ELIANA MARCELA JIMENEZ OBANDO

DETECÇÃO DE *Enterococcus* RESISTENTES A VANCOMICINA EM CRIAÇÕES COMERCIAIS DE OVINOS E CAPRINOS DAS REGIÕES CENTRO-LESTE E NORDESTE DO ESTADO DE SÃO PAULO

VERSÃO CORRIGIDA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento: Zootecnia

Área de concentração: Qualidade da produtividade Animal

Orientador:

Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa

De acordo: _____

Orientador

Pirassununga

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Jimenez Obando, Eliana Marcela
J61d Detecção de Enterococcus resistentes à vancomicina em criações comerciais de ovinos e caprinos das regiões centro-leste e nordeste do estado de São Pa / Eliana Marcela Jimenez Obando ; orientador Ricardo Luiz Moro de Sousa . -- Pirassununga, 2016.
63 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Enterococcus resistentes à vancomicina. 2. produção animal. 3. ruminantes. I. Moro de Sousa , Ricardo Luiz , orient. II. Título.

Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – o autor

DEDICATÓRIA

A meu Deus quem por seu amor incondicional comigo, me trouxe até aqui, um país novo, pessoas novas, uma experiência única resumida simplesmente em uma oportunidade maravilhosa que só ele com sua bondade poderia me deixar realizar.

A minha força impulsora, minha motivação, meus parceiros de luta, meus amigos gestores deste triunfo, meu apoio incondicional: Para eles, meus PAIS! Que nunca me deixaram desistir, acompanhando-me a distância, sendo meu suporte para não me derrubar, por ser a base de toda minha realização. Graças a vocês por acreditarem em mim, em minhas capacidades e me apoiarem ainda quando tudo fosse indefinido. Obrigada por tudo meus anjos, amo muito vocês!

Aos meus irmãos, Manuela, Juan Manuel e Jose David, gestores de alegria e motivação para ser aquele exemplo de vida que vocês esperam de mim, por me motivarem a ser cada dia melhor, por ser meu apoio e minha companhia nos momentos de solidão. Amo muito vocês minha princesa e meus pequenos gigantes!

AGRADECIMENTOS

Agradeço de coração a Deus, autor principal de todas as maravilhas recebidas na minha vida, por me guiar e me permitir sempre alcançar grandes metas, pelo seu presente de fazer meus estudos neste encantador país, guiada por anjos que só ele sabia me pôr em meu caminho e por me dar a saúde que precisava para cumprir essa missão. Obrigada por me mostrar que convosco saio em tudo mais do que vencedora!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa, por me dar a oportunidade de ser sua orientada, por acreditar em mim sem me conhecer, por entregar sua confiança e escutar minha solicitação. Obrigada por seu apoio, seus conselhos, por me guiar e sempre ter uma palavra de fé quando parecia nada dar certo.

A Sabrina Ribeiro Almeida Queiroz, pela sua amizade, pelas respostas claras e precisas no momento de confusão durante o experimento, por seu exemplo de agilidade e respeito. Admiro sua inteligência e sua forma de tomar decisões. Muito obrigada pela sua ajuda e força durante o meu experimento e por tudo o que me ensinou.

A técnica do laboratório, Silvia Helena de Seraphin Godoy, por ser um apoio e ajuda durante meu experimento, por me ensinar a tomar decisões, a colocar o carimbo de diferença, organização e responsabilidade em todo o que se faz, muito obrigada pela valiosa amizade. Sinto muito respeito e admiração por você.

A Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade de São Paulo, em especial à Faculdade de Engenharia de Alimentos e Zootecnia pela oportunidade de realização do meu curso de Mestrado.

Às propriedades rurais de ovinos e caprinos por nos dar a oportunidade da realização deste trabalho.

À minha amiga Andrea Vasquez Garcia, por ser a gestora intelectual de minha vinda no Brasil, por ser meu maior apoio aqui. Andre, realmente não tenho as palavras certas para te agradecer, mais lembre-se que na minha vida você sempre encontrara alguém para te corresponder ao que você precisar, pois seu apoio aqui não tem recompensa.

Á meu namorado Cristian, por seu amor, seu apoio incondicional e sua companhia no começo e no final desta conquista. Só gratidão, ressarcido em todo meu amor para você.

À técnica do laboratório Flávia Munin e aos colegas do laboratório de Higiene Zootécnica Marisa, Marina, Melina, Maria Fernanda, Erika Felix, Rocio, Anna Alencar, Juliana Sarti, Samara, Juliana Baldin, Euder, Marcelo, Eurico e Karen por compartilhar juntos, aprender com nossos erros e me ajudar na solução das dúvidas no mundo das apaixonantes microbiologia e biologia molecular!

Às minhas colegas de coletas e PCR Camila Moreira e Loiane Sampaio, obrigada por sua paciência, por sua grande ajuda e seu compromisso para me ajudar!

Às minhas amigas da República Dourado, Robertinha e Ana Paula por me receberem com o amor de família, por sua hospitalidade, por sua paciência para me ensinar minhas primeiras palavrinhas e tentarem compreender meu enrolado espanhol. E por ser minhas irmãs Brasileiras que fizeram mais fácil esta luta estando longe de minha casa! Adoro vocês!

À minha família colombiana no Brasil, Jenny Rosero, Maria Isabel, Carolina, Laura, Stephen, Shirley, Julian Mejia, Juan Fernando, Lina, Julian Muñoz, Jaiber, Cristian, obrigada a vocês por serem o pedacinho da Colômbia aqui, porque juntos amortecemos a difícil situação de estar longe de casa, obrigada por sua linda amizade, lembrem que na sua volta a nosso país encontrarão em mim uma amiga incondicional.

À minha linda família, da República Gourmet, Olivia, Melina, Fabiane, Maria Eduarda, Melzinha e, minha querida Francesa Lolita! Obrigada por serem a parte divertida do dia a dia, por serem o refúgio de chegar em casa e ter uma linda companhia para jantar, falar, rir e algumas vezes até chorar! Adoro vocês minhas lindas e espero vocês na Colômbia!

Aos meus Avós, meus tios e primos porque sempre estiveram presentes à distância, me apoiando e me recebendo nas minhas voltas com seu amor de família. Obrigada por todos os conselhos que recebi de todos, obrigada por sempre se preocuparem comigo. Senti muita saudade de todos vocês, mas no meu coração sempre os tinha presentes!! Adoro vocês!

À todas as lindas pessoas que conheci na minha estadia no Brasil, pois vocês fazem parte de todas as experiências, das minhas alegrias e acompanharam minhas tristezas, vocês ajudaram muito a este esforço que realmente fiz para a realização do meu mestrado.

EPÍGRAFE

"Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota". (Madre Teresa de Calcuta)

RESUMO

JIMENEZ O., E. **Detecção de *Enterococcus* resistentes à vancomicina em criações comerciais de ovinos e caprinos das regiões centro-leste e nordeste do estado de São Paulo.** 2016. 63 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

As exigências das condições higiênico-sanitárias na produção de animais de interesse zootécnico vêm aumentando progressivamente dada à necessidade de aliar-se produtividade a produtos de alta qualidade para atender a mercados consumidores cada vez mais exigentes. Nesse sentido, a utilização de antimicrobianos, tanto na profilaxia como na terapêutica, permanece como estratégia de controle para vários microrganismos patogênicos, de importância não apenas para a produção animal como também para a saúde humana, ainda que restrições ao uso indiscriminado desses produtos têm se intensificado. Não obstante, o uso excessivo desses produtos está associado à seleção de microrganismos resistentes nas áreas de produção. Por outro lado, investigações sobre circulação de cepas resistentes em rebanhos animais, até então restritas a populações humanas, ainda permanecem limitadas no Brasil. Bactérias do gênero *Enterococcus*, integrantes usuais da microbiota gastrointestinal animal e humana, são indicadoras ambientais de contaminação fecal e tem-se tornado objeto de preocupação em saúde pública e veterinária dada a ocorrência de cepas resistentes à vancomicina (VRE). O presente trabalho teve como objetivo isolar, quantificar e caracterizar VRE presentes em amostras fecais de ovinos oriundos de pequenas propriedades das regiões centro-leste e nordeste do estado de São Paulo. Para tanto, 132 amostras fecais foram coletadas diretamente do reto dos animais ou do piso das instalações. As amostras foram semeadas em ágar m-Enterococcus e subcultivadas em Ágar Bile Esculina acrescido de 6 μg/mL de vancomicina (ABEV), para confirmação de *Enterococcus* spp e detecção de cepas resistentes. Procedeu-se igualmente a observação da morfologia, características tintoriais, bioquímicas e moleculares. O número máximo de *Enterococcus* spp. encontrado foi de $2{,}6 \times 10^5$ e $1{,}70 \times 10^5$ UFC/g de fezes do ambiente e dos animais, respectivamente. Na caracterização bioquímica espécies mais prevalentes foram: *Enterococcus faecalis* e *Vagococcus fluvialis*. No ABEV, houve crescimento de colônias VRE em 33 das 84 amostras de ovinos-caprinos e em 21 das 48 amostras ambientais, representando, respectivamente 46,7% e 29,3% das amostras analisadas. A análise por multiplex PCR das 54 cepas VRE obtidas indicaram que 23 (43%), 22 (41%), 2 (3,5%) e 2 (3,5%) foram positivas, respectivamente, para os genes *van*C2/C3, *van*C1, *van*A e *van*B, sendo que para 5,3% dos isolados nenhum produto foi amplificado, sugerindo a possível ocorrência de genes dos demais grupos *van* conhecidos entre os isolados. Os resultados obtidos indicam, de forma inédita no país, a circulação de VRE em propriedades produtoras de ovinos e caprinos, sem ocorrência de manifestações clínicas aparentes nos animais, porém com possíveis riscos à saúde dos produtores e profissionais envolvidos, bem como a eventuais consumidores.

Palavras-chave: *Enterococcus* resistentes à vancomicina, produção animal, ruminantes

ABSTRACT

JIMENEZ O., E. **Detection of vancomycin-resistant enterococci in sheep and goat farms from Central-Eastern and Northeastern regions of São Paulo State.** 2016. M.Sc. 63 f. Dissertation - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

Demands for sanitary conditions in animal farming have been increasing progressively given the need to combine productivity and high quality products to support increasingly demanding consumer markets. In this context, antimicrobial drugs used in prevention as well as in therapy remain as the control strategy for several pathogenic microorganisms, not important only in animal production but also in human health, although restrictions for the indiscriminate use of these drugs have been intensified. However, the excessive use of these products has been associated to the selection of resistant microorganisms in production areas. On the other hand, investigation on strains of public health importance circulating in animal herds is still limited in Brazil. *Enterococcus* genus bacteria, usually present in animal and human gastrointestinal microbiota, are environmental indicators of fecal contamination and have become a concerning subject in public and veterinary health given the occurrence of strains resistant to vancomycin (VRE). The present study aimed to isolate, quantify and characterize VRE present in stool samples of sheep and goats from several farms in the center-east and northeast regions of São Paulo State. Swabs collected one hundred and thirty-two stool samples either directly from the animal´s rectum or from the ground. Samples were plated onto m-*Enterococcus* agar plates and subcultivated in Bile esculin agar with 6 μg/mL of vancomycin (BEAV) to confirm *Enterococcus* spp and detect resistant samples. Colonies were identified by colonial morphology, Gram's staining, biochemical, and molecular profile. The highest colony count was equal to 2.6×10^5 and 1.7×10^5 CFU/g of feces from environmental and animal samples, respectively. Regarding biochemical characterization, *Enterococcus faecalis* e *Vagococcus fluvialis* were the most prevalent species. VRE was detected on BEAV in 33 out of 84 sheep-goat samples and in 21 out of 48 ambient samples, indicating a positivity rate of 46.7% and 29.3% respectively in the investigated samples. Analysis by multiplex PCR of the obtained 54 VRE strains indicated that 23 (43%), 22 (41%) 2 (3.5%) and 2 (3.5%) were positive, respectively, for the *van*C2/C3, *van*C1, *van*A and *van*B genes, and no product was amplified for 5.3% of the isolates, suggesting the possible occurrence of other known van gene groups among the isolates. The results obtained in this study indicate, for the first time in the studied areas, the circulation of VRE in sheep and goat farms, with no occurrence of apparent clinical signs in the animals, but with possible health risks to the farmers and workers involved, as well as potential consumers.

Keywords: Vancomycin-resistant Enterococci (VRE), animal production, ruminants

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Fluxograma da metodologia microbiológica, isolamento e contagem bacteriana. A-Coleta de amostras fecais retais..... 28
Figura 2. Fluxograma de testes para confirmação do gênero *Enterococcus* spp..... 29
Figura 3. Fotografia do teste de Hidrólise da L-pirrolidonil- β-naftilamida (PYR test) 30
Figura 4. Fotografia do teste de produção de pigmento 31
Figura 5. Fotografia da identificação bioquímica da cepa *Enterococcus* faecalis ATCC 00652–FIOCRUZ, empregando o Enterokit® (Probac, Brasil). 32
Figura 6. Fluxograma da metodologia do teste de sensibilidade antimicrobiana..... 34
Figura 7. Fluxograma da metodologia do E-Test para determinação MIC para vancomicina e teicoplanina das colônias VRE isoladas dos setores produtivos de ovinos e caprinos..... 36
Figura 8. Fotografia de gel de agarose corado com SYBR® Gold, sob luz UV, ilustrando resultados de amplificação de fragmentos relativo aos marcadores para E. faecalis (518pb) e E. casseliflavus (269 pb), obtidos através da técnica de PCR, a partir do DNA extraído de amostras fecais de ovinos e caprinos. 47
Figura 9. Número de colônias identificadas por espécie de *Enterococcus* por meio de PCR nos 54 isolados VRE de amostras fecais dos setores de ovinos e caprinos. 48
Figura 10. Fotografia de gel de agarose corado com SYBR® Gold, sob luz UV, ilustrando resultados de amplificação de fragmentos relativo aos genes de resistência (vanA, 732pb; vanB, 635pb; vanC1, 822pb, e vanC2-vanC3, 439pb), obtidos através da técnica de PCR, a partir do DNA extraído de amostras fecais de ovinos e caprinos.. 50
Figura 11. Porcentagem dos perfis genéticos de resistência detectados nos isolados de *Enterococcus* em amostras fecais dos setores de ovinos e caprinos..... 51
Figura 12. Porcentagens comparadas de isolados de VRE, identificadas pelos métodos bioquímico e molecular utilizados..... 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Leitura de resultados na identificação dos isolados, de acordo com o Enterokit® (Probac, Brasil).....30

Tabela 2. Leitura de resultados na identificação dos isolados, de acordo com o Enterokit® (Probac, Brasil).....32

Tabela 3. Identificação dos isolados, por espécie, utilizando-se o Enterokit® (Probac, Brasil). 33

Tabela 4. Padrão de interpretação dos diâmetros das zonas de inibição do crescimento bacteriano para *Enterococcus* spp. 35

Tabela 5. Padrão de interpretação do "breakpoint" para interpretação do MIC do crescimento bacteriano para *Enterococcus* spp. 36

Tabela 6. Sequência de oligonucleotídeos utilizados para a amplificação de fragmentos relativos aos genes marcadores de espécie e de resistência para *Enterococcus* spp. 38

Tabela 7. Espécies de *Enterococcus* identificadas pelo teste bioquímico convencional.....41

Tabela 8. Perfil de susceptibilidade das 54 amostras VRE aos antimicrobianos de acordo com o método de disco-difusão.....42

Tabela 9. Resultados obtidos a partir da determinação da concentração inibitória mínima de vancomicina e teicoplanina frente a 53 colônias de VRE isoladas de amostras de ovinos e caprinos.....45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABEV - Ágar Bile Esculina acrescido de 6 μg/mL de vancomicina

AST - *Antimicrobial Susceptibility Testing*

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BHI - Brain Heart Infusion / Infusão cérebro-coração

ATCC - American Type Culture Collection

CDC - Centers for Disease Control and Prevention / Centros de Controle e Prevenção de Doenças

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

Da - Daltons (Unidade de massa molecular)

DNA - Deoxyribonucleic acid / Ácido desoxirribonucleico

EUA – Estados Unidos da América

FDA - Food and Drug Administration / Administração Federal de Alimentos e Drogas

mL - Mililitro

MRSA - Methicillin-resistant *Staphylococcus Aureus* / *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina

MIC – Minimal Inibitory Concentration / Concentração Inibitória Mínima

NaCl – Cloreto de sódio

OMS – Organização Mundial de Saúde

Pb – Pares de base

PCR - Polymerase Chain Reaction / Reação em cadeia da polimerase

PYR - L-pirrolidonil-beta-naftilamida

RAM - Resistência Antimicrobiana

UFC/mL - Unidades Formadoras de Colônias por mililitro

UTIs – Unidades de Tratamento Intensivo

VRE – Vancomycin-resistant enterococci / *Enterococcus* Resistentes à Vancomicina

