4%), ciprofloxacina (13,8%), cloranfenicol (12,1%) e a gentamicina (10,4%). Não foram encontrados isolados resistentes à vancomicina, teicoplanina e ampicilina. Os isolados que apresentaram perfil intermediário e resistente aos antimicrobianos ciprofloxacina e eritromicina, no teste de disco-difusão, foram submetidos à determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Em relação à ciprofloxacina, das 25 cepas com resistência intermediária no teste de disco-difusão, todas apresentaram CIM na concentração limítrofe (1,56 µg/mL), entre a sensibilidade e resistência, enquanto nas 74 cepas intermediárias frente à eritromicina, apenas duas apresentaram valor limítrofe máximo (4 µg/mL). Conclui-se que o gênero *Enterococcus* está presente em carcaças suínas na etapa de pré-resfriamento, sendo a espécie *E. faecalis* a mais encontrada. Apesar de existirem isolados resistentes a antimicrobianos usados na terapêutica humana, os resultados indicam que isolados resistentes a vancomicina, teicoplanina e ampicilina não estão presentes em carcaças suínas nos abatedouros estudados.

Palavras-chave: suínos, resistência antimicrobiana, *Enterococcus*

ABSTRACT

The presence of antimicrobial-resistant bacteria has been increasingly monitored in animal products in order to prevent the spread of these strains to humans through the food chain. The genus *Enterococcus* is among the most important pathogens in hospital infections in humans and is able to acquire resistance to several antibiotics. In the current study, the frequency of isolation and antimicrobial resistance of *Enterococcus* sp. from swine carcasses at the pre-chill stage in three slaughterhouses located in the state of Santa Catarina were evaluated. Two sampling cycles were performed at each establishment and 252 carcass swab were taken. A total of 240 strains of *Enterococcus* sp. were identified by phenotypic testing and by PCR detection of *tuf* and *ddl* genes. All *Enterococcus* isolates were tested for resistance against

antimicrobials by the agar diffusion technique. The most prevalent species was *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), present in 90.83% of the carcass samples. Tetracycline (42.5%), erythromycin (26.7%), streptomycin (20.4%), ciprofloxacin (13.8%), chloramphenicol (12.1%) and gentamicin (10.4%) resistance was observed. No isolates were found resistant to vancomycin, teicoplanin and ampicillin. The isolates with intermediate and resistant profile to antimicrobials ciprofloxacin and erythromycin were further subjected to minimum inhibitory concentration (MIC) determination. Regarding ciprofloxacin, all the 25 strains with intermediary resistance profile in the disk diffusion test presented MIC at the limit concentration (1.56µg/mL) between sensitivity and resistance, while from 74 intermediary resistant strains against erythromycin only two presented MIC at the limit concentration (4 µg/mL). It is concluded that the genus *Enterococcus* is present in swine carcasses during the pre-chill stage and the species *E. faecalis* is the most prevalent. Although resistance against antimicrobials used for the human treatment has been found, the results indicate that isolates resistant to vancomycin, teicoplanin and ampicillin are not present on pig carcasses from those abattoirs.

Keywords: *swine, pork, antimicrobial resistance, Enterococcus*

INTRODUÇÃO

O gênero *Enterococcus* apresenta relevância entre os micro-organismos oportunistas envolvidos em infecções hospitalares, devido à capacidade em expressar resistência a vários antimicrobianos e a habilidade em colonizar diferentes nichos com condições ambientais adversas (GILMORE, 2002; GIRAFFA, 2002). *Enterococcus* sp. não figura entre os agentes que comprometem a inocuidade dos alimentos, porém sua capacidade de sobrevivência aos desinfetantes, pH ácido e tratamento térmico possibilita que estejam presentes em produtos processados (FORSYTHE, 2002; SILVA et al., 2010). A primeira etapa do processamento de produtos cárneos é o abate dos animais, iniciando-se nesta fase, portanto, o risco de contaminação bacteriana (GIRAFFA et al., 2002). De acordo com Borch et al (1996), a principal fonte de contaminação durante o abate de suínos é de origem fecal. Uma vez que o

gênero *Enterococcus* é parte da microbiota entérica de humanos e animais (AARESTRUP et al., 2002), é provável que sejam encontradas espécies do gênero *Enterococcus* em carcaças suínas.

O uso terapêutico, metafilático, profilático e aditivo de antimicrobianos na produção animal contribuí para o aumento dos índices de resistência, pela pressão de seleção exercida sobre micro-organismos comensais e patogênicos (SCHWARZ & CHASLUS-DANCLA, 2001). *Enterococcus* spp. são intrinsicamente resistentes a uma gama de antimicrobianos de uso terapêutico (ASLAM et al., 2010; CULLEBRAS et al., 2010; ZOU et al., 2011) e apresentam capacidade em adquirir, transferir e disseminar genes de resistência (FRACALANZZA et al., 2007). Uma bactéria resistente que contamina a carcaça durante o abate e ultrapassa as barreiras existentes durante o processamento do alimento, pode colonizar e multiplicar-se no trato gastrointestinal do consumidor (APLEY et al., 2001). Portanto, a possibilidade de que cepas de *Enterococcus* resistentes a antimicrobianos sejam veiculadas via cadeia alimentar coloca esse gênero bacteriano como foco de atenção do ponto de vista da saúde pública (BERTRAND et al., 2000).

A competitividade no mercado e a valorização mundial da carne suína exigem que o conceito de qualidade e inocuidade dos alimentos seja observado. Sendo assim, o monitoramento da resistência frente a antimicrobianos em bactérias patogênicas ou oportunistas é essencial para avaliar o risco de transferência de cepas ou genes de resistência para humanos por meio da cadeia produtiva de alimentos. Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi investigar a frequência de isolamento e o perfil de resistência á antimicrobianos de *Enterococcus* sp. em carcaças suínas na etapa de pré-resfriamento.

MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento experimental

O estudo foi conduzido, entre 2010 e 2011, em três matadouros-frigoríficos localizados no estado de Santa Catarina, amostrados por conveniência, levando-se em conta os seguintes critérios: contar com o Serviço

de Inspeção Federal (SIF); pertencer a agroindústrias distintas; e, concordar em participar do projeto.

Dois ciclos de amostragens foram realizados em cada estabelecimento, em um turno de abate onde foram processadas entre 1500 e 2000 carcaças suínas. Em cada ciclo, foram amostrados três lotes de abate de granjas distintas e, de cada lote, foram colhidas amostras da superfície de 14 carcaças na etapa de pré-resfriamento, número suficiente para detectar ao menos uma carcaça positiva em um intervalo de confiança de 95% (TOMA et al., 2000), totalizando 252 carcaças amostradas.

Colheita das amostras

De cada lote incluído no estudo, foi colhida amostra da superfície da quinta carcaça na nória, sendo as demais 13 carcaças, amostradas em um intervalo de 20 carcaças. A colheita das amostras foi realizada na etapa de pré-resfriamento, por meio de esponjas individuais estéreis (Nasco[®]) umedecidas em 10 ml de água peptonada estéril 0,1%, friccionadas em quatro diferentes áreas de 100 cm² (lombo, papada, barriga e pernil) delimitadas por molde estéril, totalizando 400 cm² de área amostrada, conforme a Circular nº 130/2007/CGPE/DIPOA (BRASIL, 2007).

Em seguida, as quatro esponjas, referentes à mesma carcaça, foram acondicionadas no mesmo saco plástico e, transportada em caixa isotérmica ao Setor de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Quantificação e isolamento de Enterococcus

A cada amostra de carcaça, foi adicionado 40 mL de água peptonada tamponada (APT) 0,1% estéril; em seguida, as amostras foram homogeneizadas durante 60s em Stomacher (Logen Scientific). Imediatamente após a homogeneização, as amostras foram submetidas à diluições seriadas, 10⁰ até 10⁻⁵, em solução salina 0,85% estéril e, alíquotas de 1mL de cada diluição foram semeadas, em duplicata, em ágar KF *Streptococcus* Agar Base (Oxoid) pela técnica de semeadura em profundidade (SILVA et al., 2010). A contagem das colônias típicas (vermelhas ou róseas) foi realizada após 48 horas de incubação á 36± 1°C. A média das colônias típicas foi multiplicada

pelo inverso da diluição de contagem dividido por 40, para obter o número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mL de caldo. Para representação do resultado em área de carcaça, considerou-se que os 40 ml de amostra homogeneizada representavam a área total amostrada 400 cm². Sendo assim, os valores obtidos em UFC/ml foram divididos por 10 para obter o resultado em UFC.cm⁻² (SILVA et al., 2010). Como controle de qualidade do meio de isolamento foram utilizadas as cepas *Enterococcus faecalis* ATCC[®] 29212 (controle positivo) e *Escherichia coli* ATCC[®] 25922 (controle negativo).

Colônias típicas de *Enterococcus* no meio KF *Streptococcus* foram armazenadas, individualmente, em Caldo de Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Oxoid), contendo 20% de glicerol a -20°C. Posteriormente, alíquotas das culturas em estoque foram transferidas para Agar Triptona de Soja (TSA, Oxoid), incubadas a 36± 1°C durante 24 horas, visando isolamento e purificação das colônias e, tendo por objetivo a confirmação da prévia identificação do gênero *Enterococcus*. Foram realizados testes convencionais, seguindo as recomendações de Facklam & Collins (1989) e Facklam et al (2002), que incluíram coloração de Gram e as seguintes provas bioquímicas: produção da catalase, hidrólise da L-pirrolidonil-β-naftilamida (PYR, Probac), hidrólise da esculina na presença de bile, multiplicação em Caldo Tripticaseína de Soja (TSB, Oxoid) com 6,5% de NaCl, crescimento em TSB a 45°C e 10°C e, multiplicação em TSB com pH ajustado em 9.6.

Confirmação Molecular do gênero *Enterococcus* sp. e da espécie *Enterococcus faecalis*

As amostras bacterianas foram semeadas em caldo BHI e incubadas a 37°C durante 24 horas. A partir dessa suspensão, o DNA total foi extraído pelo sistema de purificação (Kit Nucleospin Tissue 50r, Macherey Nagel, Düren, Alemanha), conforme instrução do fabricante e, a qualidade e integridade do DNA foram verificadas em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo (0,5 µg ml⁻¹).

A confirmação do gênero *Enterococcus* foi realizado pela presença do gene *tuf*, detectado pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), de acordo com protocolo descrito por Ke et al (1999), utilizando os primers: Ent 1 (5'TACTGACAAACCATTTCATGATG3') e Ent 2 (5'AACTTCGTCACCAACGCGAAC3').

O fragmento esperado após a amplificação era de 112 pares de base (pb). As reações de amplificação foram realizadas em termo-ciclador (Applied Biosystems - Veriti) num volume total de 25 µl contendo: 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.2 mM dNTPs, 0.2 µM de cada primer, 1.0 U de *Taq* polymerase, 25ng de DNA de cada amostra. Foi utilizado um ciclo de 94°C durante 3 minutos, seguidos por 30 ciclos de 94°C por um minuto, 55°C por um minuto, 72°C por um minuto e, um ciclo final de 72°C por cinco minutos.

A identificação da espécie *E. faecalis* foi realizada pela amplificação do gene *ddl_{E.faecalis}* que codifica as ligases D-alanina, espécie-específica, segundo Dutka-Malen et al (1995). Os primers utilizados foram: E₁ (5'ATCAAGTACAGTTAGTCT3') e E₂ (5'ACGATTCAAAGCTAACTG3'), gerando um produto de 941pb. As reações de amplificação foram realizadas com volume final de 25 µl contendo: 25 pmol de cada primer, 0,2mM dNTPs, 2mM de tampão contendo MgCl₂, 0,625 U de *Taq* polimerase e 60 ng de cada DNA. Foi utilizado um ciclo de 94° por 2 minutos, seguidos de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 54°C por um minuto, 72°C por um minuto e um ciclo final de 72°C por dez minutos. Em ambas as reações de amplificação foram utilizadas como controle positivo a cepa padrão de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e como controle negativo água bidestilada.

Alíquotas dos produtos de amplificação foram acrescidas do corante Blue Green Loading Dye I (LGC Biotecnologia, São Paulo), separados em géis de agarose 1,5%, em tampão Tris-borato-EDTA e fotografados sob luz ultravioleta, em transiluminador.

Teste de sensibilidade a antimicrobianos em isolados de *Enterococcus*

Os isolados de *Enterococcus* sp. obtidos a partir das carcaças na etapa de pré-resfriamento, em cada ciclo de amostragem, foram testados quanto à resistência aos antimicrobianos, pelo teste de difusão em ágar Müller-Hinton (Oxoid), realizado e interpretado de acordo com as normas do documento M100-S22 do "*Clinical and Laboratory Standards Institute*" (CLSI, 2012). Foram selecionados para o teste nove agentes antimicrobianos, representado a classe dos principais princípios ativos utilizados na terapia em humanos: Ampicilina (10 µg), Ciprofloxacina (5 µg), Cloranfenicol (30 µg), Eritromicina (15 µ), Teicoplanina (30 µg), Tetraciclina (30 µg) e Vancomicina (30 µg) da Oxoid

(Hampshire, Reino Unido) e, Estreptomicina (300 µg) e Gentamicina (120 µg) da CEFAR – Diagnóstico Ltda (São Paulo, Brasil).