μg/mL – Microgramas por mililitro

μL – Microlitro

LISTA DE SÍMBOLOS

= igual

% porcentagem

+ positivo

°C grau Celsius

≥ maior ou igual

≤ menor ou igual

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 15

2. REVISÃO DE LITERATURA 17

2.1 O gênero *Enterococcus* spp. 17

2.2 Importância da resistência bacteriana na saúde humana e animal 18

2.3 Enterococos Vancomicina Resistentes - VRE 19

2.4 O antibiótico vancomicina 22

2.5 Provas bioquímicas e moleculares para determinação de resistência em bactérias Gram positivas 23

2.6 Investigações relacionadas a VRE no mundo 24

3. JUSTIFICATIVA 25

4. OBJETIVOS 26

4.1 Objetivo geral 26

4.2 Objetivos específicos 26

5. MATERIAL E MÉTODOS 27

5.1 Propriedades e seleção dos animais 27

5.2 Amostras fecais 27

5.3 Amostras ambientais 27

5.4 Avaliação microbiológica, isolamento e contagem bacteriana 27

5.5 Caracterização do gênero *Enterococcus* spp. 28

5.5.1 Atividade de catalase 29

5.5.2 Hidrólise da L-pirrolidonil- β-naftilamida (PYR test) 29

5.6 Identificação bioquímica das espécies de *Enterococcus* 30

5.6.1 Provas de Motilidade, utilização de carboidratos e hidrólise de arginina 30

5.7 Testes de sensibilidade a antimicrobianos 33

5.7.1 Método de disco-difusão 33

5.7.2 Minimal Inibitory Concentration - MIC para vancomicina e teicoplanina 35

5.8 Diagnóstico molecular 37
5.8.1 Extração de DNA 37
5.8.2 Determinação das concentrações de DNA 37
5.8.3 Multiplex PCR 37
5.8.4 Eletroforese em gel 38
5.9 Aspectos éticos 39
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO 40
6.1 Identificação fenotípica e bioquímica de cepas *Enterococcus* spp 40
6.2 Avaliação de sensibilidade aos antimicrobianos 42
6.3 Confirmação das cepas bacterianas identificadas como *Enteroccocus* Vancomicina Resistentes por PCR 46
7. CONCLUSÕES 54
8. BIBLIOGRAFIA 55
9. ANEXOS 61
10. APÊNDICE 63

1. INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Enterococcus* são conhecidas há mais de um século por seu papel como causa de endocardite em seres humanos, sendo inicialmente conhecidas por sua baixa virulência e seu reduzido impacto clínico. No entanto, foram emergindo como importantes microrganismos oportunistas e, na atualidade, podem ser causa de quadros humanos fatais na ausência de terapia antimicrobiana eficaz (CHAVERS et al., 2003; OBENG et al., 2013). Atualmente, este grupo de bactérias é reconhecido como contendo agentes etiológicos de importância em infecções adquiridas nos ambientes nosocomiais, bacteremias, infecções do abdômen, pelve, trato biliar e infecções neonatais (RANOTKAR et al., 2014). Sua origem é fecal, seja a partir do trato intestinal humano ou dos animais de sangue quente. São prevalentes nos pêlos, plumas e cascos dos animais, e ainda podem ser encontrados nos equipamentos, mãos dos trabalhadores e alimentos de origem animal como leite e carne. A transmissão dessas bactérias pode ser ocasionada pelo contato fecal-oral, contaminação cruzada com o conteúdo intestinal, ambiente contaminado com fluidos corporais de animais ou contato com as superfícies contaminadas (LÓPEZ; TENORIO; TORRES, 2013). Muitos estudos têm sido desenvolvidos na análise de cepas de *Enterococcus* carreadores de genes de virulência, bem como daquelas contendo genes codificadores de resistência a antimicrobianos, em isolados de animais de produção e isolados de alimentos de origem animal (SPARO et al., 2011).

Após primeira identificação em meados da década de 1980, os *Enterococcus* resistentes aos glicopeptídeos surgiram como importantes patógenos hospitalares, e tornaram-se um grande problema em muitas instituições, pelo seu alto potencial para a resistência aos antibióticos clinicamente úteis e surgimento de um grande número de linhagens multirresistentes, principalmente devido a capacidade de efetuar trocas de determinantes de resistência com outros microrganismos, assim como sua capacidade de se adaptar a diversos ambientes inóspitos, incluindo hospitais (SOFIANOU et al., 2004; HOLLENBECK; RICE, 2012). Dados recentes de vigilância indicam que o grupo dos enterococos é o terceiro patógeno nosocomial mais comumente isolado (12% de todas as infecções hospitalares), após os *Staphylococcus* coagulase negativos e *Staphylococcus aureus* (WHO, 2014). A ameaça à saúde pública devido ao crescimento da resistência antimicrobiana é impulsionada tanto pelo uso adequado como inadequado de

medicamentos anti-infecciosos utilizados na saúde humana e animal bem como na produção de alimentos e, ainda, com medidas inapropriadas para controlar a disseminação de infecções (CLSI, 2012). Hoje em dia, o uso massivo desses fármacos em humanos, animais e na agricultura vem transformando esse fenômeno num problema crescente e altamente preocupante (PRAHARAJ; SUJATHA; PARIJA, 2013), pelo fato de que o uso intensivo dos mesmos aumenta a tendência das espécies de *Enterococcus* em adquirir os genes de resistência a antibióticos aminoglicosídeos e glicopeptídeos, portanto limitando severamente as opções disponíveis para o tratamento de infecções graves causadas por estes organismos (HIDRON et al., 2008). As cepas resistentes aos antibióticos de uso comum podem ser reduzidas usando terapia com vancomicina ou teicoplanina, entretanto o problema surge quando estas são também resistentes a este tipo de antibióticos passando a ser um assunto de grande importância para a saúde pública devido a sua associação com o aumento da mortalidade e altos custos de atenção médica nas unidades de terapia intensiva-UTIs (FERNANDES; DHANASHREE, 2013).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O gênero *Enterococcus* spp.

Os cocos Gram-positivos foram descritos como *Streptococcus*, até a década de 1980, sendo as espécies mais comuns, *Streptococcus faecium* e *Streptococcus faecalis* (MURRAY, 2000). Posteriormente, os cocos Gram-positivos foram reclassificados dentro dos gêneros *Streptococcus, Lactococcus* e *Enterococcus* por Schleifer and Kilpper-Bälz (1984), sendo as espécies de *Streptococcus* citadas agrupadas no novo gênero *Enterococcus* spp., compreendendo o terceiro maior gênero de bactérias ácido lácticas (LAB), após os gêneros *Lactobacillus* e *Streptococcus*. O número exato de espécies variou ao longo do tempo pelo fato de que as espécies estão sendo reclassificadas ou novos táxons são descobertos (FRANZ et al., 2011).

O gênero *Enterococcus* é composto por cocos Gram positivos, geralmente de forma esférica, menores do que 2 µm de diâmetro e que podem ser observados como células individuais ou em arranjos de dois ou mais cocos, formando cadeias com morfologia ovóide (SILVA et al., 2010). São integrantes usuais da microbiota gastrointestinal animal e humana, podendo sobreviver em ambientes e superfícies durante grande período de tempo (LOWDEN; MILLER; YAHDI, 2014). São encontrados no solo, nos alimentos, na água, em plantas, animais, pássaros, insetos e em humanos. São comensais da cavidade oral, do trato gastrointestinal e do trato geniturinário feminino (LÓPEZ; TENORIO; TORRES, 2013).

Quanto às suas características fisiológicas, são aeróbios facultativos, capazes de crescerem em condições extremas tais como cloreto de sódio (NaCl) a 6,5%, pH 9,6 e em temperaturas entre 10-45ºC e sob a ação de desinfetantes químicos como o glutaraldeído, cloro e álcool. Sobrevivem até 30 min a 60ºC e hidrolisam a esculina na presença de 40% de sais biliares, dados que ajudam a explicar a sua sobrevivência e disseminação nos hospitais (CETINKAYA; FALK; MAYHALL, 2000). Embora, normalmente, colonizadores dos tratos gastrointestinal e genital feminino, os enterococos têm-se destacado, nos últimos anos, como patógenos importantes em infecção hospitalar (SARAIVA et al., 1997), além de serem bactérias amplamente utilizadas como indicadores de contaminação fecal de ambientes aquáticos e estarem associadas ao grande aumento de infecções humanas (THEVENON et al., 2012).

Atualmente, cerca da metade das espécies de *Enterococcus* foram relativamente descritas, das quais 51 espécies são validamente referidas na literatura, sendo os *E. faecalis, E. faecium, E.*

durans, E. avium, E. gallinarum, E. casseliflavus, E. raffinosus, E. malodoratus, E. hirae, E. mundtii, E. solitarius e *E. pseudoavium* as de maior importância clínica (MURRAY, 1990). No entanto, apenas umas poucas têm sido isoladas de infecções humanas, sendo *E. faecalis* e *E. faecium* as mais frequentemente encontradas (LÓPEZ; TENORIO; TORRES, 2013; SOFIANOU et al., 2004; SONG et al., 2006), além de serem as causadoras principais de infecções decorrentes incluindo as do trato urinário, feridas cirúrgicas, intra-abdominais secundárias, colecistite, endocardite, bacteremia e raramente meningite (RUBINSTEIN; KEYNAN, 2013). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil - ANVISA, (2010), os enterococos mais comumente isolados são *Enterococcus faecalis* com 90% dos casos, seguidos de *Enterococcus faecium*, representando 5 e 16% dos casos clínicos, com grande capacidade de colonização de pacientes e de contaminação de superfícies ou equipamentos utilizados em hospitais. Porém, outras espécies de *Enterococcus* (*E. gallinarum, E. casseliflavus, E. durans, E. avium,* e *E. raffinosis*) são frequentemente isolados e responsáveis, por pelo menos, 5% dos casos clínicos (CETINKAYA; FALK; MAYHALL, 2000).

2.2 Importância da resistência bacteriana na saúde humana e animal

Segundo o Centers for Disease Control and Prevention (CDC) de Atlanta, nos Estados Unidos, microrganismos resistentes são aqueles que apresentam resistência a uma ou mais classes de antimicrobianos. A denominada resistência antimicrobiana (RAM), de uma extensa gama de agentes infecciosos, é uma ameaça cada vez mais grave para a saúde pública global, requerendo ações em setores governamentais e da sociedade de vários países (OMS, 2012). Cada vez mais, governos ao redor do mundo estão começando a prestar atenção para este problema que ameaça as conquistas da medicina moderna no tocante à prevenção e tratamento mais eficazes para uma gama cada vez maior de infecções (WHO, 2014).

A resistência antimicrobiana está presente em todas as partes do mundo, estando associada ao aumento da morbidade e letalidade nas instituições de cuidados à saúde com grandes implicações sociais e econômicas (DREES et al., 2008). O desenvolvimento de resistência por um número crescente de patógenos a um número também cada vez maior de antibióticos é um problema que vem aumentando ao longo de várias décadas (SOLDATELLI; LORENZINI, 2013). Este fato alcançou uma escala e distribuição que levou à OMS a reconhecer a RAM como uma crise de saúde pública global (OMS, 2012). Tem se tornado uma inevitável consequência do uso

indiscriminado de antibióticos tanto na saúde humana como na produção animal, propiciando a seleção de microrganismos mais resistentes, contra os quais os fármacos existentes tornam-se ineficazes (SUJATHA; PRAHARAJ, 2012). O uso de antibióticos veterinários vem sendo corrente na pecuária com o objetivo de garantir a produtividade, promoção de crescimento, saúde e o bem-estar animal; porém, o uso a níveis subterapêuticos, exerce grande pressão sobre o surgimento de bactérias resistentes, tendo possível efeito sobre a saúde humana (HART; HEUZENROEDER; BARTON, 2004). Na Europa e nos Estados Unidos, microrganismos como Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Streptococcus pneumoniae* não susceptível à penicilina (PNSSP), *Enterococos* resistente à vancomicina (VRE) e *Enterobacteriaceae* produtoras de beta-lactamase de espectro ampliado (ESBL) têm surgido rapidamente e se propagado nos hospitais e nas comunidades (DESHPANDE et al., 2007).

A OMS ressalta evidências de que os animais de produção são reservatórios de bactérias resistentes e que se deve direcionar os esforços na interface entre a medicina humana e a veterinária para abordarem com maior propriedade esse problema. Nesse sentido, países da União Europeia proibiram, em 1997, a utilização de avoparcina (Directiva 97/6/CEE) e, em 1998, de bacitracina-zinco, espiramicina, virginiamicina e fosfato de tilosina (Directiva 70/524/CEE), aditivos na alimentação animal, como medidas de vigilância ao surgimento de resistência dos agentes antimicrobianos rotineiramente utilizados em doenças graves em humanos ou para aqueles utilizados como “primeira linha” em medicina humana.

As bactérias do gênero *Enterococcus*, conhecidas por muitos anos como microrganismos de segunda classe, foram transformados em um grande problema clínico devido a fatores como a resistência intrínseca a alguns antimicrobianos, sua capacidade para adquirir e disseminar os genes de resistência, a fácil adaptação a diversos ambientes incluindo hospitais (NOGUEIRA, 2013), assim como o aumento na habilidade de certas linhagens genéticas, a exemplo de *E. faecium*, para colonizar o trato gastrointestinal de humanos, causar doenças e apresentar alto nível de resistência para os antimicrobianos recomendados para enterococos (DA SILVA, 2012).

2.3 Enterococos Vancomicina Resistentes - VRE

Os *Enterococcus* representam grande preocupação pelo seu alto potencial de disseminação em termos de contato, sua capacidade de adquirir e transferir os genes determinantes de resistência a outras espécies bacterianas e também pela alta resistência atualmente apresentada aos antibióticos

glicopeptídeos (TACCONELLI; CATALDO, 2008), sendo que as opções terapêuticas em infecções enterocócicas apresentam-se limitadas e, portanto, têm-se tornado objeto de preocupação em saúde pública e veterinária (RANOTKAR et al., 2014). Com o aumento da sua participação em infecções oportunistas e isolamento de estirpes multirresistentes em ambientes hospitalares (KANG et al., 2014), verifica-se um aumento gradativo de infecções sistêmicas enterocócicas, principalmente associadas com resistência à vancomicina (CETINKAYA; FALK; MAYHALL, 2000), em quadros de bacteremia, endocardite ou infecções do trato urinário, pélvicas, abdominais e feridas (FRANZ et al., 2011).

Após o surgimento e identificação dos VRE pela primeira vez em 1980, na Franca, os VRE tornaram-se rapidamente um grande problema em muitos locais, tanto na Europa como nos Estados Unidos (CETINKAYA; FALK; MAYHALL, 2000). Surtos por infecções nosocomiais por VRE constituem um problema sério e de grande preocupação em termos de biossegurança hospitalar (KALOCHERETIS et al., 2004). Alguns autores indicam que sua rápida disseminação nos EUA durante as duas últimas décadas não é totalmente compreendida, concorrendo para o aumento da ocorrência da referida resistência em infecções hospitalares (MCBRIDE et al., 2007); outros autores têm associado tal resistência diretamente ao uso excessivo da vancomicina, bem como de outros antimicrobianos, assim como a falta de implementação de práticas apropriadas no controle de infecções (KALOCHERETIS et al., 2004; PATEL, 2003). Tal resistência ocorre pela produção, por parte dos microrganismos, de precursores de peptideoglicanos da parede celular que se ligam fracamente à vancomicina (FRANZ et al., 2011).

Em estudos comparativos com outros cocos Gram-positivos de importância clínica, o gênero *Enterococcus* é um dos mais resistentes aos diferentes agentes antimicrobianos utilizados rotineiramente nos hospitais para tratamento de infecções. Os dois grupos de drogas aos quais mais o referido gênero apresenta resistência são os beta-lactâmicos (penicilina, ampicilina e vancomicina) e aminoglicosídeos (gentamicina e estreptomicina) (MANFREDI; SABBATANI, 2009; PFALLER et al., 1999). É válido ressaltar que o glicopeptídeo vancomicina constitui um dos poucos, senão o único, antibiótico eficaz para tratamento de bactérias resistentes a penicilinas e seus derivados (LOWDEN; MILLER; YAHDI, 2014). Os VRE são um problema global e têm sido isolados com alta frequência nos hospitais brasileiros; a maioria é *E. faecium* fenótipo VanA (VREFM), porém existe um clone específico de *E. faecalis* fenótipo VanA (VREFS) que tem se

disseminado rapidamente em vários hospitais do país (ANVISA, 2010). Vários fatores de risco foram identificados para infecções por VRE: hospitalização prolongada dos pacientes, especialmente na UTI, doenças graves subjacentes com imunocomprometimento, neutropenia, transplante de órgãos, insuficiência renal/diálise, infecção hospitalares anteriores, transferência intra-hospitalar de pacientes (AARESTRUP et al., 1998; HAWLEY; ELDER, 1998).

Bactérias desse gênero, além de apresentarem resistência intrínseca aos antibióticos universalmente disseminada no genoma das espécies, também são capazes de adquirir novos genes através da aquisição de novos elementos genéticos ou através de mutações esporádicas nos genes intrínsecos (RUBINSTEIN; KEYNAN, 2013). Atualmente, são conhecidos nove fenótipos de resistência aos glicopeptídeos em *Enterococcus*, produzidos por diferentes determinantes genéticos de resistência, denominados VanA, VanB, VanC, VanD, VanE, VanG, VanL, VanM, e VanN, sendo VanA o fenótipo mais predominante no mundo todo (HOLLENBECK; RICE, 2012; KALOCHERETIS et al., 2004). Estes genes codificam determinantes de resistência intrínseca ou adquirida, resultando em alterações no local de ligação ao peptidoglicano e reduzindo significativamente a resistência de ligação da vancomicina. Todos estes fenótipos compartilham um mecanismo de resistência muito similar, baseado na modificação do local de atuação dos glicopeptídeos, por exemplo, na modificação do dipeptídeo D-alanina-D-alanina, que é substituído por D-alanina-D-lactato ou por D-alanina-D-serina, os quais apresentam baixa afinidade por estes antimicrobianos (XU et al., 2010; LEBRETON et al., 2011). A reação em Cadeia pela Polimerase (PCR do ingles Polymerase Chain Reaction) é o método mais eficaz, confiável e mais utilizado até o momento para a identificação destes genes determinantes de resistência nas espécies de enterococos (ATEBA; LEKOMA; KAWADZA, 2013).

Por outro lado, o aumento de enterococos resistentes pode ser relacionada à utilização de antimicrobianos de maneira excessiva e indiscriminada na produção animal (HARAKEH; YASSINE; EL-FADEL, 2006). Paralelamente, os resíduos desses antimicrobianos podem permanecer nos produtos de origem animal ou ainda serem dispersados no meio ambiente (solo, alimentos e ambientes aquáticos) (MCKEON; CALABRESE; BISSONNETTE, 1995). Nesse sentido, é importante ressaltar que o controle de VRE abrange necessariamente o uso racional de antibióticos durante a produção dos produtos de origem animal para prolongar a eficiência dos mesmos e consequentemente reduzir a quantidade de resíduo liberada para o ambiente (WERNER,

2011). A vigilância da resistência em cepas de *Enterococcus* isoladas a partir de animais de produção é muito importante para o monitoramento do aparecimento de cepas resistentes que possam transferir seus determinantes de resistência a outras estirpes potencialmente patogênicos, ou que estas mesmas possam causar infecções em pacientes susceptíveis. É por esta razão de grande importância conhecer a porcentagem de resistência em cepas de origem veterinária como uma ferramenta para tomar medidas e reduzir o risco de transferência de cepas resistentes à população (RAMOS et al., 2012).

2.4 O antibiótico vancomicina

A vancomicina, foi descoberta em 1956 e aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) em 1958. É um antimicrobiano glicopeptídeo relativamente grande (com peso molecular de 1.485,70 Da), obtido de *Nocardia orientalis*, e que tem sido usado na rotina clínica por quase 50 anos como uma importante alternativa terapêutica da penicilina para tratar infecções por cepas de enterococos, outras bactérias Gram-positivas e algumas anaeróbias resistentes à penicilina (MOELLERING, 2006), além de ser indicada no tratamento de colites causadas por *Clostridium difficile*, e ser uns dos antibióticos mais usado nos Estados Unidos para o tratamento de infecções envolvidas com *S. aureus* resistentes a meticilina – MRSA (LEVINE, 2006). A vancomicina foi o medicamento de escolha por sua atividade previsível contra a MRSA, conhecido por décadas como um dos maiores causas de infecção hospitalar no mundo todo, começando assim uma nova era na história do antibiótico (SARAVOLATZ et al., 1982). Este antibiótico não interage nem bloqueia nenhuma das enzimas envolvidas na síntese do peptideoglicano, como é feito pelos beta-lactâmicos, mas sim bloqueia fisicamente o substrato mais importante para a síntese da parede celular: os resíduos pentapeptídeos de D-alanina-D-alanina (DDR) do lipídio precursor II. Como consequência, inibe a ação da enzima glicosil-transferase (enzima de síntese da parede celular) para produzir a cadeia nascente de peptideoglicano (HIRAMATSU, 2001). No entanto, além destes resíduos que constituem o alvo da vancomicina, o peptideoglicano da parede celular de *S. aureus* possui perto de $6{,}0 \times 10^6$ DDRs, que podem se ligar ao antimicrobiano, enquanto atinge a camada do peptidoglicano. Deste modo, os resíduos da parede celular podem operar como falsos substratos para a vancomicina, fazendo o medicamento ineficaz em termos de concentrações adequadas para seus alvos (CUI et al., 2005).

Organismos resistentes aos glicopeptídeos modificam estes precursores pentapeptídicos, substituindo o terminal D-ala com D-lac ou D-ser. Estes precursores da parede celular modificados se ligam aos glicopeptídeos com 1000 vezes menor afinidade do que os precursores normais (HOLLENBECK; RICE, 2012). Adicionalmente, este agente antimicrobiano, junto com teicoplanina e decoplanina, são denominados glicopeptídeos por sua estrutura química complexa composta por aminoácidos e açúcares, sendo medicamentos de ação bactericida (FRANZ et al., 2011).

2.5 Provas bioquímicas e moleculares para determinação de resistência em bactérias Gram positivas

A detecção de susceptibilidade de bactérias isoladas aos antimicrobianos é realizada com o objetivo de se verificar a possível resistência de patógenos comuns aos medicamentos e assegurar a susceptibilidade a drogas utilizadas para controle de infecções específicas (JORGENSEN; FERRARO, 2009). Os métodos de teste mais amplamente utilizados na atualidade incluem: teste de micro diluição em caldo ou teste de concentração inibitória mínima (*Minimal Inibitory Concentration*, MIC), o teste de difusão em disco, a difusão a partir de fitas com gradientes exponenciais do antimicrobiano (HECHT, 2002) e os métodos automatizados que utilizam materiais e dispositivos encontrados comercialmente.

Alguns métodos como o MIC fornecem resultados quantitativos e todos fornecem avaliações qualitativas segundo a classificação: susceptível, intermediário ou resistente. Em geral, os métodos atuais fornecem detecção precisa de resistência a antimicrobianos comuns (GARCÍA-SÁNCHEZ; GARCÍA-SÁNCHEZ; GARCÍA-GARCÍA, 2014). No entanto, os mecanismos mais recentes ou emergentes de resistência exigem vigilância constante quanto à capacidade de cada método com o objetivo de detectar com precisão tal resistência (JORGENSEN; FERRARO, 2009).

O método de difusão em disco é simples, prático, padronizado e referenciado pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* – (CLSI) (HECHT, 2002; OBENG, 2013). O teste é realizado através da aplicação de inóculo bacteriano contendo aproximadamente 1-2 × 10^8 UFC/mL, semeado em superfície de placa de Ágar Mueller Hinton (150 mm de diâmetro). Discos de celulose comerciais, adsorvidos com antibióticos em concentrações conhecidas, são colocados na superfície do meio inoculado, seguido de incubação durante 16-24 h a 35°C. As zonas de inibição de

crescimento em torno de cada um dos discos de antibióticos são medidas em milímetros (JORGENSEN; FERRARO, 2009).

O método de difusão utilizando fitas com gradientes crescentes de antimicrobianos em ágar como meio de determinação da sensibilidade é conhecido como E-test, MIC evaluator ou ainda MIC test strip. O E-test está aprovado pela FDA e é um método simples de rotina, útil porque permite testar a sensibilidade dos isolados incluindo o crescimento muito exigente e lento. Entretanto, tem como desvantagem o elevado custo das fitas (JORGENSEN; FERRARO, 2009).

2.6 Investigações relacionadas a VRE no mundo

Em relação a investigações sobre enterococos multirresistentes relacionados à produção animal, estudos tem sido desenvolvidos em vários países da União Europeia, demostrando que cepas de *Enterococcus faecium*, isoladas de amostras de diferentes animais de produção (suínos, aves e bovinos) apresentavam níveis de resistência à vancomicina, antimicrobiano de uso exclusivo na medicina humana (RANOTKAR et al., 2014). Hart; Heuzenroeder e Barton (2004) avaliaram a resistência antimicrobiana à vancomicina de cepas de *Enterococcus* isolados de carcaças de suínos na Austrália, encontrando uma porcentagem de 30% entre os isolados; não obstante, os resultados obtidos em outros estudos têm demonstrado elevado número de cepas resistentes mundialmente. Hölzel et al. (2014) estudaram a presença dos genes VanC1, VanXYc e VanT conferindo resistência intrínseca à vancomicina em espécies como *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*, isoladas a partir de suabes cloacais de galinhas poedeiras. López, Tenorio e Torres, (2013) investigaram a transmissão de VRE entre cães saudáveis e pessoas, compreendendo 126 amostras fecais de cães, detectando 12% de VRE com resistência intrínseca (VanC) entre os isolados de *Enterococcus*, mas nenhuma resistência adquirida.

3. JUSTIFICATIVA

As exigências das condições higiênico-sanitárias na produção de animais de interesse zootécnico vêm aumentando progressivamente dada à necessidade de aliar-se produtividade à produtos de alta qualidade para atender a mercados consumidores cada vez mais exigentes. Diante das exigências do mercado, um dos temas mais importantes é o uso de antibióticos no controle e prevenção de microrganismos indesejáveis (NILSSON, 2012).

A utilização de antibióticos na produção animal é uma necessidade para a garantia de produtos de melhor qualidade, cuja obtenção está diretamente vinculada ao monitoramento higiênico-sanitário de todas as etapas de processamento das plantas industriais, incluindo frigoríficos e laticínios (CASELLAS, 2011). Nesse sentido, a utilização de antimicrobianos, tanto na profilaxia como na terapêutica, permanece como estratégia de controle para vários microrganismos patogênicos, de importância não apenas para a saúde animal como também para a humana, ainda que restrições ao uso indiscriminado desses produtos têm se intensificado. Não obstante, o uso excessivo desses produtos está associado à seleção de microrganismos cada vez mais resistentes aos tratamentos antimicrobianos nas áreas de produção (SUJATHA; PRAHARAJ, 2012). Tal resistência aos antibióticos é um sério problema do ponto de vista clínico e de saúde pública, pois os animais, e consequentemente derivados alimentícios desses, tornam-se reservatórios ou fontes de disseminação de resistência bacteriana na espécie humana (MOTA et al., 2005).

No Brasil, tem-se realizado estudos para a determinação de resistência fenotípica e genotípica em cepas isoladas de animais de interesse zootécnico. Os microrganismos mais frequentemente estudados têm sido *E. coli* e *Salmonella* spp. encontrando-se altas porcentagens de resistência aos antimicrobianos mais comumente utilizados (FIGUEIREDO et al., 2013; HARAKEH; YASSINE; EL-FADEL, 2006; MOTA et al., 2005). Porém, existem escassas informações sobre a prevalência da resistência de cepas de *Enterococcus* spp isoladas de animais de produção e ou sobre a circulação dessas cepas em rebanhos animais, até então restritas às populações humanas. Portanto, o presente estudo pretende contribuir com o conhecimento da circulação de cepas VRE em criações comerciais de ovinos e caprinos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Identificar e caracterizar fenotípica e geneticamente cepas de *Enterococcus* resistentes à Vancomicina – (*Vancomycin-resistant enterococci,* VRE) presentes em amostras fecais e ambientas de ovinos e caprinos, em pequenas propriedades de criação nas regiões centro-leste e nordeste do estado de São Paulo.

4.2 Objetivos específicos

- Isolar e quantificar VRE, a partir de amostras fecais de ovinos e caprinos e amostras ambientais oriundas de pequenas propriedades das regiões centro-leste e nordeste do estado de São Paulo,

- Caracterizar por provas bioquímicas os isolados de VRE,

- Avaliar o perfil de sensibilidade dos isolados de VRE a antimicrobianos,

- Realizar a detecção molecular das espécies de VRE isoladas,

- Investigar, por meio de métodos de biologia molecular, a existência de genes que determinam a resistência à vancomicina nos isolados.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Propriedades e seleção dos animais

Amostras fecais retais de ovinos e caprinos e amostras fecais do ambiente de criação desses animais foram coletadas em seis propriedades localizadas nas regiões centro-leste e nordeste do estado de São Paulo, nos municípios de Pirassununga (1 propriedade), Analândia (1 propriedade), Leme (1 propriedade), Jaboticabal (2 propriedades) e Descalvado (1 propriedade), incluindo animais a partir de um ano de idade, independentemente do sexo. Os animais foram amostrados ao acaso, com um total de 15 animais por propriedade.

5.2 Amostras fecais

No total, foram coletadas 33 amostras fecais de caprinos e 51 amostras fecais de ovinos, mediante uso de luvas descartáveis por espécime, diretamente do reto de cada animal, em quantidade aproximada de 3g, acondicionando-se a amostra em frasco de coleta para transporte. Os frascos uma vez fechados, marcados com o número do animal, data e local da coleta foram conservados a 4ºC, por um período máximo de 12 horas. As amostras foram transportadas até ao Laboratório de Higiene Zootécnica da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA-USP), para posterior análise.

5.3 Amostras ambientais

Oito amostras ambientais foram coletadas diretamente do piso das baias dos setores de produção de cada propriedade empregando-se suabes de algodão estéreis, através de esfregaço na área para coleta da amostra. A existência de alguma coloração no algodão indicava a coleta da amostra. O suabe foi guardado em frasco individual estéril e foi rotulado com o nome da amostra e o local da coleta. Após cada coleta, as amostras foram transportadas até ao Laboratório de Higiene Zootécnica da (FZEA-USP), para posterior análise.

5.4 Avaliação microbiológica, isolamento e contagem bacteriana

No laboratório, foram realizadas diluições seriadas de base 10 em solução estéril de água peptonada a 0,1% (p/v), de 10^{-1} a 10^{-5}. A partir dessas diluições, realizou-se a semeadura por espalhamento de 100 µL de cada diluição, em duplicata em meio Ágar m-Enterococcus (Difco®, BD, EUA), sendo este um Ágar Bile-Esculina com Azida, que permite detecção e identificação rápida e seletiva do gênero *Enterococcus* spp (ZIMBRO et al., 2009). As placas foram incubadas

por 48 horas a 37ºC. A contagem das colônias foi realizada na diluição correspondente ao crescimento bacteriano entre 25 e 250 colônias (SILVA et al., 2010).

Na etapa seguinte, as colônias apresentando coloração vermelho-escuro/marrom foram selecionadas para subcultivo em meio Ágar Bile-Esculina (Difco®, BD, EUA) acrescido de 6µg/mL de vancomicina (ABEV) para verificação de colônias resistentes, concentração utilizada segundo os procedimentos para determinação de analise fisiológico laboratorial estabelecidos pelo CLSI (CLSI, 2012) e determinação da hidrólise de esculina na presença da bile a 40%. Seguidamente, foram incubadas por 24 horas a 37ºC. O resultado foi considerado positivo quando houve escurecimento do meio, indicando a hidrólise da esculina, na presença de 40% de bile, e a resistência à vancomicina. Uma triplicata de cada colônia verificada como VRE em meio ABEV, foi inoculada em caldo BHI, as quais, após incubação por 24 horas a 37ºC foram conservadas congeladas a -20ºC, para serem utilizadas nos testes posteriores. As cepas *Enterococcus faecium* ATCC 700221, *Enterococcus faecalis* ATCC 00652 adquiridas Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brasil com fenótipo de resistência Van B e Van A, respectivamente, foram utilizadas como controle (Figura 1).

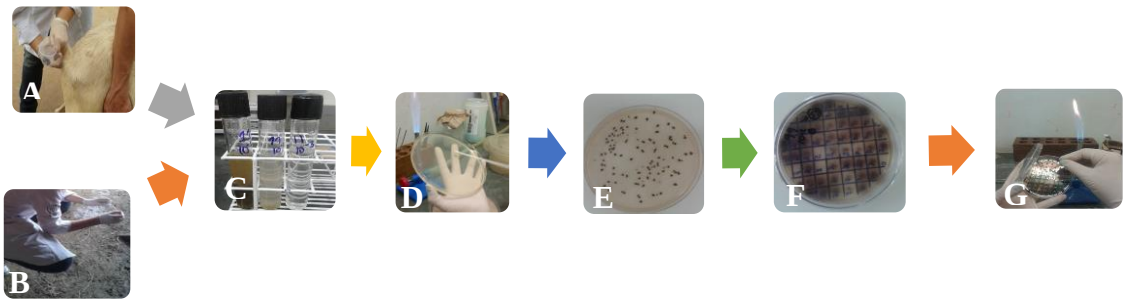

Figura 1. Fluxograma da metodologia microbiológica, isolamento e contagem bacteriana. A- Coleta de amostras fecais retais. B- Coleta de amostras ambientais. C- Diluições seriadas de base 10. E- Cultivo em Ágar m-*Enterococcus* (Contagem padrão em placa). F. Subcultivo em meio Ágar Bile Esculina acrescido de 6µg/mL de vancomicina. G. Isolamento de VRE.

5.5 Caracterização do gênero *Enterococcus* spp.

As colônias VRE isoladas das respectivas placas foram testadas para confirmação do gênero *Enterococcus* spp. com base em: observação de características morfo-tintoriais pelo método de

coloração de Gram, ausência de produção de catalase e hidrólise enzimática da L-pyrrolidonyl-beta-naphtylamide (PYR TEST) (Figura 2).