Os isolados que apresentaram perfil intermediário e resistente, no teste de disco-difusão, frente aos antimicrobianos ciprofloxacina e eritromicina foram confirmados pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Os isolados resistentes e intermediários a ciprofloxacina foram submetidos ao teste de microdiluição em ágar conforme recomendações do documento M100-S15 (CLSI, 2009). Os isolados resistentes e intermediários à eritromicina, foram testados pelo Etest® (*BioMérieux, Marcy l'Étoile, France*), realizado de acordo com as recomendações do fabricante.

Para controle dos testes foram utilizadas as cepas padrão: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 para o método de diluição, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 para o Etest e, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 para o método de disco difusão.

Análise estatística

Os resultados de isolamento de *Enterococcus* sp. foram analisados quanto à frequência de resistência á antimicrobianos encontrada nas carcaças, na etapa de pré-resfriamento, em cada matadouro-frigorífico amostrado através do teste não-paramétrico qui-quadrado (χ^2). As contagens de *Enterococcus* obtidas nas carcaças de cada matadouro-frigorífico foram transformadas em logaritmo (\log_{10}) e analisadas pelo teste de ANOVA. As médias obtidas foram comparadas pelo teste de Tukey-Kramer (múltiplas médias). Para as análises foi utilizado programa estatístico SPSS versão 1.8, com nível de confiança de 95%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de carcaças amostradas na etapa de pré-resfriamento, 240/252 (95,23%) apresentaram colônias presuntivas do gênero *Enterococcus*. Dentre as 84 carcaças amostradas em cada um dos frigoríficos (A, B, C), houve isolamento de colônias presuntivas do gênero, respectivamente em 100%, 88,1% e 97,1%. A presença do gênero *Enterococcus* na microbiota do trato gastrointestinal de animais explica a sua ocorrência em carcaças suínas

(AARESTRUP et al., 2002) e, uma vez que são capazes de resistir a diversos processos tecnológicos de preparação e preservação dos alimentos (GIRAFFA, 2003), podem chegar até a mesa do consumidor. O gênero *Enterococcus* é frequentemente isolado a partir de alimentos, especialmente os de origem animal (VELENZUELA et al., 2009), tais como, carne bovina, aves e carcaças de suínos (AARESTRUP et al., 2002; KLEIN et al., 2003), sendo que a contaminação desses alimentos pode ocorrer durante o processo de abate ou durante as fases de processamento, estocagem e comercialização (TIECCO, 1992).

A elevada prevalência em produtos cárneos pode ser também constatada na amostragem conduzida durante Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e Resistência Bacteriana em Frangos (ANVISA, 2008), quando *Enterococcus* foi isolado a partir de 98,7% das carcaças de frango congeladas. Em estudo conduzido no sul do Brasil, Riboldi et al (2009) relataram a presença de *Enterococcus* em 54,6% das amostras de carne, vegetais e derivados de leite analisadas. Na Turquia, Kasimoglu-Drogu et al (2010) constataram a presença de *Enterococcus* sp. em 78% das carcaças de frango; enquanto Pavia et al. (2000) isolaram esse micro-organismo em 45% de amostras de carne comercializadas em Catanzaro, Itália. Esses resultados demonstram a ampla distribuição desse gênero em alimentos, porém de acordo com a ICMSF (*International Commission on Microbiological Specifications for Foods*), *Enterococcus* spp. são classificados como micro-organismos que conferem risco baixo à saúde do consumidor, sendo mais relacionado à maturação de produtos lácteos ou à deterioração de cárneos (FORSYTHE, 2002; SILVA, 2002).

Das 240 colônias típicas isoladas e analisadas por testes fenotípicos e por PCR, todas confirmaram pertencer ao gênero de *Enterococcus*. Por meio da amplificação do gene codificador da D-alanina-ligase (*ddl_{faecalis}*), constatou-se que a espécie prevalente nas amostras de carcaça suína foi *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), constituindo 90,83% (218/240) dos isolados. Os demais 9,16% (22/240) não foram identificados até espécie e foram classificados como *Enterococcus* sp. Em humanos e animais, *E.faecalis* e *E.faecium* são as espécies mais frequentemente encontradas (DEVRIESE et al., 2006), assim como em produtos de origem animal (GIRAFFA, 2003; POETA et al., 2006;

GOMES et al., 2008; RIBOLDI et al., 2008). Gama et al. (2008) avaliaram a presença de *Enterococcus* sp. em alimentos e em diferentes processos infecciosos diagnosticados em unidades hospitalares, e identificaram *E. faecalis* como a espécie mais prevalente, ocorrendo em 88,4% dos alimentos e em 92,3% das amostras clínicas. Bender et al (2009) observaram a presença de *E. faecalis* em 93,6% e *E. faecium* em 4,4% dos isolados de amostras clínicas de humanos em hospitais de Porto Alegre. Resultados similares foram verificados por Aslam et al. (2012) em estudo realizado em carnes compradas no varejo, em Alberta, Canadá, no qual *E. faecalis* foi isolado a partir de 86% das amostras de carne suína, 73% de carne bovina e em 94% de carne de aves. Medeiros (2011), em estudo conduzido em carne suína, frango, vegetais e derivados do leite, identificou 75,7% de isolados de *E. faecalis*, enquanto 22,9% foram classificados como *E. faecium*.

Em termos de contagem média do gênero *Enterococcus* nas carcaças, nos três matadouros-frigoríficos amostrados, observou-se variação entre $1,02 \times 10^0$ e $1,90 \times 10^2$ (Tabela 1), sendo que as contagens de *Enterococcus* sp. foram significativamente mais elevadas no frigorífico C.

Tabela 1 – Contagem de *Enterococcus* sp. em carcaças amostradas na etapa de pré-resfriamento em três matadouros-frigoríficos (A, B, C) de Santa Catarina, 2010-2011.

Matadouro-frigorífico (Amostragem)	Mínima	Máxima	Média	
	UFC.cm ⁻²	UFC.cm ⁻²	UFC.cm ⁻²	log.cm ⁻²
A(1)	$1,05 \times 10^0$	$9,75 \times 10^2$	$1,02 \times 10^0$	0,0096 ^{a*}
A(2)	$1,30 \times 10^0$	$8,25 \times 10^1$	$1,12 \times 10^1$	1,0475 ^b
B(1)	$2,75 \times 10^0$	$7,50 \times 10^1$	$3,13 \times 10^1$	1,4955 ^c
B(2)	$2,50 \times 10^0$	$2,55 \times 10^2$	$3,42 \times 10^1$	1,5343 ^c
C(1)	$1,25 \times 10^1$	$7,50 \times 10^2$	$1,30 \times 10^2$	2,1153 ^d
C(2)	$7,50 \times 10^0$	$5,75 \times 10^2$	$1,90 \times 10^2$	2,2790 ^d

UFC= Unidades Formadoras de Colônia; log=logaritmo base 10

*Letras minúsculas distintas nas colunas indicam diferença significativa ($P < 0,05$) entre as médias.

Enterococcus sp. tem sido proposto como indicador de contaminação fecal em água, ou de processamento inadequado dos alimentos (KLEIN, 2003). Uma característica importante deste gênero bacteriano é a capacidade de sobrevivência no ambiente e a resistência à temperatura, mudança de pH e concentração de sal. Além disso, é capaz de sobreviver por longos períodos fora do ambiente intestinal do hospedeiro (KÜHN et al., 2000). Entretanto, há

restrições quanto à utilização dos *Enterococcus* como indicadores de contaminação fecal em alimentos, principalmente pelo fato de ser encontrado em outros ambientes, além do trato intestinal, e apresentar sobrevivência maior em relação aos enteropatógenos no solo, vegetais e em alimentos, principalmente naqueles submetidos à desidratação, ação de desinfetantes e flutuações de temperatura. Apesar destas limitações, sua presença em número elevado em alimentos indica práticas higiênicas inadequadas, exposição do alimento às condições que permitiram a multiplicação de microrganismos, ou tratamento térmico inadequado durante o processamento (FRANCO, 2003). Não há um parâmetro máximo proposto para *Enterococcus* em alimentos ou carcaças na legislação brasileira, porém os resultados encontrados em nosso estudo foram inferiores aos relatados por Gomes (2007) que detectou 3 log UFC/g de enterococos em produtos cárneos, e Pavia et al. (2000) relataram que de $2,0 \times 10^1$ a $8,0 \times 10^3$ UFC/g em carnes comercializadas na Itália. Esse resultado leva a supor que as carcaças haviam sido processadas dentro de condições higiênicas satisfatórias.

Entretanto, mais do que o papel como indicador da presença de patógenos, o gênero *Enterococcus* tem assumido importância em alimentos de origem animal, por serem reservatórios de genes de resistência que podem chegar até à população humana via cadeia alimentar (BERTRAND et al., 2000; AAESTRUP et al., 2007; DZIDIC et al., 2008; JENSEN et al., 2011). A primeira publicação que demonstrou que granjas de suínos e aves que utilizavam a avoparcina apresentavam maior prevalência de *Enterococcus* resistentes à vancomicina (ERV_s) foi realizada na Dinamarca (BAGER et al., 1997). A semelhança estrutural da avoparcina e da vancomicina foi apontada como a explicação para a pressão de seleção para o surgimento de ERV_s (TITZE-DE-ALMEIDA & PALERMO-NETO, 2005). Alguns estudos tem demonstrado que a frequência de resistência de enterococos de origem animal à vancomicina tem diminuído após a proibição do uso da avoparcina como promotor de crescimento (AARESTRUP et al., 2001; BOERLIN et al., 2001). No presente estudo, não foram observados isolados resistentes aos glicopeptídeos selecionados, teicoplanina e vancomicina, assim como à ampicilina (Tabela 2). Em relação à vancomicina, esse resultado pode ser explicado pela medida tomada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) em

1998, que vetou o uso da avoparcina na produção animal (BRASIL, 1998). Resultados similares foram observados no monitoramento realizado no PREBAF, onde isolados de *Enterococcus* oriundos de carcaças de frango apresentaram sensibilidade frente à ampicilina e apenas 1% foi resistente à vancomicina e à teicoplanina (ANVISA, 2008). Em termos de resistência à vancomicina em isolados de infecção hospitalar no Brasil, observa-se que há predomínio de cepas de *E. faecalis* resistentes, porém essas cepas não são encontradas na comunidade e não parecem ter origem da população animal (ROSSI, 2011). Também em relação à ampicilina, os dados colhidos em isolados de *E. faecalis* de humanos indicam uma baixa prevalência de resistência (CONCEIÇÃO et al., 2011).

Tabela 2 – Frequência de resistência a antimicrobianos de *Enterococcus* isolados de carcaças na etapa de pré-resfriamento, em três matadouros-frigoríficos (A, B, C) de Santa Catarina, 2010-2011.

	A		B		C		A, B, C		P valor
	n = 84		n = 74		n = 82		n = 240		
	R (%)	I (%)	R (%)	I (%)	R (%)	I (%)	R (%)	I (%)	
Ampicilina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ciprofloxacina	3,6	13,1	17,6	9,5	20,7	8,5	13,8	10,4	0,018
Cloranfenicol	27,4	3,6	2,7	1,4	4,9	2,4	12,1	2,5	<0,001
Eritromicina	41,7	42,9	10,8	20,2	25,6	25,6	26,7	30,8	<0,001
Estreptomicina (HLAR)	34,5	-	6,8	-	18,3	-	20,4	-	<0,001
Gentamicina (HLAR)	17,9	-	2,7	-	9,8	-	10,4	-	0,008
Teicoplanina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tetraciclina	45,2	-	48,6	2,7	34,1	2,4	42,5	1,7	0,209
Vancomicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-

R: resistente; I: intermediário

Por outro lado, foi observada resistência à tetraciclina (42,5%), eritromicina (26,7%), estreptomicina (20,4%), ciprofloxacina (13,8%), cloranfenicol (12,1%) e gentamicina (10,4%) (Tabela 2). As tetraciclina são agentes bacteriostáticos amplamente utilizados na terapia humana e na medicina veterinária (NEELA et al., 2009). A resistência à tetraciclina é um dos fenótipos de resistência adquirida mais presente em *Enterococcus* isolados de alimentos ou de amostras clínicas (AARESTRUP et al., 2000; BUTAYE et al., 2000; PAVIA et al., 2000; ABRIQUEL et al., 2008; DZIDIC et al., 2008; VALENZUELA et al., 2009). Embora a tetraciclina seja um antimicrobiano não

aprovado como suplemento alimentar para animais desde 1992, no Brasil seu uso profilático é comum, e diante disso, *Enterococcus* resistentes podem ser explicados (HAYES et al., 2003; MICHALOVA et al., 2004; FRAZON et al., 2009). Aarestrup et al., (2000) observaram 95% dos isolados resistentes a tetraciclina e 85% a eritromicina em *E. faecalis* e *E. faecium* isolados de humanos, aves e suínos. D’Azevedo et al. (2004) relataram que 92,5% dos enterococos, isolados de ambiente hospitalar em Porto Alegre, foram resistentes a tetraciclina, 46,2% a eritromicina, 19,2% a estreptomicina (HLAR), 4,6% a ciprofloxacina e 2,9% ao cloranfenicol. Por outro lado, em estudo conduzido em hospital terciário de Minas Gerais, as frequências de resistência foram superiores, alcançando 80,6% de isolados resistentes a eritromicina e 61,2% a ciprofloxacina (CONCEIÇÃO et al., 2011).