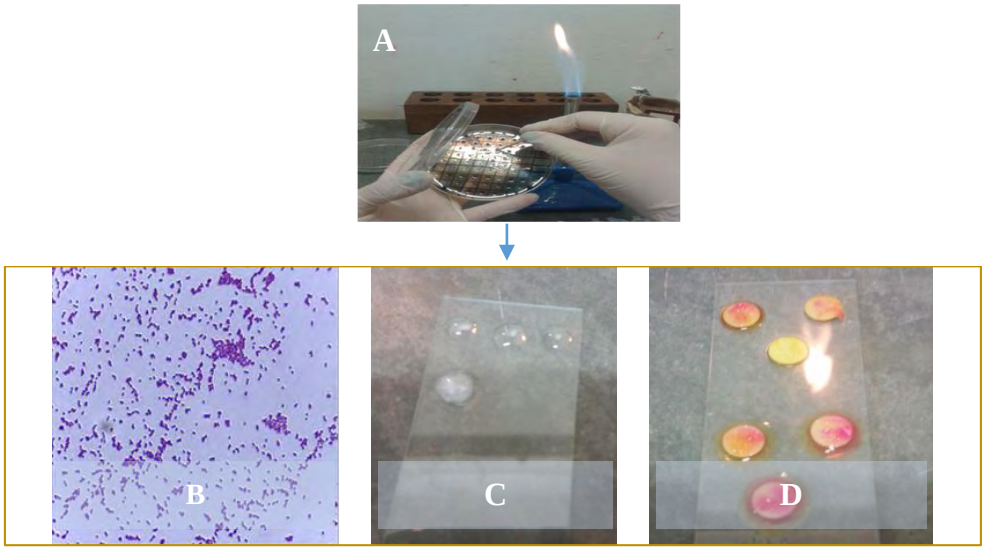

Figura 2. Fluxograma de testes para confirmação do gênero *Enterococcus* spp. A- Colônia isolada de VRE. B. Identificação tintorial por tinção de Gram, (resultado para VRE, Gram positiva). B- Ausência de produção de catalase (resultado para VRE, Catalase negativas). C- Hidrólise enzimática da L-pyrrolidonyl-beta-naphtylamide (resultado para VRE, PYR positivas).

5.5.1 Atividade de catalase

Para a determinação de produção de catalase, uma colônia bacteriana foi depositada em uma lâmina limpa e adicionou-se uma gota da suspensão de peróxido de hidrogênio a 3%, homogeneizou-se e observou-se a formação de bolha (catalase positiva) ou não formação de bolhas (catalase negativa) (Figura 2c).

5.5.2 Hidrólise da L-pirrolidonil- β-naftilamida (PYR test)

Esse teste determina a atividade da enzima PYR, também chamada pyrrolidonyl-aminopeptidase, produzida pelo *Enterococcus* spp. (ANVISA, 2010). O teste do PYR foi realizado utilizando-se um kit comercial (Probac, Brasil). Por meio deste teste verifica-se a hidrólise do substrato L-pyrrolidonyl-beta-naphtylamide, através da enzima L-pyroglutamyl-aminopeptidase. Em caso positivo, p-dimetil-aminocinamaldeído a 0,01%, reagente que faz parte do teste, reage com a beta-naphtylamide livre, formando uma Base de Schiff de coloração vermelha. Conforme instruções do fabricante, o disco de PYR foi impregnado com água destilada estéril e depositado

sobre uma lâmina ou placa de Petri. Em seguida, com o auxílio de uma alça previamente flambada, realizou-se um esfregaço da bactéria isolada a ser identificada sobre o disco de PYR umedecido. O tempo de incubação foi de 5 minutos, a temperatura ambiente e, em seguida, colocou-se uma gota do PYR Reagente (p-dimetil aminocinamaldeído a 0,01%). O desenvolvimento de uma cor vermelho-cereja indicou resultado positivo e uma cor amarela ou alaranjada, resultado negativo (Figura 3). As reações positivas ocorreram em até 1 minuto.

Figura 3. Fotografia do teste de Hidrólise da L-pirrolidonil- β-naftilamida (PYR test)

5.6 Identificação bioquímica das espécies de *Enterococcus*

A identificação ao nível de espécie foi realizada através de sistema baseado em testes fenotípicos convencionais. A identificação foi realizada para as colônias que se desenvolveram na cultura em Ágar Bile Esculina (Difco®, BD, EUA), acrescida de 6μg/mL de vancomicina e classificadas em Gram positivas, PYR positivas e catalase negativas. O apêndice II mostra as características utilizadas na identificação. As provas utilizadas na identificação foram as seguintes:

5.6.1 Provas de Motilidade, utilização de carboidratos e hidrólise de arginina

Foram realizadas as seguintes provas bioquímicas utilizando-se o kit de identificação Enterokit® (Probac, Brasil), baseado na identificação das espécies de *Enterococcus* spp de importância em clínica médica: manitol (MAN), arabinose (ARA), sorbitol (SOR), motilidade (MOT) e hidrólise de arginina (ADH).

As colônias isoladas VRE foram inoculadas em série de tubos manitol, arabinose, sorbitol e motilidade por picada central e os tubos de arginina e controle da descarboxilação foram inoculados com alça ou agulha, depositando-se o inóculo na parede do tubo, abaixo do óleo mineral. Os tubos foram incubados a 35°C por 24 horas. Os resultados foram considerados como positivos segundo as especificações do kit, como relacionado na tabela 1.

Tabela 1. Leitura de resultados na identificação dos isolados, de acordo com o Enterokit® (Probac, Brasil).

Tubo	Resultado positivo	Resultado negativo
Manitol Arabinose Sorbitol	Alteração para rosa intenso	Cor inalterada
Motilidade	Crescimento além da picada	Sem crescimento
Hidrólise de arginina	Cor púrpura do meio mais acentuada do que o tubo controle: utilização do aminoácido	Cor púrpura do meio igual ou mais amarelada do que o tubo controle: não utilização do aminoácido

A detecção da produção de pigmento amarelo foi realizada com auxílio de um suabe. A colônia crescida na superfície de uma placa com ágar Nutriente (Himedia, Mumbai, India) após incubação por 18-24h, foi tocada com um suabe e este examinado ao olho nu. A presença de cor amarela ou amarelo-alaranjada foi considerada resultado positivo (Figura 4a); a cor creme ou amarela pálida foi considerada como negativo (Figura 4b).

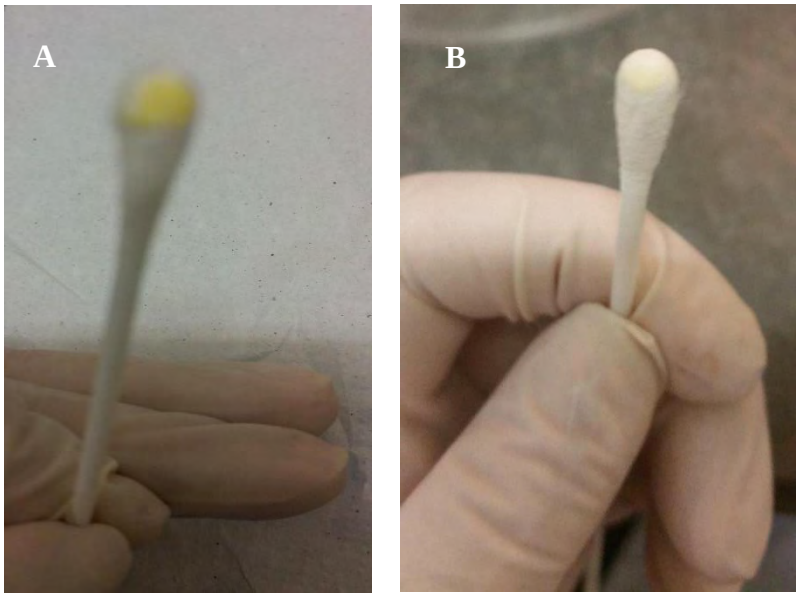

Figura 4. Fotografia do teste de produção de pigmento: A. Pigmento negativo; B. Pigmento positivo.

Realizou-se a leitura colocando os valores estabelecidos para as provas positivas e para as negativas assumindo o valor zero (Tabela 2). Em seguida se somaram os valores obtidos em cada série. O valor de A dá o primeiro algarismo, o valor de B dá o segundo e o valor de C dá o terceiro algarismo.

Tabela 2. Leitura de resultados na identificação dos isolados, de acordo com o Enterokit® (Probac, Brasil).

A		B		C	
Manitol	1	Arabinose	3	Motilidade	5
Arginina	2	Sorbitol	4	Pigmento	1

A figura 5 mostra o resultado obtido da sequência de tubos na identificação bioquímica pelo Enterokit® (Probac, Brasil) da cepa padrão *Enterococcus faecalis* ATCC 00652, adquirida da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brasil.

Figura 5. Fotografia da identificação bioquímica da cepa *Enterococcus faecalis* ATCC 00652– FIOCRUZ, empregando o Enterokit® (Probac, Brasil).

Finalmente, a leitura foi realizada de acordo com as indicações do fabricante, sendo realizada a interpretação do resultado pelo valor numérico gerado, associado aos valores padrões constantes da Tabela 3, indicando a espécie do *Enterococcus* spp isolado.

Tabela 3. Identificação dos isolados, por espécie, utilizando-se o Enterokit® (Probac, Brasil).

Número encontrado	Espécie	Grupo
376	*Enterococcus casseliflavus*	Grupo I
375	*Enterococcus gallinarum*	Grupo II
371	*Enterococcus mundtii*	Grupo II
370	*Enterococcus faecium*	Grupo II
340	*Enterococcus faecalis*	Grupo II
336	*Enterococcus casseliflavus*	Grupo II
335	*Enterococcus gallinarum*	Grupo II
331	*Enterococcus mundtii*	Grupo II
330	*Enterococcus faecium*	Grupo II
300	*Lactococcus spp*	Grupo II
200**	*Enterococcus díspar* *Enterococcus durans* *Enterococcus hirae*	Grupo III
170***	*Enterococcus columbae* *Enterococcus reffinosus* *Enterococcus avium*	Grupo IV Grupo I Grupo I
140****	*Enterococcus saccharolyticus* *Enterococcus pseudoavium* *Enterococcus maldoratus*	Grupo I
135	*Vagococcus fluvialis*	Grupo V
040	*Enterococcus cecorum*	Grupo IV
001	*Lactococcus sulfureus*	Grupo IV

5.7 Testes de sensibilidade a antimicrobianos

5.7.1 Método de disco-difusão

O perfil de sensibilidade antimicrobiana foi realizado utilizando-se o método de difusão em disco *Kirby-Bauer* (CLSI, 2012). Para o preparo dos inóculos, as colônias VRE foram transferidas para tubos de ensaio de 5mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion) e incubadas a 37°C por um período de 24 horas para apresentar uma turbidez equivalente a 0,5 da escala MacFarland (1×10^6 UFC/mL). Uma vez ajustada a densidade do inóculo, foi realizada a semeadura em placa com auxílio de suabes estéreis sobre a superfície do meio de Agar Mueller Hinton II (BD, Le Pont de Claix, França). Posteriormente, realizou-se a distribuição dos discos estéreis com ajuda de uma

pinça flambada e resfriada, colocando-os sobre a superfície do meio inoculado e exercendo uma leve pressão para uma boa adesão. Foram testados os seguintes agentes antimicrobianos entre os recomendados pelo CLSI, (2007): vancomicina (30µg), teicoplanina (30µg), ampicilina (10µg), tetraciclina (30µg), ciprofloxacina (5µg), penicilina (10µg), eritromicina (15µg), cloranfenicol (30µg), gentamicina (10µg), estreptomicina (10µg) (Laborclin, Brasil) (Figura 6).

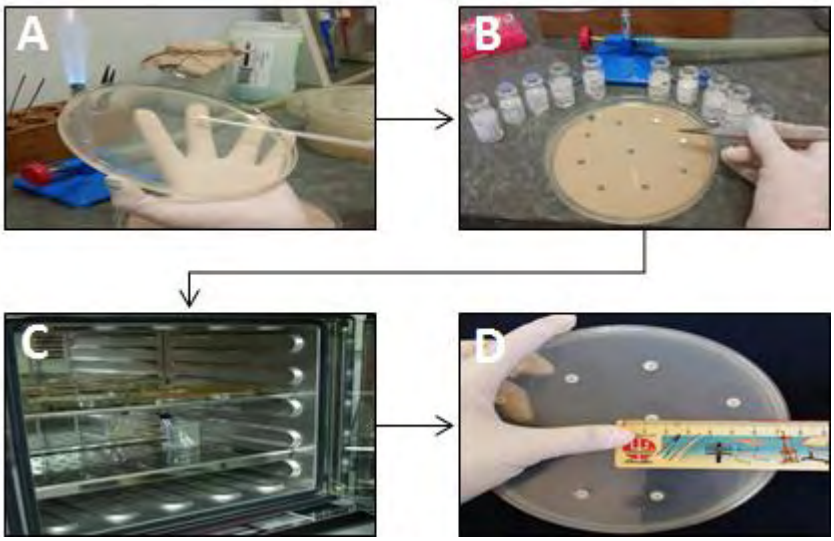

Figura 6. Fluxograma da metodologia do teste de sensibilidade antimicrobiana. A-Semeadura em placa. B-Distribuição dos discos com pinça flambada e resfriada. C-Incubação por 24 horas em estufa de cultivo bacteriano. E-Mensuração de halos de inibição com régua padrão.

As placas foram incubadas em estufa por 24 horas a 37°C. Após o crescimento, realizou-se a medida dos halos formados ao redor dos discos utilizando uma régua comum e determinou-se o perfil de sensibilidade ou resistência antimicrobiana dos isolados de acordo com o *Antimicrobial Susceptibility Testing* (AST) estabelecido pelo CLSI. A categorização das amostras em sensíveis, intermediária ou resistente foi realizada segundo os critérios estabelecidos pelo CLSI, (2012) (Tabela 4).

Tabela 4. Padrão de interpretação dos diâmetros das zonas de inibição do crescimento bacteriano para *Enterococcus* spp.

Agente	Código	Concentração do disco	Halos de inibição (mm)		
			R[b]	I[c]	S[d]
Vancomicina	VAN	30µg	≤14	15-16	≥17
Teicoplanina	TEC	30µg	≤10	11-13	≥14
Ampicilina	AMP	10µg	≤16	-	≥17
Tetraciclina	TET	30µg	≤14	15-18	≥19
Ciprofloxacina	CIP	5µg	≤15	16-20	≥21
Penicilina	PEN	10µg	≤14	-	≥15
Eritromicina	ERI	15µg	≤13	14-22	≥23
Cloranfenicol	CLO	30µg	≤12	13-17	≥18
Gentamicina[a]	GEN	120µg	6	7-9	≥10
Estreptomicina[a]	EST	300µg	6	7-9	≥10

[a]Aminoglicosídeos resistentes a altos níveis, [b]Resistente, [c]Intermediário, [d]Sensível.

5.7.2 Minimal Inibitory Concentration - MIC para vancomicina e teicoplanina

A determinação da MIC para vancomicina e teicoplanina para 54 amostras VRE foi realizada utilizando-se o E-test® (Probac, Brasil), baseado numa combinação de conceitos de testes de diluição e difusão. O CLSI estabelece que a resistência para vancomicina ocorre quando há inibição do crescimento bacteriano em concentrações iguais ou maiores a 32 µg/mL e sensibilidade quando esta inibição ocorre em concentrações iguais ou menores a 4 µg/mL. Para teicoplanina, a bactéria é considerada sensível quando ocorre inibição do crescimento bacteriano em concentrações do antibiótico iguais ou menores a 8 µg/mL e resistente quando a inibição do crescimento bacteriano acontece em concentrações iguais ou maiores a 32 µg/mL.

As colônias VRE isoladas foram transferidas para tubos de ensaio de 5 mL de caldo BHI-*Brain Heart Infusion* (Himedia, Mumbai, India) e incubadas a 37°C por um período de 24 horas. A turbidez do cultivo foi ajustada com caldo BHI (Himedia, Mumbai, India) pelo método de espectrofotometria até obter uma turbidez óptica comparável à da solução padrão equivalente a 0,5 da escala MacFarland (1×10^6 UFC/mL). Em seguida, foi realizada a semeadura em placa com auxílio de suabes estéreis sobre a superfície do meio de Ágar Mueller Hinton. Aguardou-se a secagem por aproximadamente 10-15 minutos para que o excesso de umidade fosse absorvido e, posteriormente, realizou-se a distribuição das fitas plásticas finas E-test, com o auxílio de uma

pinça flambada e resfriada sobre a superfície do meio. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. A metodologia é representada na figura 7.

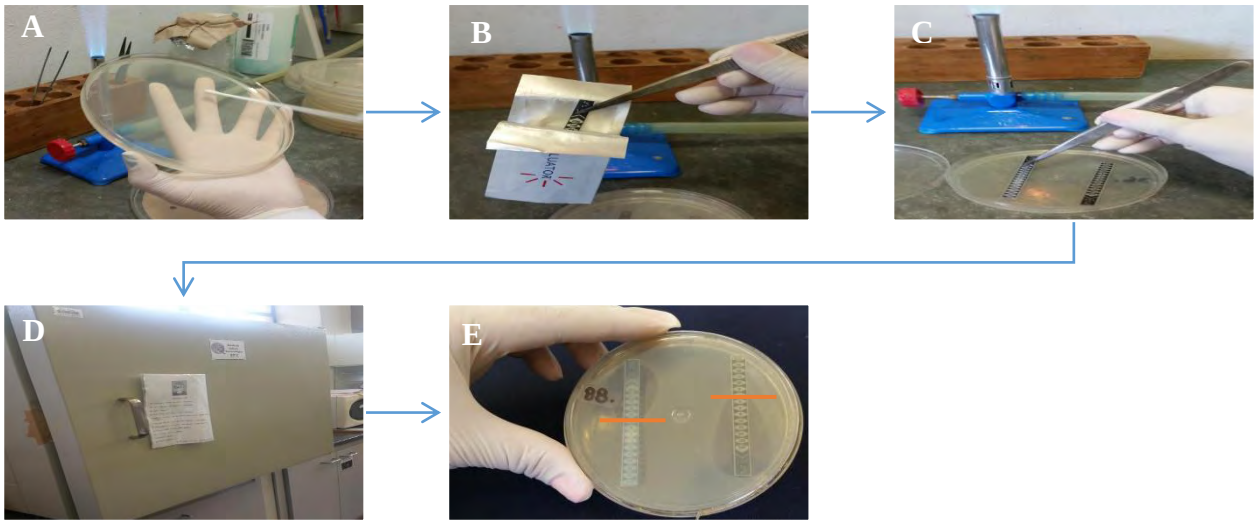

Figura 7. Fluxograma da metodologia do E-Test para determinação MIC para vancomicina e teicoplanina das colônias VRE isoladas dos setores produtivos de ovinos e caprinos. A. Semeadura sobre a superfície do Ágar Mueller Hinton com o auxílio de suabe estéril. B. Distribuição das fitas plásticas do E-test sobre a superfície do ágar. C. Incubação a 37°C por 24 horas. D. Leitura do halo de inibição considerando o MIC no ponto de intersecção entre o halo de inibição e a fita de E-test.

A leitura da atividade do antimicrobiano avaliada pelo diâmetro do halo de inibição foi realizada considerando o valor do MIC no ponto de intersecção entre o halo de inibição e a fita de E-test e sua interpretação foi realizada com base nos "breakpoints" estabelecidos pelo CLSI, (2007), relacionados na Tabela 5.

Tabela 5. Padrão de interpretação do "breakpoint" para interpretação do MIC do crescimento bacteriano para *Enterococcus* spp.

Agente antimicrobiano	**Código**	**Critério de interpretação MIC (µg/mm)**		
		R[a]	I[b]	S[c]
Vancomicina	VAN	≥32	8-16	≤4
Teicoplanina	TEC	≥32	16	≤8

[a]Resistente, [b]Intermediário, [c]Sensível.

5.8 Diagnóstico molecular

As amostras com nível de resistência à vancomicina e previamente identificadas como *Enterococcus* spp. foram submetidas a testes moleculares para confirmação das espécies e dos genótipos de resistência.

5.8.1 Extração de DNA

A extração do DNA bacteriano foi realizada selecionando-se 3 colônias VRE por amostra confirmadas no gênero *Enterococcus* spp. Cada colônia foi transferida para 1 mL de caldo BHI (Himedia, Mumbai, India) e foi submetida a incubação a 37ºC sob constante agitação por 12 horas. A cultura foi centrifugada por 10 minutos à 12000 × *g*. O sedimento foi ressupenso em 100 µL de água MilliQ para ser incubado no banho seco a 95ºC por 10 minutos e posteriormente centrifugado por 5 minutos a 12000 × *g*, sendo o sobrenadante contendo o DNA coletado, quantificado e congelado a -80°C até ser utilizado nas reações de PCR.

5.8.2 Determinação das concentrações de DNA

Leituras das concentrações de DNA extraído, em ng/mL, foram realizadas em espectrofotômetro (DS-11, DeNovix, EUA), segundo a razão de absorbância $A_{260/230}$ e $A_{260/A280}$.

5.8.3 Multiplex PCR

Todas as amostras de DNA extraídas das cepas identificadas como VRE foram testadas com primers específicos por multiplex-PCR para os genes marcadores de espécie *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum*, e *E. casseliflavus* (LAYTON et al., 2010) e de resistência (vanA, vanB, vanC1 e VanC2-VanC3) (DUTKA-MALEN; EVERS; COURVALIN, 1995). A Tabela 6 mostra as sequências dos primers para a amplificação dos fragmentos relativos aos genes marcadores de espécie e de resistência, bem como o tamanho dos produtos de amplificação obtidos. A reação foi realizada num termociclador (modelo Swift™ MaxPro, Esco Technologies Inc., EUA) num volume final de 25 µL, contendo 250ng de DNA, 1X do kit GoTaq® Green Master Mix (Promega Corporation, EUA) e 5 pmol de cada primer. O protocolo de termociclagem empregado foi: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos e, em seguida, 30 ciclos de amplificação consistindo de desnaturação de 94°C por 1 minuto, anelamento de 54°C por 1 minuto e extensão de 72°C por 1

minuto, sendo a extensão final dada a 72°C por 10 minutos (DUTKA-MALEN; EVERS; COURVALIN, 1995). Durante a realização do estudo foram utilizadas como controle as seguintes amostras padrão: *Enterococcus faecium* ATCC 700221 e *Enterococcus faecalis* ATCC 00652, adquiridas da Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil.

Tabela 6. Sequência de oligonucleotídeos utilizados para a amplificação de fragmentos relativos aos genes marcadores de espécie e de resistência para *Enterococcus* spp.

Gene ou espécie alvo	Sequência (5'-3')	Produto (pb)
van A	+GGGAAAACGACAATTGC -GTACAATGCGGCCGTTA	732
van B	+ATGGGAAGCCGATAGTC -GATTTCGTTCCTCGACC	635
vanC1	+GGTATCAAGGAAACCTC -CTTCCGCCATCATAGCT	822
vanC2/C3	+CTCCTACGATTCTCTTG -CGAGCAAGACCTTTAAG	439
$\boldsymbol{ddl_{E.\ faecalis}}$	+GCCACTATTTCTCGGACAGC -GCTGTCCCTTTGGCAAATAA	518
$\boldsymbol{ddl_{E.\ faecium}}$	+GAAAAAACAATAGAAGAATTAT -TGCTTTTTTGAATTCTTCTTTA	215
E. casseliflavus	+ACAGTTGAAGAATTATTAGCAGACTTTT -GCTAGTTTACCGTCTTTAACG	269
E. gallinarum	+TTACTTGCTGATTTTGATTCG -TGAATTCTTCTTTGAAATCAG	190

5.8.4 Eletroforese em gel

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% (p/v), imerso em tampão Tris-Acetato/EDTA (TAE 1X), em cuba horizontal, num volume de 8 μL por amostra, adicionado de um volume de 2 μL de Blue/Orange Loading Dye (PROMEGA, EUA). Na sequência, o gel foi submetido a coloração em solução de SYBR® Gold nucleic acid gel stain (Life Technologies, EUA) por 20 minutos e, posteriormente foi observado à luz UV, utilizando-se o sistema de fotodocumentação L-Pix ST e programa L-PixImage (Loccus Biotecnologia, Brasil). O tamanho dos amplicons foi determinado pela comparação do padrão de migração eletroforética com o uso de um marcador de peso molecular de 100pb (100bp DNA Ladder, PROMEGA, EUA).

5.9 Aspectos éticos

A presente investigação foi realizada de acordo com o Protocolo CEUA nº 6857170915, emitido pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (Anexo 1).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Identificação fenotípica e bioquímica de cepas *Enterococcus* spp.

No presente estudo foram avaliadas 132 amostras fecais e ambientais provenientes de 6 granjas produtoras de ovinos e caprinos das regiões centro-leste e nordeste do estado de São Paulo com o objetivo principal de identificar espécies de enterococos resistentes à vancomicina. Nesse contexto, foram isoladas colônias com morfologia e coloração característica de *Enteroccocus* spp. em 59 das 84 amostras animais e 15 das 48 amostras ambientais, valores que representam 70,2% e 31,2% do total da amostragem. As maiores contagens de *Enterococcus* foram de $2,6 \times 10^5$ e $1,70 \times 10^5$ unidades formadoras de colônias (UFC/g) obtidas do ambiente e dos animais, respectivamente. Foram selecionadas 3 colônias de *Enteroccocus* spp. para serem subcultivadas em meio Ágar Bile Esculina (Difco®, BD, EUA) acrescido de 6 μg/mL de vancomicina, no qual houve crescimento de colônias VRE em 33 das 84 amostras de ovinos e em 21 das 48 amostras ambientais, representando 46,7% e 29,3%, respectivamente, das amostras analisadas.

As bactérias do gênero *Enterococcus* foram consideradas por muitos anos espécies inofensivas e sem importância clínica para os humanos; no entanto, recentemente tem-se tornado uns dos patógenos hospitalares mais comuns, provocando taxas de mortalidade de até 61% (PRAHARAJ; SUJATHA; PARIJA, 2013). Atualmente, o gênero é formado por 36 espécies e faz parte da microbiota normal do trato gastrointestinal da maioria dos mamíferos e aves (LÓPEZ; TENORIO; TORRES, 2013). Nos ovinos e caprinos, até o presente momento, ainda não foram descritos estudos voltados à determinação da presença de bactérias deste gênero; no entanto, a frequência das diferentes espécies entre os indivíduos de outras populações animais, em estudos desenvolvidos na Europa assim como sua quantidade na microbiota são muito variáveis, sendo frequência e quantidade utilizadas como critérios de comparação (OBENG et al., 2013).

Alguns estudos descrevem *E. faecalis* como a mais frequente das espécies de enterococos em suínos, aves comerciais e em humanos (KIM et al., 2010). Quanto às proporções das espécies de *Enterococcus* spp recuperadas de culturas, tanto de origem clínica como de vigilância epidemiológica, *E. faecalis* e *E. faecium* são as mais amplamente estudadas devido ao potencial de causar infecções graves em seres humanos, além da capacidade para disseminar genes codificadores de mecanismos de resistência a antimicrobianos (MANGALAPPALLI-ILLATHU

et al., 2010). Em tempo, Chavers et al. (2003) descrevem que 90% dos isolados deste gênero são representadas por *E. faecalis*; no entanto, a proporção de *E. faecium* tem crescido simultaneamente à redução da prevalência de *E. faecalis* nos EUA, Canadá, América Latina, Europa e Ásia com o aparecimento da resistência antimicrobiana nesses isolados.

A partir do propósito inicial de se identificar ao nível de espécie os enterococos isolados, observou-se o isolamento, em maior frequência, de *E. faecalis*, sendo identificadas 23 cepas desta espécie, dentre as 54 colônias isoladas nos meios indicadores e seletivos, seguidas por 19 cepas identificadas como *Vagococcus fluvialis*, representando de 43% e 35%, respectivamente, sobre o total de isolados. Em menor proporção, foram identificadas 6 cepas das espécies *E. dispar*, *E. durans* e *E. hirae.* Adicionalmente, 2 cepas das espécies *E. columbae, E. raffinosus* e *E. avium* e uma cepa *E. casseliflavus* também foram identificadas. As 2 colônias restantes previamente identificadas como *Enterococcus* pelos meios diferenciadores, não foram identificadas como pertencentes ao gênero pelo método de teste bioquímico. A partir destas considerações, observa-se que foi possível e esperado frente aos resultados obtidos pelo teste bioquímico avaliar a frequência de outras espécies deste gênero (Tabela 7). Resultados similares foram obtidos por Silva et al. (2006), na avaliação da presença de cepas de *Enterococcus* spp. isoladas de amostras de urina e secreção de ferida em hospital do Chile, os quais detectaram em 249 cepas de *Enterococcus* a presença de 5 espécies sendo *E. faecalis* a mais frequentemente isolada (85,1%), seguida de *E. faecium* (9,6%), *E. durans* (3,2%), *E. avium* (1,2%) e *E. raffinosus* (0,8%).

Tabela 7. Espécies de *Enterococcus* identificadas pelo teste bioquímico convencional.

Espécies identificadas	**No. de colônias**	**Bile**	**PYR**	**Mot**	**PIGMENTO AMARELO**	**ARG**	**Produção de ácido a partir de:**		
							MANL	ARAB	SBTL
E. casseliflavus	1	+	+	+	+	+	+	+	V
E. faecalis	23	+	+	-	-	+	+	-	+
Vagococcus fluvialis	19	+	+	+	-	V+	+	+	+
E. dispar E. durans e E. hirae	6	+	+	-	-	+	-	-	-
E. columbae, E. raffinosus e E. avium	3	+	-	-	-	-	+	+	+
Inconclusiva	2								

Bile = bile esculina, PYR = hidrólise enzimática da L-pyrrolidonyl-beta-naphtylamide, Mot = motilidade, Arg = Arginina, MANL = Manitol, ARAB = Arabinose, SBTL = Sorbitol

6.2 Avaliação de sensibilidade aos antimicrobianos

A leitura dos halos de inibição para determinação de resistência e/ou sensibilidade aos 10 antimicrobianos testados contra as 54 colônias resistentes à vancomicina pela técnica de disco difusão foram determinadas conforme representado na figura 5. As 54 cepas caracterizadas como VRE foram submetidas à determinação da sensibilidade frente a 10 antimicrobianos indicados para uso em casos de infecções humanas pelo CLSI (CLSI, 2007). Os maiores percentuais de resistência observados foram contra tetraciclina (24,1%), penicilina (22,2%) e cloranfenicol (7,4%); para vancomicina, teicoplanina e eritromicina o percentual foi de 3,7% e para ampicilina e ciprofloxacina o mesmo foi de 5,6%, enquanto que não se verificou resistência para gentamicina e estreptomicina e uma porcentagem de 5,6% e 62,9% não apresentou nenhum perfil de susceptibilidade respetivamente, provavelmente pelo fato de que os discos utilizados para esses dois antibióticos continham concentrações menores do que as usualmente empregadas. A tabela 8 exibe os resultados obtidos para os testes de sensibilidade.

Tabela 8. Perfil de susceptibilidade das 54 amostras VRE aos antimicrobianos de acordo com o método de disco-difusão.

Agente Antimicrobiano	**Perfil de susceptibilidade**					
	Resistente		**Intermediário**		**Sensível**	
	No.	%	No.	%	No.	%
Vancomicina	2	3,7	2	3,7	50	92,6
Teicoplanina	2	3,7	0	0,0	52	96,3
Ampicilina	3	5,6	NA	NA	51	94,4
Tetraciclina	13	24,1	0	0,0	41	75,9
Ciprofloxacino	3	5,6	2	3,7	49	90,7
Penicilina	12	22,2	NA	NA	42	77,8
Eritromicina	2	3,7	11	20,4	41	75,9
Cloranfenicol	4	7,4	1	1,9	49	90,7
Gentamicina[a]	0	0,0	0	0,0	51	94,4
Estreptomicina[a]	0	0,0	3	5,6	17	31,5

[a]Aminoglicosídeos resistentes a altos níveis, [b]Resistente, [c]Intermediário, [d]Sensível.

A ausência de resistência encontrada em isolados dos setores produtivos de ovinos e caprinos contra aminoglicosídeos (gentamicina) no presente estudo também foi verificada em estudo realizado por Ateba; Lekoma; Kawadza (2013) sobre *Enterococcus*, embora enfocando isolados de 22 amostras de água subterrânea, sendo que em duas localidades investigadas a porcentagem de resistência contra aminoglicosídeos também foi nula. Por outro lado, esses valores ficaram distantes dos encontrados por Silva et al. (2006) que investigaram os *Enterococcus* em isolados clínicos de cinco hospitais do norte de Chile, revelando alta susceptibilidade aos antibióticos beta-lactâmicos, moderada resistência a tetraciclina, ciprofloxacina e eritromicina, alta resistência ao cloranfenicol e ausência de resistência à vancomicina. Aproximadamente, 12% das cepas de *Enterococcus* spp apresentaram alto nível de resistência a gentamicina.

É importante ressaltar que, em linhas gerais, os percentuais de resistência de enterococos a antimicrobianos são variáveis entre os estudos já realizados. Nesse sentido, a resistência contra a tetraciclina (24,1%) encontrada no presente estudo representou metade do percentual encontrado no estudo realizado por Menezes et al. (2005), onde 48% dos isolados de enterococos em infecções urinárias em humanos foram resistentes a essa droga. Autores como Bender et al. (2009) encontraram que a maioria dos isolados para esse grupo foram altamente suscetíveis a vários antibióticos (ampicilina, vancomicina, teicoplanina e nitrofurantoina), mas apenas cinco (2,5%) foram enterococos resistentes à ampicilina e somente um (0,5%) foi resistente à vancomicina. Resultados similares foram obtidos num estudo realizado na Finlândia por Suppola et al. (1996), no qual detectaram a prevalência de *E faecium* resistentes a ampicilina em 41% das amostras, embora a resistência a gentamicina foi de 4% e à vancomicina, de 2%.

Em relação à multirresistência de cepas VRE em isolados de diferentes fontes, por exemplo, Gousia et al. (2015) avaliaram os perfis de resistência a cinco antibióticos em cepas VRE isoladas a partir de 500 amostras de cortes comerciais de carne de porco e de frango e 100 amostras de ovo, nos quais identificaram a resistência à ampicilina em 66% das amostras, à ciprofloxacina em 52,5%, à eritromicina em 51,8%, à penicilina em 41,8% e à tetraciclina em 36,9% das amostras analisadas, enquanto que 53,2% dos isolados apresentaram multirresistência e 15,6% foram sensíveis a todos os antibióticos. Resultados similares obtidos no nosso trabalho, no qual, das 54 amostras VRE isoladas das amostras fecais dos setores produtivos de ovinos e caprinos, foram determinadas 14 amostras sensíveis a todos os antibióticos testados, indicando uma porcentagem

de 26% de multirresistência. Autores como Hollenbeck e Rice (2012) indicam que isto pode ser ocasionado pelos mecanismos de resistência intrínsecos aos antibióticos em enterococos ou pela resistência adquirida através de mutação dos genes intrínsecos assim como da troca horizontal de material genético de determinantes de resistência.