Os isolados que apresentaram perfil intermediário e resistente aos antimicrobianos, ciprofloxacina e eritromicina, no teste de disco-difusão, foram submetidos à determinação da concentração inibitória mínima (CIM), cujos resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) de isolados de *Enterococcus* sp. intermediários e resistentes à ciprofloxacina e eritromicina no teste de disco-difusão.

Antimicrobiano CIM µg/mL	Perfil	n	Número de cepas com CIM (µg/mL) de:															
			1.0	1.5	1.56	2.0	3.0	3.12	4.0	6.0	6.25	12	12.5	25	32	50	64	256
Ciprofloxacina (0,003 - 50)	I	25			25													
	R	33						15			1		1	3		13		
Eritromicina (0,012 - 256)	I	74	22	18		16	16		2									
	R	64									3		1			1		1

Linhas indicam ponto de corte para resistência; n igual ao número de cepas; I cepas intermediárias; R cepas resistentes.

Observa-se que os isolados que apresentaram resistência no teste de disco-difusão foram confirmados pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Em relação à determinação da CIM frente ao antimicrobiano ciprofloxacina, das 25 cepas intermediárias no teste de disco-difusão, todas apresentaram valor de CIM limítrofe máximo (1.56 µg/mL), entre a sensibilidade e resistência, enquanto nas 74 cepas intermediárias frente à eritromicina, apenas duas apresentaram valor limítrofe. Por outro lado, das 64 cepas confirmadas como resistentes à eritromicina, 58 apresentaram valor de

CIM \geq 256 μ g/mL. Esses resultados indicam uma tendência das cepas intermediárias à ciprofloxacina em direção ao grupo das cepas resistentes, provavelmente em virtude do uso frequente de quinolonas nas granjas. A mesma tendência não é observada em relação à eritromicina, porém chama a atenção que as cepas resistentes apresentam tolerância á doses elevadas desse antimicrobiano. O principal mecanismo de resistência aos macrolídeos nos *Enterococcus* é conferido pela metilação da adenina na porção 23S da subunidade 50S do RNA ribossomal, codificada pelos genes *erm* (eritromicina ribossomo metilase) (CAUWERTS et al., 2007; EMANIENI et al., 2008; SCHWAISSER & BAUER, 2008; ZOU et al., 2011). Os genes *erm* conferem resistência cruzada ao grupo macrolídeo-lincosamidas-estreptograminas (MLS_B), importantes alternativas de tratamento das infecções em humanos (LEENER et al., 2004; SCHAWAIGER & BAUER, 2008; ZOU et al., 2011) e, podem ser expressos como constitutíveis ou induzíveis (GEGUIRÉ, 2010).

As frequências de resistência frente aos antimicrobianos variaram de acordo com o matadouro-frigorífico amostrado (Tabela 2). No frigorífico A, foram encontradas frequências significativamente maiores ($P < 0,05$) de isolados resistentes ao cloranfenicol, eritromicina e estreptomicina (HLAR), no frigorífico B as frequências de resistência foram significativamente maiores frente à ciprofloxacina, eritromicina e estreptomicina (HLAR) e no frigorífico C frente à eritromicina, ciprofloxacina e estreptomicina (HLAR). Em relação à tetraciclina não foi observada diferença nas frequências de resistência entre os três matadouros-frigoríficos. As diferenças observadas estão provavelmente relacionadas à diferença de pressão de seleção entre agroindústrias, ocasionada pelos diferentes protocolos de uso de antimicrobianos.

Na produção animal, o aparecimento de cepas resistentes está associado principalmente ao uso intensivo de antimicrobianos (AARESTRUP et al., 2000; BATAYE et al., 2000; AARESTRUP et al., 2001; MCDERMOTT et al., 2002; MATHEW et al., 2007; HAMMERUM et al., 2010). Em contrapartida, a redução da resistência pode ser alcançada quando a pressão seletiva é removida, conforme observou Aarestrup et al. (2001) em *Enterococcus* isolados de alimentos de origem animal após a suspensão do uso de agentes antimicrobianos (avilamicina, eritromicina, vancomicina e virginiamicina) na produção animal. Nessa linha, recentemente o uso de eritromicina como

promotor de crescimento foi banido no Brasil (BRASIL, 2012), com o intuito de evitar a seleção de cepas altamente resistentes como as observadas em nosso estudo.

A preocupação em relação à presença de cepas resistentes na criação animal ocorre, principalmente, devido ao risco de transferência de microorganismos multi-resistentes e seus elementos genéticos móveis para humanos seja através da cadeia alimentar, contato direto com os animais, ou, até mesmo, pela contaminação do ambiente (AARESTRUP et al., 2000; AARESTRUP et al., 2001, CASEWELL et al., 2003; ASLAM et al., 2012). São conhecidas duas formas importantes de transferência de cepas resistentes á antimicrobianos de animais aos seres humanos: uma direta quando bactérias resistentes infectam os seres humanos; e outra indireta quando os genes de resistência são transferidos horizontalmente à população bacteriana humana a partir da cadeia alimentar (LEENER et al., 2005; HENKES, 2010).

A propagação zoonótica de resistência antimicrobiana de estirpes de *Enterococcus* sp. tem se tornado uma preocupação em saúde pública (ZOU et al., 2011). Nesse caso, os resultados demonstram que há comportamento distinto entre as espécies. No caso de *E. faecium*, isolados de origem animal ou alimentos e aqueles associados à infecções humanas pertencem á diferentes grupos clonais, indicando que não há colonização prolongada em humanos de estirpes bacterianas proveniente de animais (HAMMERUM, 2012). Entretanto, evidências de transferência de genes de resistência à vancomicina entre cepas de origem animal e de humanos, tanto no intestino de camundongos como no de humanos voluntários, foram encontradas (LESTER et al., 2006; LESTER & HAMMERUM, 2010). Em relação á *E. faecalis*, a situação parece ser diferente, pois uma elevada similaridade de pulsotipos e perfis de multilocus sequence typing (MLST) foi encontrada entre isolados de suínos e humanos (LARSEN et al., 2011), o que leva a supor que essa espécie possa oferecer risco de colonização direta aos humanos. Considerando que, em nosso estudo, a espécie *E. faecalis* foi a mais prevalente, a possibilidade de transmissão de isolados resistentes pela cadeia produtiva de suínos não pode ser descartada.

As infecções humanas são a primeira preocupação no que se refere à ingestão de alimentos contaminados com bactérias resistentes. Uma bactéria

resistente que contamina a carcaça durante o abate e ultrapassa as barreiras existentes durante o processamento do alimento, pode colonizar e multiplicar-se no trato gastrointestinal do consumidor, modificando o perfil de resistência de sua microbiota intestinal (WITHE, 1998; APLEY et al., 2001; DZEDIC et al., 2008; BOERLIN & WHITE, 2010). Larsen et al (2011) demonstraram que a emergência da resistência de *E. faecalis* à alto nível gentamicina (HLGR) em pacientes com endocardite infecciosa, coincidiu com o aumento dessa resistência em isolados da população de suínos na Dinamarca e, que a maioria dos isolados pertenciam ao mesmo grupo clonal, sugerindo dessa forma os suínos como reservatórios de *E. faecalis* HLGR. Pendersen (1999) enfatizou o risco da resistência cruzada da tilosina e espiramicina à eritromicina; e da virginiamicina às estreptograminas. Boerlin et al (2001) demonstraram a clara diminuição na resistência à eritromicina e tetraciclina de enterococos isolados das fezes de suínos, após a proibição da tilosina como promotor de crescimento na Suíça.

O uso de antimicrobianos associados à ração gera uma pressão seletiva resultando em cepas multi-resistentes, as quais podem ser liberadas no ambiente e contribuir para disseminação destes genes (SENGELØV et al., 2003). No entanto, McKellar (1998) salienta que o banimento de antimicrobianos teria efeito prejudicial na indústria animal. No cenário atual, observa-se que o assunto permanece polêmico, principalmente pelo fato do banimento obrigar à mudança no manejo dos animais, podendo levar á perdas produtivas numa lógica de produção intensiva (BLAHA, 2012). Por outro lado, esse movimento parece ser irreversível, principalmente pelo fato da percepção do consumidor em vários países ser favorável ao não-uso de antimicrobianos (MILLET, 2010). Por esse motivo, é de grande importância que estudos continuem sendo conduzidos, com o intuito de monitorar a resistência bacteriana em diversas etapas da produção animal, o que no futuro permitirá analisar o risco oferecido ao consumidor pelos produtos brasileiros de origem animal.

CONCLUSÃO

O gênero *Enterococcus* está presente em carcaças suínas na etapa de pré-resfriamento, sendo a espécie *E. faecalis* a mais encontrada. Apesar de

existirem isolados resistentes á antimicrobianos usados na terapêutica humana, os resultados indicam que isolados resistentes á vancomicina, teicoplanina e ampicilina não estão presentes em carcaças suínas nos abatedouros estudados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F. M.; BAGER, F.; ANDERSEN, J.S. The association between the use of avilamycin for growth promotion and the occurrence of resistance among *Enterococcus faecium*. **Microbial Drug Resistance**, v.6, p.71–76, 2000.

AARESTRUP, F.M.; BUTAYE, P.; WITTE, W. Nonhuman reservoirs of Enterococci. *In*: GILMORE, M.S. **The Enterococci – Pathogenesis, Molecular Biology and Antimicrobial Resistance**. Washington, D.C.: ASM PRESS, 2002.

AARESTRUP, F.M.; HENDRIKSEN, R.S.; LOCKETT, J.; GAY, K.; TEATES, K.; MCDERMOTT, P.F.; WHITE, D.G.; HASMAN, H.; SØRENSEN, G.; BANG, T.R.A.; KULMONTH, H.; PAMREONGWONG, S.; PULSRIKARN, C.; ANGULO, F.J.; GERNER-SMIDT, P. International spread of multidrug-resistant *Salmonella* schwarzengrund in food products. **Emerging Infectious Disease**, 13, 726-731, 2007.

AARESTRUP, F.M; SLYFARTH, A.M.; EMBORG, H.; PENDERSEN, K.; HENDRIKSEN, R.S.; BAGER, F. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p.2054-2059, 2001.

ABRIOUEL, H.; BEM OMAR, N.; COBO MOLINOS, A.; LUCAS LÓPEZ, R.; GRANDE, M.J.; MARTÍNEZ-VIEDMA, P.; ORTEGA, E.; MARTÍNEZ-CAÑAMERO, M.; GÁLVEZ. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. **Journal Food Microbiology**. v.123: 38-49, 2008.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frangos – PREBAF**, 2008.

APLEY, M. et al., Role of veterinary therapeutics in bacterial resistance development: Animal and public perspectives. **JAVMA**, 212:1209-1213, 2001.

ASLAM, M.; DIARRA, M.S.; MASSON, L. Characterization of antimicrobial resistance and virulence genotypes of *Enterococcus faecalis* recovered from a pork processing plant. **Journal of Food Protection**, August 75 (8):1486-1491, 2012.

ASLAM, M.; DIARRA, M.S.; REMPEL, H. Characterization of antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. From commercial beef processing plant. **Foodborne Pathogens Disease**, v.7, n3, p. 235-41, 2010.

BATAYE, P.; DEVRIESE, L.A.; HAESBROUCK, F. Incomplete cross resistance against Ionophores in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* Strains from pigs and Poultry. **Microbiology Drug Resistance**, v.6, n.1, p.59-61, 2000.

BENDER, E.A.; FREITAS, A.L.P.; REITER, K.C.; LUTZ, L.; BARTH, A.L. Identification, antimicrobial resistance and genotypic characterization of *Enterococcus* spp. isolated in Porto Alegre, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 40: 693-700, 2009.

BERTRAND, X.; MULIN, B.; VIEL, J.F.; THOUVEREZ, M.; TALON, D. Common PFGE patterns in antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* from humans and cheeses. **Food Microbiology**, v.17, p.543-551, 2000.

BLAHA, T. European experiences on the restriction of antibiotics and growth promoters in pig production. In: **VII SINSUI – Simpósio Internacional de Suinocultura**, 2012.

BOERLIN, P.; WHITE, D.G. Resistência antimicrobiana e sua epidemiologia. . In: GIGUÉRE, S.; PRESCOTT, J.F.; BAGGOT, J.D.; WALKER, R.D.; DOWLING, P.M. **Terapia Antimicrobiana em Medicina Veterinária**, 4ª edição, São Paulo: Roca, 2010.

BOERLIN, P.; WISSING, A.; AARESTRUP, F.M.; FREY, J.; NICOLET, J. Antimicrobial growth promoter ban and resistance to macrolides and vancomycin in Enterococci from pigs. *Journal Clinical Microbiology*, 39(11): 4193-4195, 2001.

BORCH, E. NESBARREN, T.; CHRISTENSEN, H. Hazard identification in swine slaughter whit respective to foodborne bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, n.30, p.9-25, 1996.

BRASIL MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa n.14 de 17 de maio de 2012. Disponível em www.agricultura.br/sislegis

BRASIL MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Portaria SVS/MS 818 de 16 de outubro de 1998. Disponível em www.agricultura.br/sislegis

CASEWELL, M.; FRIIS, C.; MARCO, E.; MCMULLIN, P.; PHILIPS, I. the European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, 52(2), p.159-161, 2003.

CASSENEGO, A.P.V.; D'AZEVEDO, P.A.; RIBEIRO, A.M.L.; FRAZZON, J.; VANDER SAND, S.T.; FRAZZON, A.P.G. Species distribution and antimicrobial susceptibility of *Enterococcus* isolated from broilers infected experimentally with

Eimeria spp. And fed with diets containing different supplements. **Brazilian Journal of Microbiology**, 42: 480-488, 2011.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Normas de desempenho para Teste de Sensibilidade Antimicrobiana: 15^o Suplemento Informativo, **CLSI/M100-S15**, volume 25, n^o 1, 2009.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational supplement, **CLSI/ M100-S22**, volume 32, n^o 3, 2012.

CONCEIÇÃO, N.; OLIVEIRA, C.C.H.B.; SILVA, P.R.; ÁVILA, B.G.H; OLIVIERA, A.G. Trends in antimicrobial resistance among clinical isolates of enterococci in a Brazilian tertiary hospital: 4-years study. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 44(2): 177-181, 2011.

DE LEENER, E.; MARTEL, A.; DECOSTERE, A.; HAESBROUCK, F. Distribution of the *erm(B)* gene, tetracycline resistance genes, and Tn 1545-like transposons in macrolide-and lincosamide-resistant enterococci from pigs and humans. **Microbiology Drug Resistant**. 4, 341-345, 2004.

DEVRIESE, L.A.; BAELE, M.; BUTAYE, P. The genus *Enterococcus*: Taxonomy. **Prokaryotes**, v.4, p.163-174, 2006.

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

DZIDIC, S.; SUSKOVI, C.J.; KOS BLAZENKA, B. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Biochemical and genetic aspects. **Food Technology and Biotechnologic**. 46(2), 11-21, 2008.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre. Artimed. 424 p. 2002.

FRACALLANZA, S.A.P.; SCHEIDEGGER, E.M.D.; SANTOS, P.F.D.; LEITE, P.C.; TEIXEIRA, L.M. Antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from poultry, meat and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, n.7, p.853-859, 2007.

FRAZZON, A.P.G.; GAMA, B.A.; HERMES, V.; BIERHALS, C.G.; PEREIRA, R.I.; GUEDEZ, A.G.; D'AZEVEDO, P.A.; FRAZZON, J. Prevalence of antimicrobial resistance and molecular characterization of tetracycline resistance mediated by *tet(M)* and *tet(L)* genes in *Enterococcus* spp. Isolated from food in Southern Brazil. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.26, p.365-370, 2010.

GEGUÉRE, S. Macrolídeos, Azalídeos e Cetolídeos. In: GIGUÉRE, S.; PRESCOTT, J.F.; BAGGOT, J.D.; WALKER, R.D.; DOWLING, P.M. **Terapia Antimicrobiana em Medicina Veterinária**, 4^a edição, São Paulo: Roca, 2010.

GILMORE, M.S. Enterococcal virulence. *In*: GILMORE, M.S. **The Enterococci – Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance**. Washington, D.C.: ASM PRESS, 2002.

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

GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. **Internacional Journal Food Microbiology**. 88: 215–222, 2003.

GOMES, B.C.; ESTEVES, C.T.; PALAZZO, I.C.V.; DARINI, A.L.C.; FELIS, G.E.; SECHI, L.A.; FRANCO, B.D.G.M.; MARTINIS, E.C.P. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. Isolated from Brazilian foods. *Food Microbiology*, v.25, p.668-675, 2008.

HAMMERUM, A.M. Enterococci of animal origin and their significance for public health. **Clinical Microbiology and Infection**, 10.1111/jl469-0691.2012.03829.x, 2012.

HAMMERUM, A.M.; LESTER, C.H.; HEUER, O.E. Antimicrobial-resistant enterococci in animals and meat: a human health hazard? **Foodborne Pathogens Disease**, 7: 1137-1146, 2010.

HAYES, J.R.; ENGLISH, L.L.; CARTER, P.J.; PROESCHOLET, T.; LEE, Y.L.; WAGNER, D.D; WHITEID, G. Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from retail meats. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.12, p.7153-7160, 2003.

HENKES, W.E. Identificação de *Enterococcus* sp. e resistência a antimicrobianos em amostras de regiões costeiras da lagoa dos patos. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, 2010.

JENSEN, V.F.; EMBORG, H-D.; AARESTRUP, F.M. Indications and patterns of therapeutics use of antimicrobial agentes in Danish pig productions from 2002 to 2008. **Journal Veterinary Pharmacologic and Therapeutics**, 35, 33-46, 2011.

KASEMOGLU-DOGRU, A.; GENÇAY, Y.E.; AYAS, N.D. Prevalence and antibiotic resistance profiles of *Enterococcus* species in chicken at slaughter level, absence of *van A* and *van B* genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. **Research in Veterinary Science**, v.89, p.153-158, 2010.

KE, D.; PICARD, F.J.; MARTINEAU, F.; MÉNARD, C.; ROY, P.H.; OUELLETTE, M.; BERGERO, M.G. Development of a PCR assay for rapid detection of Enterococci. **Journal Clinical Microbiolgy**, v. 37, 3497-3503, 1999.

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

LARSEN, J.; SCHONHEYDER, H.C.; SINGH, K.V.; et al. Porcine and human community reservoirs of *Enterococcus faecalis*, Denmark. **Emerging Infectious Diseases**, 17:2395-97, 2011.

LESTER, C.H.; FRIMODT-MOLLER, N.; SORENSEN, T.L.; MONNET, D.L.; HAMMERUM, A.M. In vivo transfer of the *vanA* resistance gene from *Enterococcus faecium* isolate of animal origin to an *E. faecium* isolate of human origin in the intestines of human volunteers. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, 50:596-99, 2006.

LESTER, C.H.; HAMMERUM, A.M. Transfer of a *vanA* from an *Enterococcus faecium* isolate of chicken origin to a CC17 *E. faecium* isolate in the intestine of cephalosporin-treated mice. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, 65:1534-36, 2010.

MCKELLAR, Q.A. Antimicrobial resistance: a veterinary perspective. **Brazilian Medical Journal**, 317, 610-611, 1998.

MEDEIROS, A.W.; D'AZEVEDO, P.A.; PEREIRA, R.I.; CASSENEGO, A.P.V.; VAN DER SAND, S.; FRAZZON, J.; FRAZZON, A.P.G. PCR-RFLP 16s ribosomal DNA to confirm the *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus* identification isolated from clinical and food samples. **Brazilian Society for Tropical Medicine**, 2010.

MICHALOVA, E.; NOVOTNA, P.; SCHLEGELOVA, J. Tetracycline in veterinary medicine and bacterial resistance to them. **Veterinary Medicine Czech**, v.49, p.79-100, 2004.

MILLET, S. The European ban on antibiotic growth promoters in animal feed: From challenges to opportunities. **The Veterinary Journal**, 2010.

PAVIA, M.; NOBILE, C.G.A.; SALPIETRO, L.X.; ANGELILLO, I. Vancomycin resistance and antibiotic susceptibility of enterococci in raw meat. **Journal of Food Protection**, v.63, p.912-915, 2000.

PENDERSEN, K.B. Some growth promoters in animals do confer antimicrobial resistance in humans. **Brazilian Medical Journal**, 318: 1076, 1999.

POETA, P.; COSTA, D.; RODRIGUES, J.; TORRES, C. Antimicrobial resistance and the mechanisms implicated in faecal enterococci from healthy humans, poultry and pets in Portugal. **International Journal Antimicrobial Agents**, v.27, p.131-137, 2006.

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

RIBOLDI, G.P.; MATTOS, E.P.; FRAZZON, A.P.G.; D'AZEVEDO, P.A.; FRAZZON, J. Phenotypic and genotypic heterogeneity of *Enterococcus* species isolated from food in Southern Brazil. **Journal of Basic Microbiology**, v.48, p.31-37, 2008.

SCHWAISSER, K.; BAUER, J. Detection of the Erythromycin rRNA Methylase Gene erm(A) in *Enterococcus faecalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.52, n.8, p.2994-2995, 2008.

SCHWARZ, S.; CHASLUS-DANCLA, E. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. **Veterinary Research**, v.32, p.201-225, 2001.

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

SENGELØV, G.; SØRENSEN, B.B.; AARESTRUP, F. Susceptibility of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecium* isolated from pigs and broilers chickens to tetracycline degradation products and distribution of tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli* from food animals. **Veterinary Microbiology**, 95: 91-101, 2003.

SILVA, M.C.; Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos com a utilização de metodologias convencionais e do sistema simplate. Dissertação de Mestrado em Ciências – Escola Superior de Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

SILVA, N.; IGREJAS, G.; FIGUEIREDO, N.; GONÇALVES, A., RADHOUANI, H.; RODRIGUES, J.; POETA, P. Molecular characterization of antimicrobial resistance in enterococci and *Escherichia coli* isolates from European wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). **The Science of the Total Environment**. 408, 4871–4876, 2010.

TITZÉ-DE-ALMEIDA, R. & PALERMO-NETO, J. Uso de antimicrobianos em Avicultura e o desenvolvimento de resistência bacteriana. In: PALERMO-NETO, J.; SPINOSA, S.L.; GÓRNIK, S.L: **Farmacologia Aplicada à Avicultura**. 1ª Ed. Roca editora, São Paulo, p.161-173, 2005.

TOMA, B.; DUFOUR, B.; SANNA, M.; BENETM, J.J.; MOUTON, F.; LOUZA, A.; ELLIS, P. **Applied Veterinary Epidemiology**, AEEMA, 1999.

VALENZUELA, A.S.; OMAR, N.B.; ABRIQUEL, H.; LÓPEZ, R.L.; VELJOVIC, K.; CÃNAMERO, M.M.; TOPISIROVIC, M.K.L.; GÁLVEZ, A. Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocines in enterococcus from artesian foods of animals origin. **Food Control**, v.20, n.4, p.381-383, 2009.

WITTE, W. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. **Science**, 279:996–997, 1998.

ZOU, L-K.; WANG, H-N.; ZENG, B.; LI, J-N.; LI, X-T.; ZHANG, A-Y.; ZHOU, Y-S.; YANG, X.; XU, C-W.; XIA, Q-Q. Erythromycin resistance and virulence genes in *Enterococcus faecalis* from swine in China. **New Microbiologica**, v.34, p.73-80, 2011.

4. CONCLUSÃO

O gênero *Enterococcus* está presente em carcaças suínas na etapa de pré-resfriamento, sendo a espécie *E. faecalis* a mais encontrada. Apesar de existirem isolados resistentes a antimicrobianos usados na terapêutica humana, os resultados indicam que isolados resistentes a vancomicina, teicoplanina e ampicilina não estão presentes em carcaças suínas nos abatedouros estudados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F. M.; BAGGER, F.; ANDERSEN, J.S. The association between the use of avilamycin for growth promotion and the occurrence of resistance among *Enterococcus faecium*. **Microbial Drug Resistance**, v.6, p.71–76, 2000.

AARESTRUP, F.M.; BUTAYE, P.; WITTE, W. Nonhuman reservoirs of Enterococci. *In*: GILMORE, M.S. **The Enterococci – Pathogenesis, Molecular Biology and Antimicrobial Resistance**. Washington, D.C.: ASM PRESS, 2002.

AARESTRUP, F.M.; HENDRIKSEN, R.S.; LOCKETT, J.; GAY, K.; TEATES, K.; MCDERMOTT, P.F.; WHITE, D.G.; HASMAN, H.; SØRENSEN, G.; BANG, T.R.A.; KULMONTH, H.; PAMREONGWONG, S.; PULSRIKARN, C.; ANGULO, F.J.; GERNER-SMIDT, P. International spread of multidrug-resistant *Salmonella* schwarzengrund in food products. **Emerging Infectious Disease**, 13, 726-731, 2007.

AARESTRUP, F.M.; KRUSE, H.; TAST, E.; HAMMERUM, A.M.; JENSEN, L.B. Associations between agents for growth promotion and occurrence of resistance among *Enterococcus faecium* from broilers and pigs in Denmark, Finland and Norway. **Microbial Drug Resistance**, v.6, n.1, p.63-70, 2000.

AARESTRUP, F.M.; OLIVER-DURAN, C.; BURCH, D.G. Antimicrobial resistance in swine production. **Animal Health Research Review**, v.9, n.2, p.135-148, 2008.

AARESTRUP, F.M.; SLYFARTH, A.M.; EMBORG, H.; PENDERSEN, K.; HENDRIKSEN, R.S.; BAGGER, F. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p.2054-2059, 2001.

ABIPECS. Relatório ABIPECS 2012. **Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína** – ABIPECS. Disponível em <http://www.abipecs.org.br/pt/relatórios.html>. 2012.

ABRIOUEL, H.; BEM OMAR, N.; COBO MOLINOS, A.; LUCAS LÓPEZ, R.; GRANDE, M.J.; MARTÍNEZ-VIEDMA, P.; ORTEGA, E.; MARTÍNEZ-CAÑAMERO, M.; GÁLVEZ. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. **Journal Food Microbiology**. v.123: 38-49, 2008.