Até o momento, vários estudos sobre resistência antimicrobiana em enterococos isolados a partir de seres humanos e animais foram publicados (JAMES et al., 2012); no entanto, investigações abordando a resistência de enterococos isolados de ovinos e caprinos ainda não foram descritos na literatura. A ocorrência de resistência em isolados deste setor produtivo pode ser explicado por algumas hipóteses como: uso de água contaminada com enterococos para o consumo dos animais; utilização de promotores de crescimento como avoparcina, que tem sido associada em muitos estudos à resistência contra a vancomicina (LOWDEN; MILLER; YAHDI, 2014); por outro lado, dependendo da prática da criação dos animais, contaminações oriundas de profissionais que estão diretamente em contato com os animais, ou mesmo através de vestimentas e calçados destes (fômites), ou ainda através de contaminação cruzada, a partir de fezes de aves, bovinos e suínos, criados em instalações próximas ou nas mesmas instalações (HART; HEUZENROEDER; BARTON, 2004).

Em nosso estudo, cepas distintas de *E. faecalis* e *E. faecium* também foram detectadas: das 19 cepas identificadas pelo teste bioquímico como *Vagococcus fluvialis*, 26% apresentaram resistência a tetraciclina. O resultado obtido, nesse sentido indica a necessidade do desenvolvimento de pesquisas que avaliem a presença de resistência em outras espécies bacterianas associadas ao grupo enterococos (família *Enterococcaceae*) que podem ser isoladas em criações animais, com potenciais riscos de disseminação. Outrossim, alternativas terapêuticas para o tratamento de infecções com VRE estão restritas aos antibióticos recentemente introduzido na prática clínica: como quinupristina/dalfopristina, linezolida, a tigeciclina, daptomicina (WERNER et al., 2008). Sendo os enterococos os mais importantes patógenos hospitalares, os isolados de *E. faecalis* e *E. faecium* são os mais frequentemente encontradas na literatura por serem reconhecidos como o terceiro e quarto patógenos nosocomiais mais prevalentes no mundo todo. Com resistência adquirida mais relevante à penicilina/ampicilina, aminoglicosídeos (resistência de alto nível) e glicopeptídeos em um número cada vez maior de isolados, o espectro terapêutico das infecções por esses isolados torna-se cada vez mais limitado (WERNER et al., 2008).

Cinquenta e três das 54 cepas VRE foram avaliadas quanto ao perfil de resistência aos antimicrobianos, vancomicina e teicoplanina de uso em medicina veterinária e saúde humana através da determinação de MIC empregando fitas E-test (Figura 7). O isolado não testado foi excluído devido à contaminação do mesmo. Os valores de MIC identificados para os antimicrobianos testados e as concentrações capazes de inibir o crescimento de 90% das cepas são apresentados na Tabela 9. Não foram identificadas cepas resistentes à vancomicina e teicoplanina previamente isolados por métodos diferenciais VRE pelo método de E-test, considerando-se os pontos de corte propostos pelo CLSI (CLSI, 2007): cepas são consideradas sensíveis à vancomicina e teicoplanina com MIC $\leq$ 4 μg/mL e MIC $\leq$ 8 μg/mL respectivamente, e resistentes quando apresentam MIC $\geq$ 32 μg/mL; sendo estas concentrações utilizadas para analises laboratorial segundo as especificações do CLSI.

Tabela 9. Resultados obtidos a partir da determinação da concentração inibitória mínima de vancomicina e teicoplanina frente a 53 colônias de VRE isoladas de amostras de ovinos e caprinos.

Agente Antimicrobiano	**Critério de interpretação MIC (μg/ mm)**					
	Resistente		**Intermediário**		**Sensível**	
	No.	%	No.	%	No.	%
Vancomicina	0	0,0	17	32,1	36	67,9
Teicoplanina	0	0,0	0	0,0	53	100,0

A vancomicina é o principal membro da classe de antibióticos glicopeptídeos clinicamente importantes, desenvolvida nos anos 50, como agente antimicrobiano frente a bactérias Gram-positivas e, em especial, contra estafilococos produtores de β-lactamase (MANFREDI; SABBATANI, 2009). O desenvolvimento de novos antibióticos com menos efeitos indesejáveis limitou seu uso em casos de alergia aos β-lactâmicos. Com o surgimento, nos anos 80, dos *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) e o aumento no número de pacientes susceptíveis a infecções por organismos gram-positivos, houve um recrudescimento do uso de vancomicina que tornou-se, durante os últimos 30 anos, medicamento de escolha para tratamento de infecções bacterianas hospitalares, com menor desenvolvimento de reações alérgicas, toxicidades ótica e renal (PATEL, 2003).

O surgimento de resistência à vancomicina demorou mais para ocorrer quando comparada à maioria dos antimicrobianos utilizados. Desde a década de 1990 até a atualidade, o surgimento de resistência à vancomicina foi produzida numa proporção significativa e o desenvolvimento de cepas com susceptibilidade diminuída a este antimicrobiano representa um problema clínico significativo com poucas opções terapêuticas (GONZÁLEZ; MARIBEL; ARMINDO, 2010). Coincidindo com esta circunstância, surgem em 1986 as primeiras cepas de VRE, atualmente distribuídas no mundo todo, porém, desenvolvendo um sério problema para o tratamento de infecções enterocócicas. Após o surgimento da resistência em *Enterococcus*, o panorama para o ano de 2002 foi mais preocupante ainda, quando no tratamento de infecções por bactérias gram-positivas documentou-se o primeiro caso de resistência de alto nível à vancomicina em *S. aureus* (VRSA) por transferência genética horizontal, a partir de *E. faecalis*, em um paciente de Michigan, EUA (HOWDEN et al., 2010). O número destes relatos vem crescendo na atualidade e um amplo número de pacientes infectados por VRSA foi encontrado em pacientes co-infectados com o VRE, indicando que transferência horizontal de genes como o método mais provável para a aquisição de resistência à vancomicina.

Embora não tenha sido encontrada, na literatura consultada, relatos de resistência à vancomicina em cepas de origem ovina e caprina no Brasil, conforme anteriormente comentado, investigações no país relacionadas a espécies de *Enterococcus* resistentes, obtidas de diferentes origens, têm sido desenvolvidas. Nesse sentido, Almeida et al. (2014) identificaram a partir de cinco *E. faecalis* e uma cepa de *E. faecium* resistentes à vancomicina, isolados de sangue e urina de diferentes pacientes internados em um hospital brasileiro, MIC > 256 mg/mL, exibindo altos níveis de resistência à vancomicina. Marguet; Vallejo, Olivera (2008) avaliaram a resistência potencial à vancomicina em cepas de *E. faecalis* e *E. faecium*¸ isoladas de queijos produzidos com leite de ovinos, encontrando valores de MIC ≥ 0,25 μg/mL em 7 das 10 cepas identificadas (70%) com uma alta sensibilidade à vancomicina.

6.3 Confirmação das cepas bacterianas identificadas como *Enteroccocus* Vancomicina Resistentes por PCR

Em nosso estudo, os 54 isolados bacterianos caracterizados bioquimicamente foram testados para confirmação de espécie pertencentes ao gênero *Enteroccocus* através da técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR), ilustrada na foto do gel de agarose da Figura 8, obtida

sob transluminação UV, com evidência visual de produtos gênicos característicos das espécies de *Enterococcus*. Os resultados consoante a identificação por PCR estão distribuídos da seguinte forma: 19 cepas de *E. faecalis* (518 pb), 15 cepas de *E. casseliflavus* (269 pb) e 1 cepa de *E. faecium* (550pb); outras 15 cepas apresentaram produtos inespecíficos, provavelmente pertencentes a outras espécies de enterococos ou ainda a outros grupos bacterianos, para os quais não foram utilizados primers específicos; adicionalmente, 4 isolados não apresentaram produto algum de amplificação, provavelmente devido às condições retromencionadas. As porcentagens encontradas estão representadas na figura 9. Enterococos são microrganismos importantes não só por serem uma das principais causas de infecções hospitalares, mas também porque apresentam papel significativo na disseminação da resistência antimicrobiana (RUBINSTEIN; KEYNAN, 2013). A correta identificação é necessária a fim de se controlar as espécies causais de doenças e que podem limitar um tratamento efetivo.

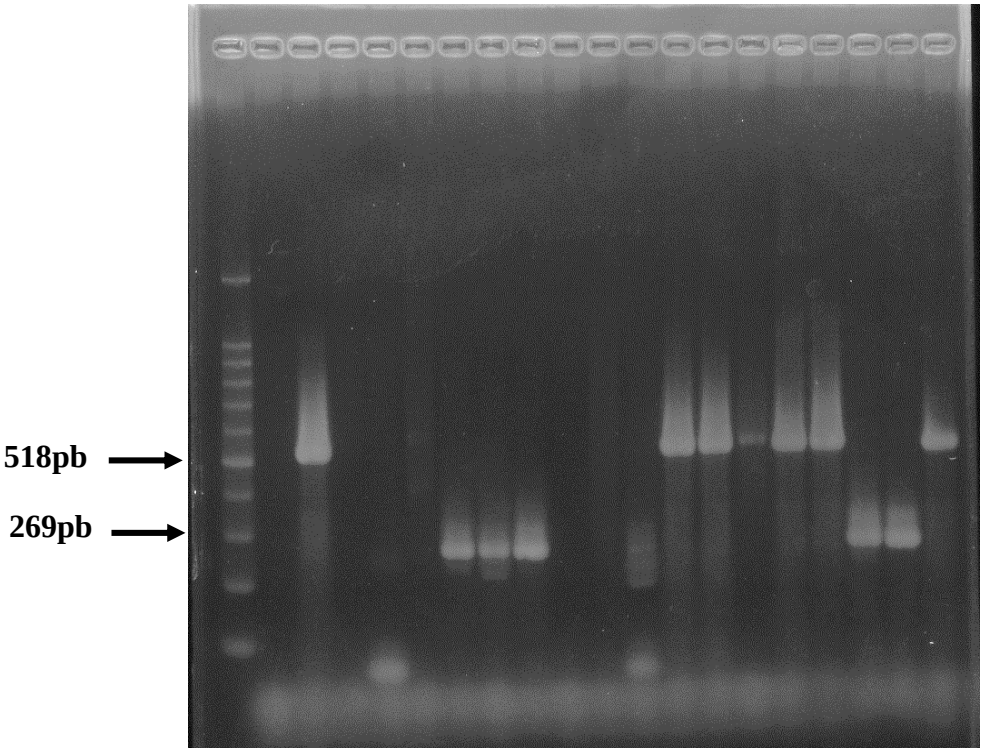

Figura 8. Fotografia de gel de agarose corado com SYBR® Gold, sob luz UV, ilustrando resultados de amplificação de fragmentos relativo aos marcadores para *E. faecalis* (518pb) e *E. casseliflavus* (269 pb), obtidos através da técnica de PCR, a partir do DNA extraído de amostras fecais de ovinos e caprinos. Coluna (1) Marcador de peso molecular de 100pb. (2) Controle negativo. Canaletas 3, 13-17 e 20: cepas de *E.*

faecalis isoladas de amostras fecais de ovinos e caprinos. Canaletas 7-9, 18 e19: cepas de *E. casseliflavus* isoladas de amostra fecais de ovinos e caprinos.

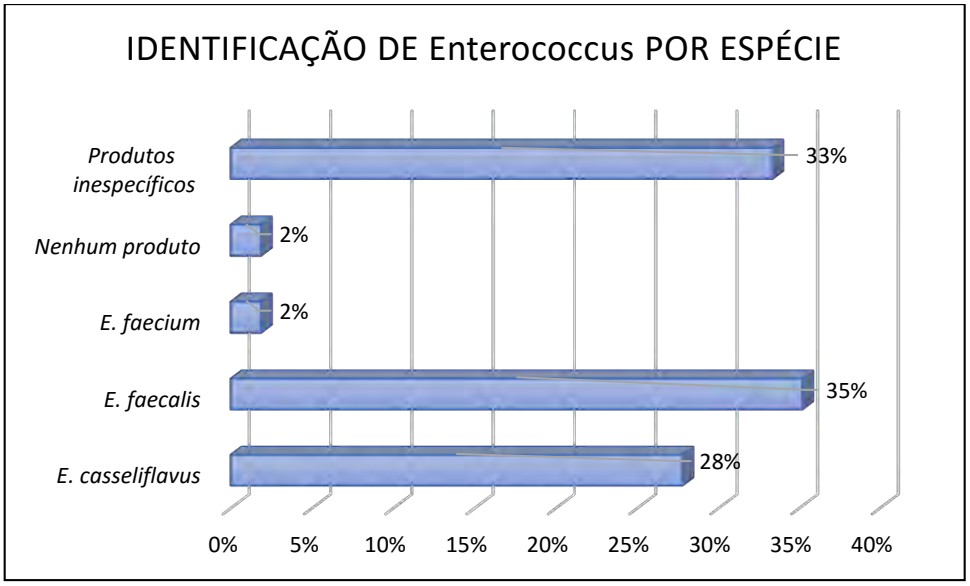

Figura 9. Número de colônias identificadas por espécie de *Enterococcus* por meio de PCR nos 54 isolados VRE de amostras fecais dos setores de ovinos e caprinos.

Atualmente, o método padrão para identificação de enterococos é a caracterização fenotípica, principalmente usando testes bioquímicos que podem, por sua vez, exigir uma quantidade significativa de tempo para a preparação e interpretação dos resultados (PRAHARAJ; SUJATHA; PARIJA, 2013). Métodos automatizados de diagnóstico são capazes de identificar a maioria das espécies de enterococos, constituindo uma boa alternativa para aqueles laboratórios com um alto volume de amostras podendo-se reduzir custos (PALAVECINO, 2001). Kits de identificação comerciais, tais como API rapid ID 32 Strep, BBL Crystal identification gram-positive ID e Vitek gram-positive, estão disponíveis para a identificação de enterococos ao nível de espécie (GARCIA-GARROTE; CERCENADO; BOUZA, 2000). Estes métodos têm sido desenvolvidos para permitir uma rápida identificação de enterococos com base em painéis de compostos bioquímicos. Apesar destes kits serem eficazes em termos de custos e resultados, os quais podem ser obtidos em menos de 24 h, existem preocupações sobre a confiabilidade dos mesmos (DEASY et al., 2000). As possíveis razões para estas observações incluem espécies

atípicas que não se conformam com os painéis de testes bioquímicos ou espécies que ainda não tenham sido catalogadas nos bancos de dados dos fornecedores desses kits.

Talvez, uma grande dificuldade associada com a identificação de espécies bacterianas baseada em características fenotípicas, está no fato de ocorrer divergência ou convergência. Divergência ocorre para linhagens de algumas espécies, geneticamente similares, mas com características fenotípicas diferentes. Convergência ocorre para linhagens de diferentes espécies, geneticamente diferentes, mas que se comportam fenotipicamente de forma similar (FRANCO et al. 2012). Em ambas situações, os diagnósticos por testes fenotípicos resultam em identificação errônea, mas esse tipo de identificação dos enterococos até nível de espécie é frequentemente útil e, algumas vezes, crucial para o tratamento apropriado do paciente e para fins epidemiológicos e de controle de infecção (ATEBA; LEKOMA; KAWADZA, 2013).

Por outro lado, a identificação dos perfis moleculares permite o esclarecimento de surtos hospitalares envolvendo germes com perfis de sensibilidade epidemiologicamente importantes. As primeiras técnicas desenvolvidas para tipagem do enterococo foram a análise dos fragmentos de DNA plasmidial resultantes de sua digestão total ou parcial realizada por enzimas de restrição como endonucleases (enzimas que clivam o DNA em sequências específicas) (PRAHARAJ; SUJATHA; PARIJA, 2013). Porém, a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase, chamada de forma simplificada por PCR, tem sido muito aplicada para identificação de espécies bacterianas a partir de amostras clínicas diversas, por apresentar algumas vantagens como praticidade, rapidez, simplicidade, tempo ilimitado para análise, elevada especificidade e elevada sensibilidade similar (FRANCO et al. 2012). Além de investigações epidemiológicas, algumas das técnicas de tipagem molecular são agora utilizadas para rastrear a disseminação de enterococos em diferentes ambientes, relação filogenética, e a evolução de estirpes multirresistentes, ampliando significativamente a compreensão da epidemiologia dos enterococos, a estrutura da população, a resistência antimicrobiana e a virulência (RUBINSTEIN; KEYNAN, 2013).

No presente estudo, no entanto, a determinação quanto aos perfis genéticos de resistência dos isolados verificados através de PCR, registrados no gel de agarose (Figura 10) e as porcentagens de detecção para cada um dos genes associados a resistência indicaram um outro quadro: 43% para *van*C2/C3, 41% para *van*C1, 3,5% para *van*A e 3,5% para *van*B, sendo que para 5,3% dos isolados nenhum produto foi amplificado, sugerindo a possível ocorrência de genes dos demais grupos *van* conhecidos entre os isolados, e para 3,7%, produtos inespecíficos foram detectados, requerendo-se maiores estudos sobre possíveis variações entre os genes investigados (Figuras 11).