ADHIKARI, L. High-level aminoglycoside resistance and reduced susceptibility to vancomycin in nosocomial enterococci. **Journal of Global Infections Disease**. V.2, p.231-235, 2010.

ALEKSUN, M.; LEVY, S. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. **Cell**, 128:1037-1050, 2007.

ALMEIDA, F.S.; RIGOBELLO, E.C.; MARIN, J.M.; MALUTA, R.P.; ÁVILA, F.A. Diarréia suína: estudo da etiologia, virulência e resistência a antimicrobianos de agentes isolados em leitões na região de Ribeirão Preto – São Paulo, Brasil. **ARS Veterinária**. v.23,n3,p.151-157,2007.

ANDRAUD, M.; ROSE, N.; LAURENTIE, M.; SANDERS, P.; LEROUX, A.; CARIOLET, R.; CHAUVIN, C.; JOUY, E. Estimation of transmission parameters of a fluorquinolone-resistant *Escherichia coli* strains between pigs in experimental conditions. **Veterinary Research**, v.42, n.44, p.1-7, 2011.

ANJUM, M.F.; CHOUDHARY, S.; MORRISON, V.; SNOW, L.C.; MAFURA, M.; SLICKERS, P.; EHRICHT, R.; WOODWARD, M.J. Identifying antimicrobial resistance genes of human clinical relevance within *Salmonella* isolated from food animals in Great Britain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.66, n.3, p.550-559, 2011.

ANTONELLO, V.S.; ZENKNER, F.M.; FRANÇA, J.; SANTOS, B.R. *Enterococcus gallinarum* meningitis in na immunocompetent host: a case report. **Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo**, 52(2): 111-112, 2010.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frangos – PREBAF**, 2008

ANVISA – Monitoramento e Prevenção da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde, Brasília, 2006.

APLEY, M. et al., Role of veterinary therapeutics in bacterial resistance development: Animal and public perspectives. **JAVMA**, 212:1209-1213, 2001.

ASLAM, M.; DIARRA, M.S.; MASSON, L. Characterization of antimicrobial resistance and virulence genotypes of *Enterococcus faecalis* recovered from a pork processing plant. **Journal of Food Protection**, August 75 (8):1486-1491, 2012.

ASLAM, M.; DIARRA, M.S.; REMPEL, H. Characterization of antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. From commercial beef processing plant. **Foodborne Pathogens Disease**, v.7, n3, p. 235-41, 2010.

BAGER, F.; MADSEN, M.; CHRISTENSEN, J.; AARESTRUP, F. M. 1997. Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. **Preventive Veterinary Medicine**. 31:95–112, 1997.

BARBOSA, J.; FERREIRA, V.; TEIXEIRA, P. Antibiotic susceptibility of enterococci isolated from tradicional fermented meat products. **Food Microbiology**, v.26, p.527-532, 2009.

BATAYE, P.; DEVRIESE, L.A.; HAESBROUCK, F. Incomplete cross resistance against Ionophores in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains from pigs and poultry. **Microbiology Drug Resistance**, v.6, n.1, p.59-61, 2000.

BAZET, C.; BLANCO, J.; SEIJA, V.; PALÁCIO, R. Enterococcus resistentes a vancomicina. Un problema emergente em Uruguay. **Revista Medica Uruguaya** 21: 151-158, 2005.

BENDER, E.A.; FREITAS, A.L.P.; BARTH, L.A. Avaliação do perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *Enterococcus* spp. isolados em dois hospitais de Porto Alegre – RS, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas**, v.42, n. 1, p.15-19, 2010.

BENDER, E.A.; FREITAS, A.L.P.; REITER, K.C.; LUTZ, L.; BARTH, A.L. Identification, antimicrobial resistance and genotypic characterization of *Enterococcus* spp. Isolated in Porto Alegre, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 40: 693-700, 2009.

BERTRAND, X.; MULIN, B.; VIEL, J.F.; THOUVEREZ, M.; TALON, D. Common PFGE patterns in antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* from humans and cheeses. **Food Microbiology**, v.17, p.543-551, 2000.

BIAVASCO, F.; FOGLIA, G.; PAOLETTI, C.; ZANDRI, G.; MAGI, G.; GUAGLIANONE, E.; SUNDSFJORD, A.; PRUZZO, C.; DONELLI, G.; FACINELLI, B. VanA-type enterococci from humans, animals and food: species distribution, populations structure, Tn1546 typing and location, and virulence determinants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.10, p.3307-3319, 2007.

BILTRÖM, H.; TOP, J.; EDLUND, C.; LUND, B. Frequent occurrence of multidrug-resistant CC17 *Enterococcus faecium* among clinical isolates in Sweden. **Journal Applied Microbiology**: 108, 1810-1816, 2009.

BISMUTH, R.; ZILHAO, R.; SAKA MOTO, H.; GUESDOM, J.L.; COUVARLIN, P. Gene heterogeneity for tetracycline resistance in *Staphylococcus* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.34, n.8, p.1611-1614, 1990.

BLAHA, T. European experiences on the restriction of antibiotics and growth promoters in pig production. In: **VII SINSUI – Simpósio Internacional de Suinocultura**, 2012.

BLAHA, T. The use of antimicrobial substances in food animals: the pig picture. In: **9th International Conference on the Epidemiology and Control of Biological, Clinical and Physical Hazards in Pigs and Pork**, 2011, Maastricht, Anais, v.1, p.131-133, 2011.

BOERLIN, P.; WHITE, D.G. Resistência antimicrobiana e sua epidemiologia. . In: GIGUÉRE, S.; PRESCOTT, J.F.; BAGGOT, J.D.; WALKER, R.D.; DOWLING, P.M. **Terapia Antimicrobiana em Medicina Veterinária**, 4ª edição, São Paulo: Roca, 2010.

BOERLIN, P.; WISSING, A.; AARESTRUP, F.M.; FREY, J.; NICOLET, J. Antimicrobial growth promoter ban and resistance to macrolides and vancomycin in Enterococci from pigs. *Journal Clinical Microbiology*, 39(11): 4193-4195, 2001.

BOGUSLAWSKA et al. Intra- and interspecies conjugal transfer of Tn916-like elements from *Lactobacillus lactis* *in vitro* and *in vivo*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, p.6352-6360, 2009.

BONTEN, J.M.; WILLEMS, R.; WEENSTEIN, R.A. Vancomycin-resistant enterococci: Why are they here, and where do they come from? **Lancet Infection Disease**, v.1: 314-325, 2001.

BORCH, E. NESBARREN, T.; CHRISTENSEN, H. Hazard identification in swine slaughter whit respective to foodborne bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, n.30, p.9-25, 1996.

BRASIL MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa n.14 de 17 de maio de 2012. Disponível em www.agricultura.br/sislegis

BRASIL MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Portaria SVS/MS 818 de 16 de outubro de 1998. Disponível em www.agricultura.br/sislegis

BURCH, D.G.S.; DURAN, C.O.; AARESTRUP, F.M. Orientações para o Uso de Antimicrobianos em Suínos. In: GUARDABASSI, L.; JENSEN, L.B.; KRUSE, H. **Guia de Antimicrobianos em Veterinária**, Porto Alegre: Artmed, 2010.

CASAL, M.M.; CAUSSE, M.; SOLIS, F.; RODRIGUEZ, F.; CALSAL, M. Investigación de las resistências a antimicrobianos em *Enterococcus faecalis*. **Rev. Especial Quimioterapia**. v.22, n.3, p.117-119, 2009.

CASEWELL, M.; FRIIS, C.; MARCO, E.; MCMULLIN, P.; PHILIPS, I. the European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, 52(2), p.159-161, 2003.

CASSENEGO, A.P.V. Avaliação da colonização e resistência antimicrobiana de *Enterococcus* sp. isolados de "swabs" cloacais de frango de corte. 89p. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básica da Saúde, Universidade federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, 2010.

CASSENEGO, A.P.V.; D'AZEVEDO, P.A.; RIBEIRO, A.M.L.; FRAZZON, J.; VANDER SAND, S.T.; FRAZZON, A.P.G. Species distribution and antimicrobial susceptibility of *Enterococcus* isolated from broilers infected experimentally with *Eimeria* spp. And fed with diets cantaining different supplements. **Brazilian Journal of Microbiology**, 42: 480-488, 2011.

CAUWERTS, K. Cloacal Lactobacillus isolates from broilers often display resistance toward tetracycline antibiotics. **Microbiology Drug Resistance**, v.12, n.4, p.284-288, 2006.

CAUWERTS, K.; DECOSTRE, A., DEGRAEF, E.M.; HAESEBROUCK, F.; PASMANS, F. High prevalence of tetracycline resistance in Enterococcus isolates from broilers carrying the erm(B) gene. **Avian Pathology**, v. 36, n.5, p.395-399, 2007.

CENTIKAYA, Y.; FALK, P.; MAYHALL, C.G. Vancomycin-resistant enterococci. **Clinical Microbiology Review**, 13(4):686-707, 2000.

CETINKAYA, Y.; FALK, P.; MAYHALL, C.G. Vancomycin-resistant enterococci. **Clinical Microbiology Review**. 13(4): 686-707, 2000.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M.C. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, v.65, n.2, p.232-260, 2001.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Normas de desempenho para Teste de Sensibilidade Antimicrobiana: 15º Suplemento Informativo, **CLSI/M100-S15**, volume 25, nº 1, 2009.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational supplement, **CLSI/ M100-S22**, volume 32, nº 3, 2012.

CODEX ALIMENTARIUM – CODEX – Code of practice to minimize and contain antimicrobial resistance (CAC/RCP 61 – 2005). Roma, 2005.

COLLIGNON, P. COURVALIN, P.; AIDARA-KANE, A. Importância Clínica dos Antimicrobianos em Saúde Humana. In: GUARDABASSI, L.; JENSEN, L.B.; KRUSE, H. **Guia de Antimicrobianos em Veterinária**, Porto Alegre: Artmed, 2010.

CONCEIÇÃO, N.; OLIVEIRA, C.C.H.B.; SILVA, P.R.; ÁVILA, B.G.H; OLIVIERA, A.G. Trends in antimicrobial resistance among clinical isolates of enterococci in a Brazilian tertiary hospital: 4-years study. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 44(2): 177-181, 2011.

CORRÊA, A.A.; FUENTEFRIA, D.B.; CORÇÃO, G. Resistência a antimicrobianos em Enterococos isolados de amostras de fezes suínas. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.32, n.2, p.155-159, 2005.

COSTA, M.M.; DRESCHER, G.; MABONI, F.; WEBER, S.S; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H.; SCHRANK, I.S.; VARGAS, A.C. Virulence factors, antimicrobial-resistance, and plasmid content of *Echerichia coli* isolated in swine commercial farms. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.1, p.30-36, 2010.

COSTA, P.M.; BELO, A.; GONÇALVES, J.; BERNARDO, F. Field trial evaluating changes in prevalence and patterns of antimicrobial resistance

among *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. Isolated from growing broilers medicated with enrofloxacin, apramycin and amoxicillin. **Veterinary Microbiology**. v. 139, p. 284-292, 2009.

COSTA, P.M.; OLIVEIRA, M.; BICA, A.; VAZ-PIRES, P.; BERNARDO, F. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* from poultry feed and feed ingredients. **Veterinary Microbiology**. v.120, p.122-131, 2007.

CULLEBRAS, E.; RODRIGUEZ-AVIAL, I.; PICAZZO, J.J.; BETRIC, C.; GOMEZ, M.; LÓPEZ, F. Antimicrobial susceptibility and macrolide resistance genes in *Enterococcus faecium* with reduced susceptibility to quinopristin-dalfopristin: level of quinopristin-dalfopristin resistance is not dependent on *erm(B)* attenuator region sequence. **Diagnostic Microbiology and Infection Disease**, v.66, p.73-77, 2010.

D'AZEVEDO, P.A.; DIAS, C.A.G.; LEMOS, S.K.; BITTENCOURT, J.A.F.; TEIXEIRA, L.M. Antimicrobial susceptibility among *Enterococcus* isolates from the city of Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, p.199-204, 2004.

D'AZEVEDO, P.A.; DIAS, C.A.G.; TEIXEIRA, L.M. Genetic diversity and antimicrobial resistance of enterococcal isolates from southern region of Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.49, n.1, p.11-16, 2006.

DALLA-COSTA, L.M.; COELHO, J.M.; SOUZA, H.A.; CASTRO, M.E.; STIER, C.J.; BRAGAGNOLO, K.L.; REA-NETO, A.; PENTEADO-FILHO, S.R.; LIVERMORE, D.M.; WOODFORD, N. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. **Journal Clinical Microbiology**, v.41, n.7, p.3403-3406, 2003.

DANMAP 2005. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark. ISSN 1600-2032.

DE LEENER, E. Comparison of antimicrobial resistance among human and animal enterococci with emphasis on the macrolide-lincosamide-streptogramin group. Doctoral Thesis, Ghent Universities, Ghent, 2005.

DE LEENER, E.; MARTEL, A.; DECOSTERE, A.; HAESBROUCK, F. Distribution of the *erm(B)* gene, tetracycline resistance genes, and Tn 1545-like transposons in macrolide- and lincosamide-resistant enterococci from pigs and humans. **Microbiology Drug Resistant**. 4, 341-345, 2004.