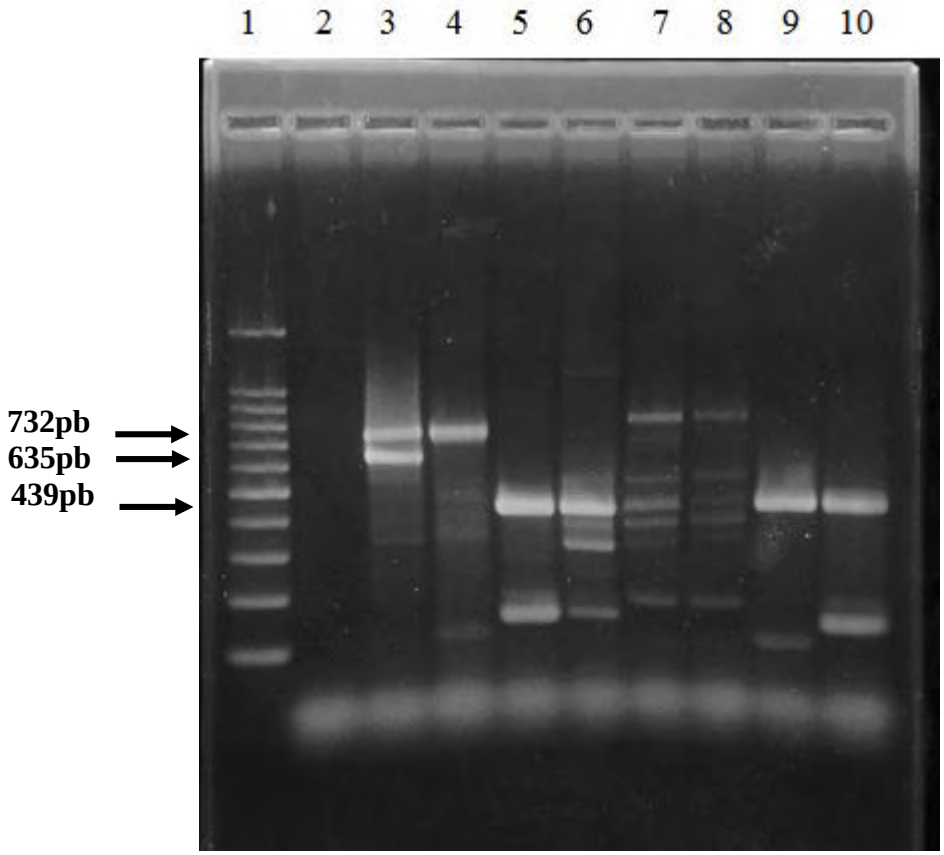

Figura 10. Fotografia de gel de agarose corado com SYBR® Gold, sob luz UV, ilustrando resultados de amplificação de fragmentos relativo aos genes de resistência (*van*A, 732pb; *van*B, 635pb; *van*C1, 822pb, e *van*C2-*van*C3, 439pb), obtidos através da técnica de PCR, a partir do DNA extraído de amostras fecais de ovinos e caprinos. (1) Marcador de peso molecular de 100pb. (2) Controle negativo. Canaleta 3: cepas com gene de resistência *van*B. Canaleta 4: cepas com gene de resistência *van*A. Canaletas 5, 6, 9 e 10: cepas com gene de resistência *van*C2-*van*C3. Canaletas 7 e 8: produtos inespecíficos.

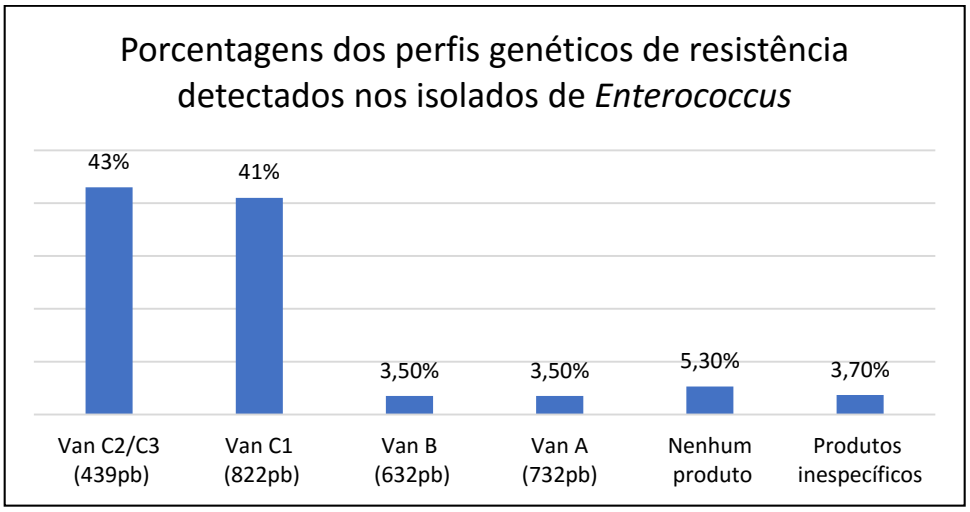

Figura 11. Porcentagem dos perfis genéticos de resistência detectados nos isolados de *Enterococcus* em amostras fecais dos setores de ovinos e caprinos.

Hoje em dia, seis tipos de resistência adquirida à vancomicina nos enterococos são conhecidas; no entanto, apenas VanA e em menor influência VanB são amplamente prevalentes (NAM et al., 2013). Segundo Werner et al., 2008 vários genes codificam a resistência adquirida à vancomicina e estes são tipicamente associados com elementos genéticos móveis que podem se espalhar lateralmente. O principal reservatório de resistência adquirida à vancomicina é *Enterococcus faecium*, enquanto que *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina ainda são raros.

Resultados similares foram encontrados por Obeng et al. (2013), os quais relatam a baixa frequência do gene *van*A entre isolados VRE de frangos na Austrália, indicando que o fenótipo VRE foi manifestado a partir da expressão de *van*C1, *van*C2 e provavelmente *van*C3, identificados com maior frequência nos isolados. Por outro lado, Ateba; Lekoma; Kawadza (2013) demostraram que em 22 amostras de água subterrânea, coletadas aleatoriamente de três comunidades rurais na Coréia do Sul, pela análise via PCR Multiplex, 17 (34%) de 50 isolados de VRE foram positivos para os genes *van*A e *van*B. Portanto, existe certa heterogeneidade na frequência de genes associados ao fenótipo VRE, considerando amostras de diferentes origens.

Na comparação dos resultados referentes às espécies de VRE identificadas entre o método de análise bioquímica convencional e a análise molecular por PCR, considerando-se os 54 isolados estudados, 43 isolados tiveram determinação bioquímica para espécie. Desses 43 isolados, 15

amostras foram detectadas como *E. faecalis*, de maneira concordante entre os métodos bioquímico e molecular para a determinação de espécie, representando 28% do total de isolados e 34,8% considerando os isolados identificados bioquimicamente. Nos demais 28 isolados, a identificação bioquímica determinada não correspondeu com a identificação molecular. Perfis discordantes similares foram encontrados por Franco et al. (2012), ao identificarem pelo esquema bioquímico clássico 100% das estirpes isoladas como *E. faecalis* coletados da cavidade bucal, enquanto que por PCR somente 83,3% o foram, sendo tais resultados estatisticamente diferentes para a identificação de *E. faecalis*. Em tempo, os procedimentos para identificação de espécies de *Enterococcus* têm representado um desafio na rotina microbiológica, pelo fato de que o número de espécies é muito grande dentro do gênero e de grupos relacionados (*Vagococcus*), com poucas variações fenotípicas, dificultando a interpretação dos testes bioquímicos laboratoriais (BENDER et al., 2009).

Do total de cepas identificadas bioquímica e molecularmente, 15 foram identificadas pelos dois métodos de maneira concordante como *Enterococcus faecalis*; em contraste, 2 amostras foram identificadas como *E. faecalis* pelo teste bioquímico convencional, porém não confirmadas pelo teste molecular; 10 amostras foram identificadas por teste bioquímico como *Vagococcus fluvialis*, enquanto que produtos inespecíficos foram obtidos ao PCR para esses isolados. Os três resultados mais observados pelo método de análise bioquímica foram respectivamente: *Enterococcus faecalis*, *Vagococcus fluvialis* e *Enterococcus hirae*. Adicionalmente, das 10 amostras identificadas como *Vagococcus fluvialis* no teste bioquímico, 9 foram confirmadas pelo método molecular como *E. casseliflavus*, indicando homologia relativamente grande para essas duas espécies na região de anelamento dos primers utilizados, sendo que a confirmação de *E. casseliflavus* foi dada por sequenciamento nucleotídico (Figura 12). Tais resultados corroboram investigações anteriores quanto à relativa discordância na determinação de espécies de enterococos entre métodos bioquímicos e moleculares (caprinos e ovinos), principalmente quando da utilização de amostras animais, em particular de pequenos ruminantes, cuja microbiota para enterococos difere daquela observada para amostras humanas que são objetos de estudos mais frequentes no âmbito das infecções enterocócicas.

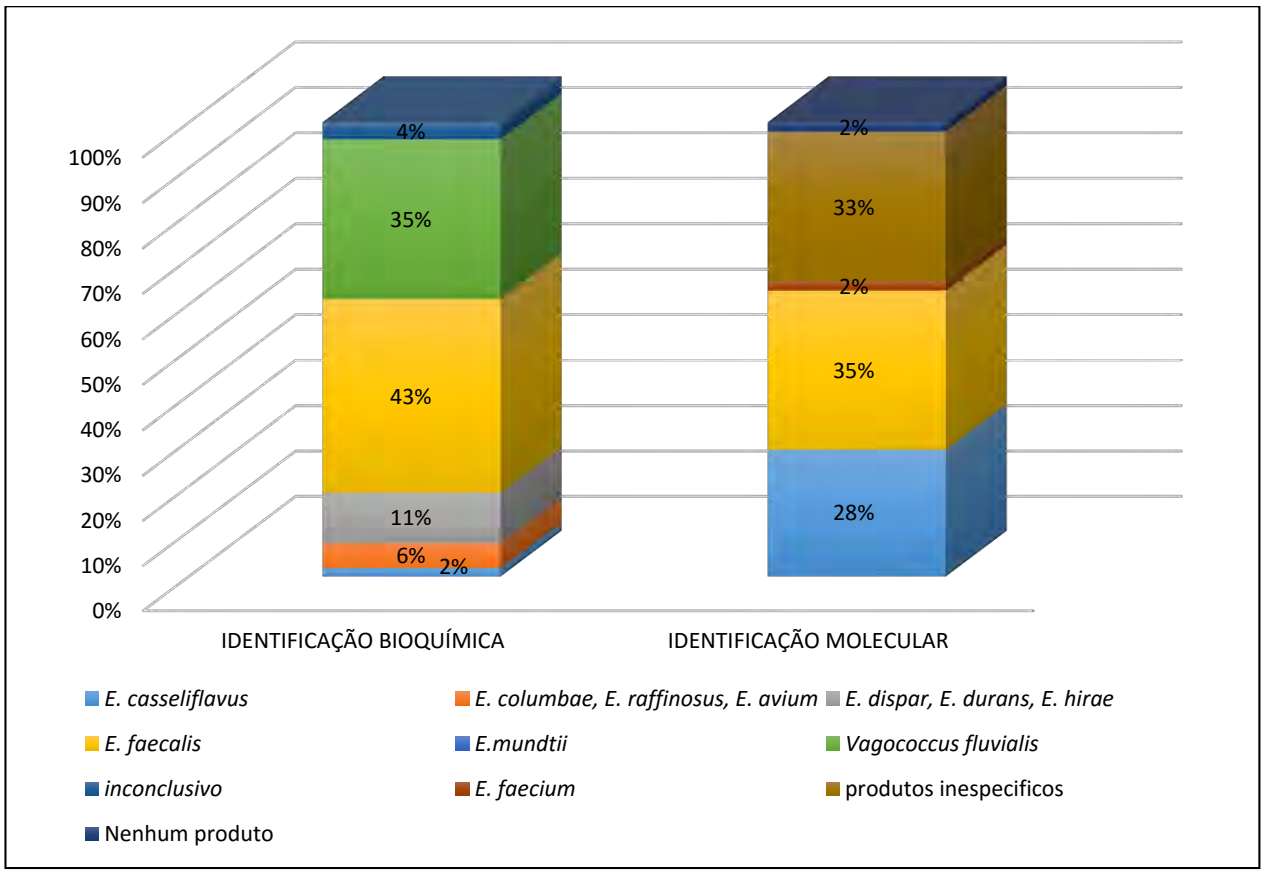

Figura 12. Porcentagens comparadas de isolados de VRE, identificadas pelos métodos bioquímico e molecular utilizados.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos indicam, de forma inédita no país, a circulação de VRE em propriedades produtoras de ovinos e caprinos, sem ocorrência de manifestações clínicas aparentes nos animais, porém com possíveis riscos à saúde dos produtores e profissionais envolvidos, bem como a eventuais consumidores.

O estudo de possíveis fontes de organismos multirresistentes na pecuária servem como indicador para o controle de seu crescimento no futuro, e assim, como os resultados obtido nesta pesquisa indicam a presença de 54 cepas caracterizadas como VRE, com índices de resistência a outro tipo de antimicrobianos, sendo que os maiores percentuais observados foram contra tetraciclina (24,1%), penicilina (22,2%) e cloranfenicol (7,4%); para vancomicina, teicoplanina e eritromicina o percentual foi de 3,7% para cada um e para ampicilina e ciprofloxacina o mesmo foi de 5,6% para cada um.

A análise de Multiplex PCR das 54 cepas VRE em criações de ovinos e caprinos indicaram que 23 (43%), 22 (41%), 2 (3,5%) e 2 (3,5%) foram positivas, respectivamente, para os genes *van*C2/C3, *van*C1, *van*A e *van*B, sendo que para 5,3% dos isolados nenhum produto foi amplificado, sugerindo a possível ocorrência de genes dos demais grupos *van* conhecidos entre os isolados.

8. BIBLIOGRAFIA

AARESTRUP, F. M. et al. Surveillance of antimicrobial resistance in bacteria isolated from food animals to antimicrobial growth promoters and related therapeutic agents in Denmark. **APMIS**, v. 106, n. 52, p. 606–622, 1998.

ANVISA. MANUAL DE MICROBIOLOGIA CLÍNICA PARA O CONTROLE ASSISTÊNCIA À SAÚDE Módulo 6: Detecção e identificação e bactérias de importância médica. **Agencia Nacional de Vigilancia Sanitária**, v. unico, n. 1ª edição, p. 01–150, 2010.

ATEBA, C. N.; LEKOMA, K. P.; KAWADZA, D. T. Detection of vanA and vanB genes in vancomycin-resistant enterococci (VRE) from groundwater using multiplex PCR analysis. **Journal of Water and Health**, v. 11, n. 4, p. 684–691, 2013.

BENDER, E. A. et al. Identification, Antimicrobial Resistance and Genotypic Characterization of *Enterococcus* spp. isolated in Porto Alegre, Brasil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 693–700, 2009.

CASELLAS, J. Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. **Rev Panam Salud Publica**, v. 30, n. 6, p. 519–528, 2011.

CETINKAYA, Y.; FALK, P.; MAYHALL, C. G. Vancomycin-Resistant Enterococci. **Clinical microbiology reviews**, v. 13, n. 4, p. 686–707, 2000.

CHAVERS, L. S. et al. Vancomycin-resistant enterococci: 15 years and counting. **Journal of Hospital Infection**, v. 53, n. 3, p. 159–171, 2003.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. [s.l: s.n.]. v. 27

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement**. [s.l: s.n.]. v. 32

CUI, L. et al. DNA Microarray-Based Identication of Genes Associated with Glycopeptide Resistance in Staphylococcus aureus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 8, p. 3404–3413, 2005.

DA SILVA, L. P. P. **Epidemiologia molecular e genética da resistência à vancomicina em enterococos isolados de pacientes de dois hospitais de Ribeirão Preto**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2012.

DE ALMEIDA, L. M. et al. Linezolid resistance in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates in a brazilian hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 5, p. 2993–2994, 2014.

DEASY, B. M. et al. A rapid PCR based method to distinguish between Lactococcus and Enterococcus. **Systematic and applied microbiology**, v. 23, n. 4, p. 510–522, 2000.

DESHPANDE, L. M. et al. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from North America and Europe: a report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 58, n. 2, p. 163–170, 2007.

DREES, M. et al. Prior environmental contamination increases the risk of acquisition of vancomycin-resistant enterococci. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 5, p. 678–685, 2008.

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 of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 24–27, 1995.

FERNANDES, S. C.; DHANASHREE, B. Drug resistance & virulence determinants in clinical isolates of *Enterococcus* species. **Student IJMR**, v. 137, n. May, p. 981–985, 2013.

FIGUEIREDO, R. et al. Resistência a antibióticos em isolados de Salmonella enterica em alimentos de origem animal. **RPCV**, v. 108, n. 583, p. 39–43, 2013.

FRANCO, A. T. DE M. et al. Comparação entre teste Bioquímico clássico e o Método da reação em cadeia da PoliMerase (PCR) para identificação de estirpes de *Enterococcus faecalis* isoladas da cavidade oral. **SALUSVITA**, v. 31, n. 3, p. 191–202, 2012.

FRANZ, C. M. A. P. et al. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, n. 2, p. 125–140, 2011.

GARCIA-GARROTE, F.; CERCENADO, E.; BOUZA, E. Evaluation of a new system, VITEK 2, for identification and antimicrobial susceptibility testing of enterococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 2108–2111, 2000.