DESPHOND, L.M.; FRIISCHE, T.R.; MOET, G.J.; BIENDENBACH, D.J.; JONES, R.N. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from North America and Europe: a report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Diagnostic Microbiology Infection Disease**, 58:163-170, 2007.

DEVRIESE, L.A.; BAELE, M.; BUTAYE, P. The genus *Enterococcus*: Taxonomy. **Prokaryotes**, v.4, p.163-174, 2006.

DONABEDIAN, S.; THAL, L.A.; BOZIGAR, P.; ZERVOS, T.; HERSHBERGER, E.; ZERVOS, M. Antimicrobial resistance in Swine and chickens fed virginiamycin for growth promotion. **Journal Microbiology Methods**, 55:739-743, 2003.

DOWLING, P.M. Aminoglicosídeos. In: GIGUÉRE, S.; PRESCOTT, J.F.; BAGGOT, J.D.; WALKER, R.D.; DOWLING, P.M. **Terapia Antimicrobiana em Medicina Veterinária**, 4ª edição, São Paulo: Roca, 2010.

DUH, R.W.; SINGH, K.V.; MALATHUM, K. In vitro activity of 19 anti-microbial agents against enterococci from healthy subjects and hospitalized patients and use of an *ace* gene probe from *Enterococcus faecalis* for species identification. **Microbiology Drug Resistant**, 7, 39-46, 2001.

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

DZIDIC, S.; SUSKOVI, C.J.; KOS BLAZENKA, B. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Biochemical and genetic aspects. **Food Technology and Biotechnologic**. 46(2), 11-21, 2008.

EATON, T.J.; GASSON, M.J. 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. **Applied Environmental Microbiology**. 67:1628-1635, 2001.

ELIOPOULOS, G.M. Quinupristin-Dalfopristina, linezolis: evidence and opinion. **Clinical Infection Disease**, 36:473-481, 2003.

EMANEIMI, M. Characterization of glicopeptides, aminoglycosides and macrolide resistance among *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* isolates from hospitals in Tehran. **Polish Journal of Microbiology**, v.57, n.2, p.173-178, 2008.

ERBAY, A. Evolution of antibiotic use in intensive care units of a tertiary care hospital in Turkey. **Journal Hospital Infection**; 53-59, 2005.

EUZÉBY, J.P. List of Prokariotic names with Standing in Nomenclature – Genus *Enterococcus*. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/e/enterococcus.html>.

FACKLAM, R.; SAHM, D.F.; TEIXEIRA, L.M. *Enterococcus*. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**, 7 ed. Washington D.C: ASM Press. p.297-305, 1999.

FACKLAM, R.R.; CARVALHO, M.G.S.; TEIXEIRA, I.M. *Enterococcus*. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; JORGENSEN, J.H.; LANDRY, M.L. **Manual of Clinical Microbiology**. v 1.9th. ed. Washington, American Society for Microbiology, USA, p. 430-442, 2007.

FACKLAM, R.R.; TEIXEIRA, L.M. *Enterococcus*. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; PFALLER, M.A.; YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**. Washington DC: ASM Press, p. 422-33, 2003.

FALCI, D.R.; DALAROSA, M. G. *Enterococcus* resistente a vancomicina: um problema no Rio Grande do Sul. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v.02, p. 73, 2012.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, v.155, p.1749-1757, 2009.

FLUIT, A.C.; VISSER, M.R.; SCHIMITZ, F.J. Molecular detection of antimicrobial resistance. **Clinical Microbiology Review**, 14: 836-871, 2001.

FONTANA, R.; LIGOZZI, M.; PITTALUGA, F.; SATTA, G. Intrinsic penicillin resistance in Enterococci. **Microbiology Drug Resistance**, v.2, n.2, p.209-213, 1996.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre. Artimed. 424 p. 2002.

FORTINA, M.G.; RICCI, G.; BORGIO, F.; MANACHINI, P.L. Rapid identification of *Enterococcus italicus* by PCR with primers targeted to 16S rRNA gene. **Applied Microbiology**, v.44, p.443-446, 2007.

FOULQUIÉ-MORENO, M.R.; CALLEWAERT, R.; DEVRIESE, B.; VAN BEEUMEN, J.; DE VUYST, L. Isolation and biochemical characterization of enterocins produced by enterococci from different sources. **Journal Applied Microbiology**, 94, 214-229, 2003.

FOULQUIÉ-MORENO, M.R.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E.; DE VUYST, L. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal Food Microbiology**, 106: 1-24, 2006.

FRACALLANZA, S.A.P.; SCHEIDEGGER, E.M.D.; SANTOS, P.F.D.; LEITE, P.C.; TEIXEIRA, L.M. Antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from poultry, meat and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, n.7, p.853-859, 2007.

FRANCO, B.D.G.M. **Microbiologia dos Alimentos**, 2ª edição - São Paulo: Atheneu, 2003.

FRANZ, C.M.; MUSCHOLL, S.; YOUSIF, N.M.K.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J.; HOLZAPFEL, W. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. **Applied and environmental microbiology**, 67, 4385-4389, 2001.

FRANZ, C.M.A.P.; STILES, M.E.; SCHLEIFER, K.H.; HOLZPAPFEL, W.H. Enterococci in foods - a conundrum for food safety. **Internacional Journal Food Microbiology**. 88: 105-122, 2003.

FRAZZON, A.P.G.; GAMA, B.A.; HERMES, V.; BIERHALS, C.G.; PEREIRA, R.I.; GUEDEZ, A.G.; D'AZEVEDO, P.A.; FRAZZON, J. Prevalence of antimicrobial resistance and molecular characterization of tetracycline resistance mediated by *tet(M)* and *tet(L)* genes in *Enterococcus* spp. Isolated

from food in Southern Brazil. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.26, p.365-370, 2010.

FRIENDSHIP, R.M. Uso de Antimicrobianos em Suínos. In: GIGUÉRE, S.; PRESCOTT, J.F.; BAGGOT, J.D.; WALKER, R.D.; DOWLING, P.M. **Terapia Antimicrobiana em Medicina Veterinária**, 4ª edição, São Paulo: Roca, 2010.

GAMA, B.A. Análise da resistência antimicrobiana e de genes de virulência de *Enterococcus* spp. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre, Rio Grande do sul, Brasil, 73p, janeiro, 2008.

GAMBAROTTO, K.; PLOY, M-C.; DUPRON, F.; GIANGIOBBE, M.; DENIS, F. Occurrence of Vancomycin-Resistant Enterococci in Pork and Poultry Products from a Cattle-Rearing Area of France. **Journal of Clinical Microbiology**, 2001.

GEGUÉRE, S. Macrolídeos, Azalídeos e Cetolídeos. In: GIGUÉRE, S.; PRESCOTT, J.F.; BAGGOT, J.D.; WALKER, R.D.; DOWLING, P.M. **Terapia Antimicrobiana em Medicina Veterinária**, 4ª edição, São Paulo: Roca, 2010.

GELSOMINO, R.; VANCANNEYT, M.; COGAN, T.M.; CONDON, S.; SWIGS, J. Source of enterococci in a farmhouse raw-milk cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.3560-3565, 2002.

GELSOMINO, R.; VANCANNEYT, M.; CONDON, S.; SWIGS, J.; COGAN, T.M. Enterococcal diversity in the environmental of on Irish cheddar-type cheesemaking factory. **International Journal of Food Microbiology**, v.71, p.177-188, 2001.

GILMORE, M.S. Enterococcal virulence. In: GILMORE, M.S. **The Enterococci – Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance**. Washington, D.C.: ASM PRESS, 2002.

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

GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. **Internacional Journal Food Microbiology**. 88: 215–222, 2003.

GOH, S.H. Identification of *Enterococcus* species and phenotypically similar *Lactococcus* and *Vagococcus* species by reserve check-board hybridization to chaperonin 60 gene sequences. **Journal Clinical Microbiology**, 38, 3953-3959, 2000.

GOMES, B.C.; ESTEVES, C.T.; PALAZZO, I.C.V.; DARINI, A.L.C.; FELIS, G.E.; SECHI, L.A.; FRANCO, B.D.G.M.; MARTINIS, E.C.P. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. Isolated from Brazilian foods. **Food Microbiology**, v.25, p.668-675, 2008.

GUARDABASSI, L.; COURVALIN, P. Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance. In: AARESTRUP, F.M. **Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin**, Washington D.C.: ASM PRESS, p.1-18, 2006.

GUARDABASSI, L.; JENSEN, L.B.; KRUSE, H. **Guia de Antimicrobianos em Veterinária**, Porto Alegre: Artmed, 2010.

GUARDABASSI, L.; KRUSE, H. Princípios da Utilização Prudente e Racional de Antimicrobianos em Animais. In: GUARDABASSI, L.; JENSEN, L.B.; KRUSE, H. **Guia de Antimicrobianos em Veterinária**, Porto Alegre: Artmed, 2010.

GUPTA, V. Inducible clindamycin resistance in staphylococcus aureus: a study from North India. **Journal Postgrad. Medicine**, v.55, p.176-179, 2009.
HAMMERUM, A.; LESTER, C.; NEIMANN, J.; PORSBO, L.; OLSEN, K.; JENSEN, L. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolate from a Danish healthy volunteer, detected 7 years after the ban of avoparcin, is possibly related to pig isolates. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, 53(3):547–549, 2004.

HAMMERUM, A.M. Enterococci of animal origin and their significance for public health. **Clinical Microbiology and Infection**, 10.1111/jl469-0691.2012.03829.x, 2012.

HAMMERUM, A.M.; LESTER, C.H.; HEUER, O.E. Antimicrobial-resistant enterococci in animals and meat: a human health hazard? **Foodborne Pathogens Disease**, 7: 1137-1146, 2010.

HAN, D.; UNNO, T.; JANG, J.; LIM, K.; LEE, S-N.; KA, G.; SADOWSKY, M.; HUR, H-G. The occurrence of virulence traits among high-level aminoglycosides resistant *Enterococcus* isolates obtained from faeces of humans, animals, and birds in south Korea. **International Journal of Food Microbiology**, 144, p.387-392, 2011.

HASMAN, H.; KEMPF, I.; CHIDAINÉ, B.; CARIOLLI, R.; ERSBOLL, A.K.; HOUE, H.; HANSEN, H.C.; AARESTRUP, F.M. Cooper resistance in *Enterococcus faecium*, mediated by the *tcr B* gene, is selected by supplementation of pig feed with cooper sulfate. **Applied Environmental Microbiology**, 72, 5784-5789, 2006.

HAYES, J.R.; ENGLISH, L.L.; CARTER, P.J.; PROESCHOLET, T.; LEE, Y.L.; WAGNER, D.D; WHITEID, G. Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from retail meats. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.12, p.7153-7160, 2003.

HENKES, W.E. Identificação de *Enterococcus* sp. e resistência a antimicrobianos em amostras de regiões costeiras da lagoa dos patos. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, 2010.

HENRIQUE, P.M. Caracterização molecular de elementos *van A* em *Enterococcus* em genótipo e fenótipo discrepantes relativos à resistência aos glicopeptídeos. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, p.70, 2007.

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

HÖRNER, R.; LISCANO, M.G.H.; MARASCHIN, M.M.; SALLA, A.; MENEGHETTI, B.; FORNO, N.L.F.D.; RIGHI, R.A. Susceptibilidade antimicrobiana entre amostras de *Enterococcus* isolados no Hospital Universitário de Santa Maria. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.41, n.6, p.391-395, 2005.

Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus*: a study from North Índia. **Journal Postgrad. Medicine**, v.55, p.176-179, 2009.

INHAM, S.C.; SCHMIDT, D. Alternative indicator bacteria analyses for evaluating the sanitary condition of beef carcasses. **Journal Food Protection**, v.63, p.51-55, 2000.

JACKSON, C.R.; FEDORKA-CRAY, P.J.; BARRET, J.B.; LADELY, S.R.; Effects of Tylosin use on erythromycin resistance in enterococci isolated from swine. **Applied Environmental Microbiology**, 70(7): 4205-4210, 2004.

JENSEN, L.B.; FREDERICK, J.A.; MØLBAK, K.; WEGENER, H.C. Riscos à Saúde Humana Associados à Utilização de Antimicrobianos em Animais. In: GUARDABASSI, L.; JENSEN, L.B.; KRUSE, H. **Guia de Antimicrobianos em Veterinária**, Porto Alegre: Artmed, 2010.

JENSEN, V.F.; EMBORG, H-D.; AARESTRUP, F.M. Indications and patterns of therapeutic use of antimicrobial agents in Danish pig productions from 2002 to 2008. **Journal Veterinary Pharmacologic and Therapeutics**, 35, 33-46, 2011.

JOHSEN, P.J.; OSTERHUS, J.I.; SLETVOLD, H.; SORUM, M.; KRUSE, H.; NIELSEN, K.; SIMONSEN, G.S.; SUNDSFJORD, A. Persistence of animal and human glycopeptide-resistant enterococci on two Norwegian poultry farms formerly exposed to ovoparcin is associated with a widespread plasmid-mediated *van A* element within a polyclonal *Enterococcus faecium* population. **Applied Environmental Microbiology**, 71(1): 159-168, 2005.

KAK, V.; CHOW, J.W. Acquired antibiotic resistances in Enterococci. In: GILMORE, M.S. **The Enterococci-Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance**. Washington, D.C.: ASM PRESS, 2002.

KASEMOGLU-DOGRU, A.; GENÇAY, Y.E.; AYAS, N.D. Prevalence and antibiotic resistance profiles of *Enterococcus* species in chicken at slaughter level, absence of *van A* and *van B* genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. **Research in Veterinary Science**, v.89, p.153-158, 2010.

KAYSER, F.H. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. **Internacional Journal Food Microbiology**. 88: 255-262, 2003.

KAZIMIERCZAK, K, A.; SCOTT, K.P.; KELLY, D.; AMINOV, R.I. Tetracycline resistance of the organic pig gut. **Applied Environmental Microbiology**, v.75, n.6, p.1717-1722, 2009.

KE, D.; PICARD, F.J.; MARTINEAU, F.; MÉNARD, C.; ROY, P.H.; OUELLETTE, M.; BERGERO, M.G. Development of a PCR assay for rapid detection of Enterococci. **Journal Clinical Microbiol**, v. 37, 3497-3503, 1999.

KICH, J.D.; COLDEBELLA, A.; MORES, N.; NOGUEIRA, M.G.; CARDOSO, M.; FRATA MICO, P.M.; CALL, J.E.; FEDORKA-CRAY, P.; LUCHANSKY, J.B. Prevalence, distribution, and molecular characterization of Salmonella recovered from swine finishing herds and a slaughter facility in Santa Catarina, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v.151, p.307-313, 2011.

KLARE, I.; KONSTABEL, C.; BANDSTUBNER, D.; WERNER, G.; WITTE, W. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. **Internacional Journal Food Microbiology**. 88: 269–290, 2003.

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

KOBAYASHI, C.C.B.A.; SADOYAMA, G.; VIEIRA, J.D.G.; PIMENTA, F.C. Resistência antimicrobiana associada em isolados clínicos de Enterococcus spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 44(3): 344-348, 2011.

KÓLAR, M.; PANTÚECK, R.; BARDOO, J.; VÁGNEROVÁ, I.; TYPOVSKÁ, H.; DOSKAR, J.; VÁLKA, I. Occurrence of antibiotic resistant bacterial strains isolated in poultry. **Veterinary Medicine Czech**, v.47, p.52-59, 2002.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D. **Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorado**. 5ª ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. p. 589-659.

KRETSINGER, K.; DRAKE, A.; GAY, K.; JOYCE, K.; LEWIS, K.; ANGULO, F. High-level gentamicin resistance among Enterococci isolated from meat purchased from grocery stores and from outpatient human stools – United States, 1998 – 2001. In: **52 ND. Annual Epidemic Intelligence Service (EIS) Conference**, Atlanta. Annals p.14, 2003.

KTUSUNUMA, Y.; HANAZUMI, M.; FUJISAKI, H.; MINATO, H.; KATAOKA, Y.; SWADA, T.; HASHIMOTO, Y.J.; YONEMOCHI, C. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis patterns of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* and enterococci isolates from the feces of livestock and livestock farmers in Japan. **Journal General Applied Microbiology**, 54(1), p.39-50, 2008.

KÜMMERER, K. Resistance in the environment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 54(3), 311 – 320, 2004.

LARSEN, J.; SCHONHEYDER, H.C.; SINGH, K.V.; et al. Porcine and human community reservoirs of *Enterococcus faecalis*, Denmark. **Emerging Infectious Diseases**, 17:2395-97, 2011.

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

LESTER, C.H.; FRIMODT-MOLLER, N.; SORENSEN, T.L.; MONNET, D.L.; HAMMERUM, A.M. In vivo transfer of the *vanA* resistance gene from *Enterococcus faecium* isolate of animal origin to an *E. faecium* isolate of human origin in the intestines of human volunteers. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, 50:596-99, 2006.

LESTER, C.H.; HAMMERUM, A.M. Transfer of a *vanA* from an *Enterococcus faecium* isolate of chicken origin to a CC17 *E. faecium* isolate in the intestine of cephalosporin-treated mice. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, 65:1534-36, 2010.

LEWIS-JONES, C.A. Quality assurance assessment. **Pig Journal**, 41:99. 1998.

LOPES, M.F.S.; RIBEIRO, T.; ABRANTES, M.; MARQUES, J.J.F.; TENREIRO, R.; CRESPO, M.T.B. Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci. **International Journal of Food Microbiology**, v.103, p.191-198, 2005.

LÓPEZ, M.; SÁENZ, Y.; ROSO-BEZARES, B.; MÁRTINEZ, S.; CAMPO, R.; RUIZ-LARREA, F.; ZARAZAGA, M.; TORRES, C. Detection of Van A and Van B2 – Containing enterococci from food samples in Spain, including *Enterococcus faecium* strains CC17 and the new singleton ST425. **International Journal of Food Microbiology**, v.138, p.172-178, 2009.

MANTILLA, S.P.S.; GOUVEA, R.; FRANCO, R.M.; MANO, S.B. *Enterococcus* em corte de carne bovina: enumeração, identificação bioquímica e análises físico-químicas. **Higiene Alimentar**, v.21, p. 67-72, 2007.

MAROTHI, Y.A.; AGNIHOTRI, H.; DUBEY, D. *Enterococcal* resistance an overview. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 23(4), p.214-219, 2005.

MARTINEZ, J.L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 11, 2893 - 2902, 2009.

MC CLELLAN, J.; JOYCE, K.; ROSSITER, S.; BARRET, T.; ANGULO, F.J. High-level gentamicin resistant Enterococci and quinupristin/dalfopristin resistant *Enterococcus faecium* from group pork purchased from grocery stores. In: **41st INTERSCIENCE CONFERENCE ANTIMICROBIAL AGENTS CHEMOTHERAPY**, Chicago. Program and Abstracts of 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and chemotherapy, p. 16-19, 2001.

MCDERMOTT, P.F.; WALKER, R.D.; WHITE, D.G. Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance. **International Journal Toxicology**, v.22, p.135-143, 2003.

MCKELLAR, Q.A. Antimicrobial resistance: a veterinary perspective. **Brazilian Medical Journal**, 317, 610-611, 1998.

MEDEIROS, A.W.; D'AZEVEDO, P.A.; PEREIRA, R.I.; CASSENEGO, A.P.V.; VAN DER SAND, S.; FRAZZON, J.; FRAZON, A.P.G. PCR-RFLP 16s ribosomal DNA to confirm the *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus*

casseliflavus identification isolated from clinical and food samples. **Brazilian Society for Tropical Medicine**, 2010.

MENIN, A.; RECK, C.; SOUZA, D.; KLEIN, C.; VAZ, E. Agentes bacterianos enteropatogênicos em suínos de diferentes faixas etárias e perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella*. **Ciência Rural**, v.38, n. 6, p. 1687-1693, 2008.

MICHAEL, G.B.; BUTAYE, P.; CLOECKAERT, A.; SCHWARZ, S. Genes and mutation conferring antimicrobial resistance in *Salmonella*: an update. **Microbes and Infection**, v.8, p.1898-1914, 2006.

MICHALOVA, E.; NOVOTNA, P.; SCHLEGELOVA, J. Tetracycline in veterinary medicine and bacterial resistance to them. **Veterinary Medicine Czech**, v.49, p.79-100, 2004.

MILLET, S. The European ban on antibiotic growth promoters in animal feed: From challenges to opportunities. **The Veterinary Journal**, 2010.

MIRANDA, G.; LEE, L.; KELLY, C.; SOLÓRZANO, F.; LEAÑOS, B.; MUÑOZ, O.; PATTERSON, J.E. Antimicrobial resistance from enterococci in a pediatric Hospital plasmids in *Enterococcus faecalis* isolates with high-level gentamicin and streptomycin resistance. **Archives of Medical Research**, 32(2): 159-163, 2001.

MOORE, D.F.; GUZMAN, J.A.; MCGEE, C. Species distribution and antimicrobial. 2008

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

MURRAY, B.E. Vancomycin-resistant enterococcal infections. **Neo England Journal Medicine**: 342:710-21, 2000

NAIMI, A.; BECK, G.; BRANLANT, C. Primary and secondary structures of rRNA spacer regions in enterococci. **Microbiology**, 143, 823-834, 1997.

NASER, S.M.; THOMPSON, F.L.; HOSTE, B.; GEVERS, D.; DAWYNDT, P.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J. Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. **Journal of Medical Microbiology**, 151: 2141-2150, 2005.

NASER, S.M.; VANCANNEYT, M.; GRAEF, E.; DEVRIESE, L.A.; SNAUWAERT, C.; LEFEBVRE, K.; HOSTE, B.; SVEC, P.; DECOSTERE, A.; HAESBROUCK, F.; SWINGS, J. *Enterococcus canintestini* sp. from faecal samples of healthy dogs. **International Journal System Evol. Microbiology**. 55: 2177-2182, 2005.

NEELA, F.A.; NONAKA, L.; RAHMAN, M.H.; SUZUKI, S. Transfer of the chromosomally encoded tetracycline resistance gene *tet(M)* from marine bacteria to *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis*. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v.25, p.1095-1101, 2009.

NORWAY. **Microbial Drug Resistance**, v.6, n.1, p.63-70, 2000.

OBENG, A.S.; RICKARD, H.; NDI, O.; SEXTON, M.; BARTON, M. Antibiotic resistance, phylogenetic grouping and virulence potential of *Escherichia coli* isolated from the faeces of intensively harmed and free range poultry. **Veterinary Microbiology**, v.154, p.305-315, 2012.

OGIER, J.C.; SERROR, P. Safety assessment of dairy microorganisms: The Enterococcus genus. **International Journal Food Microbiology**, 126: 291–301, 2008.

OLIVEIRA, A.C.; BETTCHER, L. Aspectos epidemiológicos da ocorrência do *Enterococcus* resistente a vancomicina, **Revista Escola de Enfermagem USP**, 44(3): 725-731, 2010.

OPLUSTIL, C.P.; NUNES, R.; MENDES, C. RESISTENT Group. Multicenter evaluation of resistance patterns of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. isolated from clinical specimens in Brazil: RESISTENT Surveillance Program. **Brazilian Journal Infection Disease**. 5(1):8-12, 2001.

OZAWA, Y.; COURVALIN, P.; GAIMMAND, M. Identification of enterococci at the species level by sequencing of the genes for D-alanine:D-alanine ligases. **Systematic and Applied**, 23, 230-237, 2000.

PALAZZO, I.C.V.; CAMARGO, I.L.B.C.; ZANELLA, R.C.; DARINI, A.L.C. Evaluation of clonality in enterococci isolated in Brazil carrying Tn 1546-like elements associated with VanA plasmids. **FEMS Microbiology Letters**, v.258, p.29-36, 2006.

PANGALLO, D.; DRAHOVSKÁ, H.; HARICHOVÁ, J.; KARELOVÁ, E.; CHOVANOVÁ, K.; FERIANC, P.; TURNA, J.; TIMKO, J. Assessment of environmental enterococci bacterial antagonism pathogenesis capacities and antibiotic resistance. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 94, 555-562, 2008.

PAVIA, M.; NOBILE, C.G.A.; SALPIETRO, L.X.; ANGELILLO, I. Vancomycin resistance and antibiotic susceptibility of enterococci in raw meat. **Journal of Food Protection**, v.63, p.912-915, 2000.

PENDERSEN, K.B. Some growth promoters in animals do confer antimicrobial resistance in humans. **Brazilian Medical Journal**, 318: 1076, 1999.

PINTO, W.A.; FILHO, E.P.; PARREIRA, M.L.J.; CHAVASCO, J.K. Ocorrência de *Enterococcus faecalis* em infecções pulpares e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v.9, n.2, p.273-280, 2011.

POETA, P.; COSTA, D.; RODRIGUES, J.; TORRES, C. Antimicrobial resistance and the mechanisms implicated in faecal enterococci from healthy humans, poultry and pets in Portugal. **International Journal Antimicrobial Agents**, v.27, p.131-137, 2006.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; LEONARD, F. C.; FITZPATRICK, E. S.; FANNING, S.; HARTIGAN, P. J. **Veterinary Microbiology and Microbial Disease**. 2^a ed. Iowa: Wiley-Blackwell, 1231 p., 2011.

RAHAMAN, M.H.; RASMUSSEN, L.D.; SORENSEN, S.J. Occurrence of two genotypes of tetracycline (TC) resistance gene *tet(M)* in the TC-resistant bacterial in massive sediments of Japan. **Environmental Science Technology**, v.42, n.14, p.5055-5061, 2008.

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

RIBOLDI, G.P.; MATTOS, E.P.; FRAZZON, A.P.G.; D'AZEVEDO, P.A.; FRAZZON, J. Phenotypic and genotypic heterogeneity of *Enterococcus* species isolated from food in Southern Brazil. **Journal of Basic Microbiology**, v.48, p.31-37, 2008.

RICE, E.W.; MESSER, J.W.; JOHNSON, C.H.; REASONER, D.J.A. Occurrence of high-level aminoglycoside resistance in environmental isolates. **Applied Environmental Microbiology**, v.61(1), p.374-376, 1995.

RICE, L.B. Emergence of vancomycin-resistant enterococci. **Emergence Infection Disease**. 7(2): 183-7, 2001.