GARCÍA-SÁNCHEZ, J. E.; GARCÍA-SÁNCHEZ, E.; GARCÍA-GARCÍA, M. I. Estudios de sensibilidad en bacterias anaerobias. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 32, n. FEBRUARY 2014, p. 23–29, 2014.

GONZÁLEZ, C.; MARIBEL, J.; ARMINDO, J. Mecanismos de resistencia a antibióticos b -lactámicos en Staphylococcus aureus Mechanisms of Resistance To b -Lactam Antibiotics in Staphylococcus aureus. **Kasmera**, v. 38, n. 1, p. 36–44, 2010.

HARAKEH, S.; YASSINE, H.; EL-FADEL, M. Antimicrobial-resistant patterns of Escherichia coli and Salmonella strains in the aquatic Lebanese environments. **Environmental Pollution**, v. 143, n. 2, p. 269–277, 2006.

HART, W. S.; HEUZENROEDER, M. W.; BARTON, M. D. Antimicrobial resistance in Campylobacter spp., Escherichia coli and enterococci associated with pigs in Australia. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 51, n. 5, p. 216–221, 2004.

HAWLEY, H. B.; ELDER, B. L. Multiple-Drug Resistant Enterococci: Laboratory Identification, Prevention, and Treatment. **Antimicrobit and Infectious Diseases Newsletter**, v. 16, n. 9, p. 65–68, 1998.

HECHT, D. W. Evolution of anaerobe susceptibility testing in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, n. 1, p. 28–35, 2002.

HIDRON, A. I. et al. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Annual Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 29, n. 11, p. 996–1011, 2008.

HIRAMATSU, K. Reviews Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus : a new model of antibiotic. **The Lancet infectious disease**, v. 1, n. 3, p. 147–155, 2001.

HOLLENBECK, B. L.; RICE, L. B. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. **Virulence**, v. 3, n. 5, p. 421–433, 2012.

HÖLZEL, C. et al. Presence of the Vancomycin Resistance. **Microbial Drug Resistence**, v. 20, n. 2, p. 177–180, 2014.

HOWDEN, B. P. et al. Reduced Vancomycin Susceptibility in Staphylococcus aureus, Including Vancomycin-Intermediate and Heterogeneous Vancomycin-Intermediate Strains: Resistance Mechanisms, Laboratory Detection, and Clinical Implications. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 1, p. 99–139, 2010.

JAMES, R. C. et al. Redesign of glycopeptide antibiotics: Back to the future. **American Chemical Biology**, v. 7, p. 797–804, 2012.

JORGENSEN, J. H.; FERRARO, M. J. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 11, p. 1749–1755, 2009.

KALOCHERETIS, P. et al. Dissemination of vancomycin-resistant enterococci among haemodialysis patients in Athens, Greece. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 6, p. 1031–1034, 2004.

KANG, M. et al. Molecular characteristics of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from a tertiary care hospital in Chengdu. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 33, p. 933–939, 2014.

KIM, S.-Y. et al. Characterization of *Enterococcus* spp. from human and animal feces using 16S rRNA sequences, the esp gene, and PFGE for microbial source tracking in Korea. **Environmental science & technology**, v. 44, n. 9, p. 3423–3428, 2010.

LAYTON, B. A. et al. *Enterococcus* species distribution among human and animal hosts using multiplex PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 2, p. 539–547, 2010.

LEBRETON, F. et al. D-Ala-D-Ser VanN-Type Transferable Vancomycin Resistance in *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 10, p. 4606–4612, 2011.

LEVINE, D. P. Vancomycin: A History. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. 1, p. 5–12, 2006.

LÓPEZ, M.; TENORIO, C.; TORRES, C. Study of Vancomycin Resistance in Faecal Enterococci from Healthy Humans and Dogs in Spain a Decade after the Avoparcin Ban in Europe. **Zoonoses and Public Health**, v. 60, n. 2, p. 160–167, 2013.

LOWDEN, J.; MILLER, R.; YAHDI, M. Optimal control of vancomycin-resistant enterococci using preventive care and treatment of infections. **Mathematical Biosciences**, v. 249, p. 8–17, 2014.

MANFREDI, R.; SABBATANI, S. Novel pharmaceutical molecules against emerging resistant gram-positive cocci. **The Brazilian journal of infectious diseases**, v. 14, n. 1, p. 96–108, 2009.

MANGALAPPALLI-ILLATHU, A. et al. Dynamics of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus faecalis* during swine manure storage. **Canadian journal of microbiology**, v. 56, p. 683–691, 2010.

MARGUET, E. R.; VALLEJO, M.; OLIVERA, N. L. Factores de virulencia de cepas de *Enterococcus* aisladas de quesos ovinos. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, v. 42, n. 4, p. 543–548, 2008.

MCBRIDE, S. M. et al. Genetic diversity among *Enterococcus faecalis*. **PLoS ONE**, v. 2, n. 7, p. 1–22, 2007.

MCKEON, D. M.; CALABRESE, J. P.; BISSONNETTE, G. K. Antibiotic-Resistant Gram-Negative Bacteria in Rural Groundwater Supplies. **Water Research**, v. 29, n. 8, p. 1902–1908, 1995.

MENEZES, E. A. et al. Infecções Hospitalares urinárias causadas por *Enterococcus faecalis* na cidade de Fortaleza. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, v. 37, p. 65–67, 2005.

MOELLERING, R. C. Vancomycin: A 50-Year Reassessment. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. 1, p. 3–4, 2006.

MOTA, R. A. et al. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresitência bacteriana. **Braz. J. Vet. Resanim Sci**, v. 42, p. 465–470, 2005.

MURRAY, B. Vancomycin-Resistant Enterococcal Infections. **Drug Therapy**, v. 342, n. 10, p. 710–721, 2000.

MURRAY, B. E. The Life and Times of the Enterococcus. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, n. 1, p. 46–65, 1990.

NAM, S. et al. Detection and Genotyping of Vancomycin-Resistant *Enterococcus* spp. by Multiplex Polymerase Chain Reaction in Korean Aquatic Environmental Samples. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 216, n. 4, p. 421–427, 2013.

NILSSON, O. Vancomycin resistant enterococci in farm animals – occurrence and importance. **Infection Ecology & Epidemiology**, v. 2, n. 0, p. 1–8, 2012.

NOGUEIRA, P. H. **Isolamento e caracterização de *Enterococcus faecalis* resistentes a vancomicina ou a altas concentrações de aminoglicosídeos provenientes de suínos no Brasil**. [s.l.] São Paulo, 2013.

OBENG, A. S. et al. Comparison of antimicrobial resistance patterns in enterococci from intensive and free range chickens in Australia. **Avian pathology**, v. 42, n. 1, p. 45–54, 2013.

OMS. A crescente ameaça da resistência antimicrobiana, Opções de ação. p. 1–16, 2012.

PALAVECINO, E. R. Puesta al día en enterococos - año 2001 : Identificación de especies y estudio de susceptibilidad antimicrobiana. **Revista Chilena de Infectologia**, v. 18, n. 2, p. 95–100, 2001.

PATEL, R. Clinical impact of vancomycin-resistant enterococci. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 51, p. 13–21, 2003.

PFALLER, M. A et al. Survey of bloodstream infections due to gram-negative bacilli: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, and Latin America for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 29, n. 3, p. 595–607, 1999.

PRAHARAJ, I.; SUJATHA, S.; PARIJA, S. C. Phenotypic & genotypic characterization of vancomycin resistant *Enterococcus* isolates from clinical specimens. **Indian J Med Res**, v. 138, p. 549–556, 2013.

RAMOS, S. et al. Genetic characterisation of antibiotic resistance and virulence factors in van A-

containing enterococci from cattle, sheep and pigs subsequent to the discontinuation of the use of avoparcin. **The veterinary Journal**, v. 193, p. 301–303, 2012.

RANOTKAR, S. et al. Vancomycin-resistant enterococci: Troublemaker of the 21st century. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 2, n. 4, p. 205–212, 2014.

RUBINSTEIN, E.; KEYNAN, Y. Vancomycin-resistant enterococci. **Critical Care Clinics**, v. 29, n. 4, p. 841–852, 2013.

SARAIVA, I. H. S. et al. Avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de 87 amostras clínicas de enterococos resistentes à vancomicina. **Rev Ass Med Brasil**, v. 43, n. 3, p. 217–222, 1997.

SARAVOLATZ, L. et al. Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus, Epidemiologic Observations During a Community-Acquired Outbreak. **Annais of Internal Medicine**, v. 96, n. 1, p. 11–16, 1982.

SILVA, J. A. et al. Resistencia a antimicrobianos en cepas de *Enterococcus* sp aisladas en hospitales del norte de Chile. **Microbiología clínica**, v. 23, n. 3, p. 226–231, 2006.

SILVA, N. et al. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Agua. p. 208, 2010.

SOFIANOU, D. et al. Substantially increased faecal carriage of vancomycin-resistant enterococci in a tertiary Greek hospital after a 4 year time interval. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 251–254, 2004.

SOLDATELLI, R.; LORENZINI, E. Resistência antimicrobiana: importância no ambiente hospitalar. **I Congresso de Pesquisa e Extensão da FSG**, 2013.

SONG, J.-H. et al. High frequency of vancomycin-resistant *Enterococcus* f*aecium* isolates with VanB phenotype and vanA genotype in Korean hospitals. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 56, n. 4, p. 401–406, 2006.

SPARO, M. et al. High-level resistance to gentamicin: genetic transfer between *Enterococcus faecalis* isolated from food of animal origin and human microbiota. **Letters in applied microbiology**, v. 54, n. 2, p. 119–125, 2011.

SUJATHA, S.; PRAHARAJ, I. Glycopeptide resistance in Gram-positive Cocci: A review. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2012, p. 1–10, 2012.

SUPPOLA, J. P. et al. Overgrowth of *Enterococcus faecium* in the feces of patients with hematologic malignancies. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 23, n. 4, p. 694–7, 1996.

TACCONELLI, E.; CATALDO, M. A. Vancomycin-resistant enterococci (VRE): transmission and control. **International journal of antimicrobial agents**, v. 31, n. 2, p. 99–106, fev. 2008.

THEVENON, F. et al. Antibiotic resistant bacteria/genes dissemination in lacustrine sediments highly increased following cultural eutrophication of Lake Geneva (Switzerland). **Chemosphere**, v. 86, n. 5, p. 468–476, 2012.

WERNER, G. et al. Emergence and spread of vancomycin resistance among Enterococci in Europe. **Eurosurveillance**, v. 13, n. 47, p. 1–11, 2008.

WERNER, G. Current trends of emergence and spread of vancomycin-resistante enterococci.

Antibiotic Resistant Bacteria – A Continuous Challenge in the New Millennium, 2011.

WHO. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. p. 256, 2014.

XU, X. et al. vanM, a new glycopeptide resistance gene cluster found in *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 11, p. 4643–4647, 2010.

ZIMBRO, M. et al. **Manual of Microbiological Culture Media**. Maryland, USA: [s.n.]. Disponível em: <https://www.bd.com/ds/technicalCenter/misc/difcobblmanual_2nded_lowres.pdf>.

9. ANEXOS

ANEXO 1: Apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Comitê de Ética em Pesquisa da FZEA

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Detecção de Enterococcus resistentes a vancomicina em criações comerciais de ovinos e caprinos das regiões centro-leste e nordeste do Estado de São Paulo", protocolado sob o CEUA nº 6857170915, sob a responsabilidade de **Ricardo Luiz Moro De Sousa** e equipe; *Eliana Marcela Jimenez Obando; Sarita Bonaugurio Gallo* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - FZEA/USP em reunião de 18/11/2015.

We certify that the proposal "Detection of vancomycin-resistant Enterococcus in sheep and goat farms from central-eastern and northeastern regions of São Paulo State", utilizing 45 Caprines (males and females), 45 Ovines (males and females), protocol number CEUA 6857170915, under the responsibility of **Ricardo Luiz Moro De Sousa** and team; *Eliana Marcela Jimenez Obando; Sarita Bonaugurio Gallo* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Animal Science and Food Engineering of São Paulo University in the meeting of 11/18/2015.

Vigência da Proposta: de 10/2015 a 01/2016 — Área: Medicina Veterinária

Procedência: Não aplicável					
Espécie: Caprinos	Gênero: Machos e Fêmeas	Idade: >1ano	N: 45		
Linhagem: Variada		Peso: 60-70Kg			
Procedência: Não aplicável					
Espécie: Ovinos	Gênero: Machos e Fêmeas	Idade: >1ano	N: 45		
Linhagem: Variada		Peso: 60-70Kg			

Nota: O objetivo deste trabalho será estudar a circulação de Enterococcus Resistentes à Vancomicina - VRE presentes em amostras fecais oriundas de pequenas propriedades de ovinos e caprinos das regiões centro-leste e nordeste do estado de São Paulo. As amostras serão coletadas incluindo animais a partir de um ano de idade, independentemente do sexo, os quais serão amostrados ao acaso, com um total de 15 animais por propriedade. As amostras serão coletadas diretamente do reto de cada animal, em quantidade aproximada de 3g, acondicionando a amostra em frasco de coleta para transporte. As amostras serão levadas e analisadas no Laboratório de Higiene Zootécnica da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA-USP). Será realizado isolamento bacteriano com semeadura em placa e subcultivo em ágar acrescido de 6?g/mL de vancomicina para verificação de colônias resistentes e posterior contagem direta de bactérias do gênero em Unidades Formadoras de Colônias por mL (UFC/mL). Na sequência será realizada identificação fenotípica com base na morfologia, coloração de Gram, hidrólise enzimática da L-pyrrolidonyl-beta-naphtylamide (PYR TEST) e prova de catalase. Para as bactérias classificadas Gram positivas, PYR positivas, catalase negativas e de morfologia característica serão feitas as provas bioquímicas utilizando o Kit de identificação Enterokit (PROBAC, Brasil) além da determinação do perfil de sensibilidade antimicrobiana, utilizando o método de difusão em disco Kirby-Bauer e Concentração Inibitória Mínima (CIM) para Vancomicina e Teicoplanina que será realizado utilizando o Etest® (Probac, Brasil). Por último, todas as amostras de DNA extraídas das cepas previamente identificadas como Enterococcus Vancomicina Resistente (VRE) serão testadas com primers específicos por multiplexPCR para os genes marcadores de espécie (*E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum*, e *E. casseliflavus*) e de resistência (*vanA*, *vanB*, *vanC1* e *VanC2-VanC3*). Acredita-se que os dados obtidos na presente investigação possam contribuir para o melhor conhecimento da circulação de cepas de VRE em áreas de produção animal com implicações para a saúde dos rebanhos investigados e de produtores/profissionais envolvidos, bem como eventualmente de potenciais consumidores dos produtos de origem animal derivados dessas áreas.

Pirassununga, 20 de novembro de 2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Comitê de Ética em Pesquisa da FZEA

Daniele dos Santos Martins
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Universidade de São Paulo

Av. Duque de Caxias Norte, 225 – CEP 13635-900 Pirassununga/SP – tel. 55 (19) 5565 4254 Fax
Horário de atendimento: Usa 8h às 17h – e-mail: [illegible]@usp.br
[illegible]

10. APÊNDICE

APÊNDICE I. Características fenotípicas utilizadas na identificação das espécies de *Enterococcus* e gêneros relacionados.

	PYR	MOT	PIG	ADH	MNTL	ARAB	SBTL
Grupo 1							
E. avium	+	-	-	-	+	+	+
E. gilvus	+	-	+	-	+	-	+
E. maladoratus	+	-	-	-	+	-	+
E. pallens	-	-	+	-	+	+	+
E. psudoavium	+	-	-	-	+	-	+
E. raffinosus	+	-	-	-	+	+	+
E- saccharomyticus	-	-	-	-	+	-	+
Enterococcus sp.	-	-	-	-	+	-	+
Grupo 2							
E. faecalis	+	-	-	+	+	-	+
E. faecium	+	-	-	+	+	+	V
E. casseliflavus	+	+	+	+	+	+	V
E. gallinarum	+	+	-	+	+	+	-
E. mundtii	+	-	+	+	+	+	V
E. haemoperoxidus	+	-	+F	+	+	-	-
Enterococcus sp.	+	-	-	+	+	-	-
Lactococcus spp.	V	-	V	V+	+	-	-
Grupo 3							
E. dispar	+	-	-	+	-	-	-
E. durans	+	-	-	+	-	-	-
E. hirae	+	-	-	+	-	-	-
E. ratti	+	-	-	+	-	-	-
E. villorum	+	-	-	+	-	-	-
Grupo 4							
E. asini	+	-	-	-	-	-	-
E. cecorum	-	-	-	-	-	-	+
E. sulfurous	+	-	+	-	-	-	-
E. phoeniculicola	ND	-	-	-	-	-	-
Enterococcus sp.	+	-	-	-	-	-	-
Grupo 5							
E. columbae	-	-	-	-	+	+	+
E. canis	+	-	-	-	+	+	-
E. maraviensis	V	-	-	-	+	+	-
Vagococcus spp.	+	+	-	V+	+	+	+

Abreviações e símbolos: PYR, Hidrólise L-pirrolidonil-beta-naftilamida; MOT, Motilidade; PIG, pigmento amarelo; ADH, Arginina diidrolase; MANTL, Manitol; ARAB, Arabinose; SBTL, sorbitol; +, >90% positividade; -, <10% positividade; V, variável; ND, não disponível; R, Resistente; S, sensível; [1] reação disponível tardia (3 ou mais dias de incubação); [2] reação fraca.