RICE, L.B.; SAHM, D.; BONOMO, R.A. Mechanisms of resistance to antimicrobial agents. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; PFALLER, M.A.; YOLKEN, R.H, editors. **Manual of Clinical Microbiology**. Washington DC: ASM Press; p. 1074-101, 2003.

ROBERTS, M.C.; MONCLA, B.J.; HILLIER, S.H. characterization of unusual tetracycline-resistant gram-positive bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.35, n.12, p.155-1557, 2003.

ROSSI, F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. **Antimicrobial Resistance**, 52(9), 1138-1143, 2010.

RUDY, M.; ZIENTARA, M.; BEK, T.; MARTIROSIAN, G. Occurrence of antibiotic resistant enterococci in clinical specimens from a pediatric hospital. **Polish Journal of Microbiology**, 54, 77-80, 2005.

SÁNCHEZ-VALENZUELA, A.; BEM OMAR, N.; ABRIOUEL, H.; LUCAS LÓPEZ, R.; ORTEGA, E.; MARTÍNEZ CAÑAMERO, M.; GÁLVEZ, A. Risk factors in enterococci isolated from foods in Morocco: determination of antimicrobial resistance and incidence of virulence traits. **Food Chemistry Toxicology**. 46: 2648-2652, 2008.

SANT'ANA, A.S.; SILVA, S.C.F.L.; FARINI, I.O.; AMARAL, C.H.R.; MACEDO, V.F. Qualidade microbiológica de águas minerais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 23:190-194, 2003.

SCHIMIDT, G. Análise fenotípica e genotípica de *Enterococcus* sp. isolados de frangos após subcultura no laboratório. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-graduação em Ciência e tecnologia de Alimentos, 2009.

SCHWAISSER, K.; BAUER, J. Detection of the Erythromycin rRNA Methylase Gene *erm(A)* in *Enterococcus faecalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.52, n.8, p.2994-2995, 2008.

SCHWARZ, S.; CHASLUS-DANCLA, E. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. **Veterinary Research**, v.32, p.201-225, 2001.

SCHWARZ, S.; CLOECKAERT, A.; ROBERTS, M.C. Mechanisms and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents. In: F.M. AARESTRUP (Ed.): **Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin**. Washington D.C.: ASM Press, p. 73-98, 2006.

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

SCHWARZ, S.; SILLEY, P.; SIMJEE, S.; WOOD FORDS, N.; VAN DUIJKERRENE, E.; JOHNSON, A.P.; GAASTRAS, W. Assessing the susceptibility of bacterial obtained from animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.65, p.601-604, 2010.

SCOTT, T.M.; ROSE, J.B.; JENKINS, T.M.; FARRAH, S.R.; LUKASIK, J. Microbial Source Tracking: Current Methodology and Future Directions. **Applied and Environmental Microbiology**. 68: 5796-5803, 2002.

SENGELØV, G.; SØRENSEN, B.B.; AARESTRUP, F. Susceptibility of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecium* isolated from pigs and broilers chickens to tetracycline degradation products and distribution of tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli* from food animals. **Veterinary Microbiology**, 95: 91-101, 2003.

SHEWMMAKER, P.L.; STEIGERWALT, A.G.; AINSLEY, C.N.; CARVALHO, M.G.S.; FACKLAM, R.R.; WHITNEY, A.M.; TEIXEIRA, L.M. Reevaluation of the taxonomic status of recently described species of *Enterococcus*: Evidence that *E. thaelandicus* is a senior subjective synonym of "*E. sanguinicola*" and confirmation of *E.coccal* as a species distinct from *E. sileseacius*. **Journal of Clinical Microbiology**, 49(7):2676-2679, 2011.

SILVA, M.C.; Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos com a utilização de metodologias convencionais e do sistema simplate. Dissertação de Mestrado em Ciências – Escola Superior de Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

SILVA, N.; IGREJAS, G.; FIGUEIREDO, N.; GONÇALVES, A., RADHOUANI, H.; RODRIGUES, J.; POETA, P. Molecular characterization of antimicrobial resistance in enterococci and *Escherichia coli* isolates from European wild

rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). **The Science of the Total Environment**. 408, 4871–4876, 2010.

SOUZA, M.A.; RIBEIRO, L.C.M.; PRIMO, M.G.B.; SIRICO, S.C.A.; GUILARDE, A.O.; BATISTA, L.J.A. Enterococcus resistentes à vancomicina em um hospital universitário no centro-oeste do Brasil. *Revista de Patologia Tropical*, 41(2): 241-246, 2012.

SOUZA, M.R.; MOREIRA, J.L.; BARBOSA, F.H.F.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; NUNES, A.C.; NICOLI, J.R. Influence of intensive and extensive breeding on lactic acid bacteria isolated from *Gallus gallus domesticus* ceca. **Veterinary Microbiology**, v.120, p.142-150, 2007.

TALEBI, M.; POURSHAFIE, M.R.; KATOULI, M.; MOLLBY, R. Molecular structure and transferability of Tn 1546-like elements in *Enterococcus faecium* isolates from clinical, swage, and surface water samples in Iran. **Applied and Environmental Microbiology**, 74, 1350-1356, 2008.

TANG, X.; TAN, C.; ZHANG, X.; ZHAO, Z.; XIA, X.; WU, B.; GUO, A.; ZHOU, R.; CHEN, H. Antimicrobial resistances of extra intestinal pathogens *Escherichia coli* isolates from swine in China. **Microbiology Pathogenesis**, v.50, n.5, p.207-212, 2011.

TANSUPHASERI, U.; KHAMINTHARUL, D.; PANDII, W. Antibiotic resistance of enterococci isolated from frozen foods and environmental water. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, 37, 162-170, 2006.

TAVARES, W. Bactérias Gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.33(3), p.281-301, 2000.

TEIXEIRA, L.M.; FACKLAM, R.R. *Enterococcus*. In: **Manual of Clinical Microbiology**. Ed. MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; PFALLER, M.A.; YOLKEN, R.H. 8th edition. ASM Press, Washington, D.C, 2003. p.623-635.

TENOVER, F.C. Development and Spread of Bacterial Resistance to antimicrobial agentes: na overview. *Clinical Infections Disease*, 33(3), 108-115, 2001.

TITZÉ-DE-ALMEIDA, R. & PALERMO-NETO, J. Uso de antimicrobianos em Avicultura e o desenvolvimento de resistência bacteriana. In: PALERMO-NETO, J.; SPINOSA, S.L.; GÓRNIAC, S.L: **Farmacologia Aplicada á Avicultura**. 1^a Ed. Roca editora, São Paulo, p.161-173, 2005.

TITZÉ-DE-ALMEIDA, R.; POLLO, M.; SILVEIRA, C.A.; RODRIGUES, I.P.; EUDES, J.; NASCIMENTO, R.S.; FERREIRA, R.F.; MORAES, L.M.P.; BOELEN, H.; BELKUM, A.V.; FELIPE, M.S.S. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of enterococci recovered from Brazilian intensive care units. **Brazilian Journal of Infection Disease**, v.8, n.3, p.197-205, 2004.

TOLLEFSON, L.; MORRIS, D.; BOLAND, C.; KAARTINEN, L. Regulamentação do Uso de Antibiótico em Animais. In: GIGUÉRE, S.; PRESCOTT, J.F.; BAGGOT, J.D.; WALKER, R.D.; DOWLING, P.M. **Terapia Antimicrobiana em Medicina Veterinária**, 4ª edição, São Paulo: Roca, 2010.

TOMA, B.; DUFOUR, B.; SANNA, M.; BENETM, J.J.; MOUTON, F.; LOUZA, A.; ELLIS, P. **Applied Veterinary Epidemiology**, AEEMA, 1999.

TOP, J.; WILLEMS, R.; BONTEN, M. Emergence of CC17 *Enterococcus faecium* from commensal to hospital adapted pathogen. **FEMS Immunologic Medicine Microbiology**, v.52, p.197-208, 2008.

TREMBLAY, C.L.; LETELLIER, A.; QUESSY, S.; DAIGNAULT, D.; ARCHAMBAULT, M. Multiple- antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from cecal contents in broiler chicken and turkey folks slathered in Canada and plasmid localization of *tetO* an *ermB* genes. **Journal Food Protection**, 74(10): 1639-1648, 2011.

TREMBLAY, C.L.; LETELLIER, A.; QUESSY, S.; DAIGNAULT, D.; ARCHAMBAULT, M. Antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* in abattoir pigs and plasmid colocalization and cotransfer of *tet(M)* and *erm(B)* genes. **Journal Food Protection**, 75(9)0: 1595-1602, 2012.

VAIL, J.H.; MORGAN, R.; MERINO, C.R.; GONZALES, F.; MILLER, R.; RAM, J.L. Enumeration of waterborne *Escherichia coli* with petrefilm plates: comparison to standard methods. **Journal of Environmental Quality**, v.32, nn.1, p.368-373, 2003.

VALENZUELA, A.S.; BENOMAR, N.; ABRIOUEL, H.; MAGDALENA, M.C.; ANTONIO, G. isolation and identification of *Enterococcus faecium* from seafood: antimicrobial resistance and production of bacteriocin – like substances. **Food Microbiology**, 27, 955-961, 2010.

VALENZUELA, A.S.; OMAR, N.B.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R.L.; VELJOVIC, K.; CÃNAMERO, M.M.; TOPISIROVIC, M.K.L.; GÁLVEZ, A. Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocines in enterococcus from artesian foods of animals origin. **Food Control**, v.20, n.4, p.381-383, 2009.

VAN DEN BOGAARD, A.E.; STOBBERINGH, E.E. E.E. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. **Journal Antimicrobial Agents**. 16: 327-335, 2000.

VANCANNEYT, M.; LOMBARDI, A.; ANDRIGHETTO, C.; KNIJFF, E.; TORRIANI, S.; BJORKROTH, K.J.; FRANZ, C.M.; FOULQUIE MORENO, R.; REVETS, L.; REVETS, H.; DE VUUYST, L.; SWINGS, J.; KERSTERS, K.; DELLAGLIO, F.; HOLZAPFEL, W.H. Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. **Applied and Environmental Microbiology**, 68:1381-1391, 2002.

VIGNAROLLI, C.; ZANDRI, G.; AQUILANT, L.; PASQUAROLI, S.; BIAVASCO, F. Multidrug-resistant enterococci in meat and faeces and co-transfer od

resistance from a *Enterococcus durans* to a human *Enterococcus faecium*. **Current Microbiology**, v.62, p.1438-1447, 2011.

WALKER, R.D.; DOWLING, P.M. Fluoroquinolonas. In: GIGUÉRE, S.; PRESCOTT, J.F.; BAGGOT, J.D.; WALKER, R.D.; DOWLING, P.M. **Terapia Antimicrobiana em Medicina Veterinária**, 4ª edição, São Paulo: Roca, 2010.

WANG, X.M.; JIANG, H.X.; LIAO, X.P.; LIU, J.H.; ZHANG, W.J.; ZHANG, H.; JIANG, Z.G.; LÜ, D.H.; XIANG, R.; LIU, Y.H. Antimicrobial resistance, virulence genes, and phylogenetic background in *Escherichia coli* isolates from disease pigs. **FEMS Microbiol Letters**, v.306, n.1, p.15-21, 2010.

WEESE, J.S. Antimicrobial use in a small animal veterinary teaching hospital and the impact of antimicrobial use guideline. **Journal American Veterinary Medicine Association**, 228-553. 2006.

WERNER, G.; COQUE, T.M.; HAMMERUM, A.M.; HOPE, R.; HRYNIEWICZ, W.; JOHNSON, A.; KLARE, I.; KRISTINSSON, K.G.; LECLERCQ, R.; LESTER, C.H.; LILLIE, M.; NOVAIS, C.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PEIXE, L.V.; SADOWY, E.; SIMONSEN, G.S.; TOP, J.; VUOPIO-VARKILA, J.; WILLEMS, R.J.; WITTE, W.; WOODFORD, N. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. **Euro surveillance**.13(47). pii:19046, 2008.

WITTE, W. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. **Science**, 279:996–997, 1998.

WITTE, W. Selective pressure of antibiotic use in livestock. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.16, p.19-24, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1st Joint FAO/OIE/WHO Expert Workshop on Non-human Antimicrobial Usage and Antimicrobial resistance: **Scientific assessment**, Geneva, December 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global principles for the containment of antimicrobial resistance in animals intended for food. Geneva, Switzerland, 2000. <http://www.who.int/en/>.

ZANELLA, R.C.; First confirmed case of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* with vanA phenotype from Brazil: isolation from meningitis case in São Paulo. **Microbiology Drug Resistance**. 5(2):159-162, 1999.

ZARRELLI, R.; TRIPODI, M.F.; PODOLO, A.D.; FORTUNATO, R.; BAGATTINI, M.; CRISPINO, M.; FLORIO, A.; TRIASSI, M.; UTILI, R. Molecular epidemiology of high-level aminoglycoside-resistance enterococci isolated from patients in University hospital in Southern Italy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.56, p.827-835, 2005.

ZOU, L-K.; WANG, H-N.; ZENG, B.; LI, J-N.; LI, X-T.; ZHANG, A-Y.; ZHOU, Y-S.; YANG, X.; XU, C-W.; XIA, Q-Q. Erythromycin resistance and virulence genes in *Enterococcus faecalis* from swine in China. **New Microbiologica**, v.34, p.73-80, 2011.