

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**AVALIAÇÃO DA COLONIZAÇÃO E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE
Enterococcus sp. ISOLADOS DE “SWABS” CLOACAIS DE FRANGOS DE
CORTE**

ANA PAULA VAZ CASSENEGO
Médica Veterinária

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia Agrícola e do
Ambiente como um dos
requisitos para obtenção do
Grau de Mestre na Área de
Microbiologia Molecular de
Procariotos

Orientador(a): Prof^ª. Dr^ª. Ana Paula Guedes Frazzon
Co-Orientador(a): Prof^ª. Dr^ª. Sueli Van Der Sand

Porto Alegre, RS, Brasil
Março de 2010

Catálogo na Publicação
UFRGS/ICBS/Biblioteca Setorial

C344a Cassenego, Ana Paula Vaz

Avaliação da colonização e resistência antimicrobiana de *Enterococcus* sp. isolados de “swabs” cloacais de frangos de corte / Ana Paula Vaz Cassenego. – 2010.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre, BR-RS, 2010.

Orientação: Prof. Ana Paula Guedes Frazzon

Co-orientação: Prof. Sueli Teresinha van der Sand

1. *Enterococcus* 2. Resistência microbiana a medicamentos 3. Frangos 4. Dieta I. Frazzon, Ana Paula Guedes, orient. II. Sand, Sueli Teresinha van der, co-orient. III. Título.

CDU 579.86 (043)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me fazer acreditar que o ser humano pode crescer e se aperfeiçoar sem esquecer de princípios como humildade, respeito e amizade.

Aos meus pais Léo e Rosane e meu irmão Pedro Henrique, por todo carinho, esforço, dedicação, compreensão e paciência durante esse período importante de minha vida.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Ana Paula Guedes Frazzon, pelo apoio e paciência, pelas dicas e brincadeiras e, principalmente, por acreditar na minha capacidade, mesmo nos momentos em que eu hesitei.

À minha co-orientadora, Prof^a. Dr^a. Sueli Van Der Sand, pelo apoio, orientação realizada nesses últimos meses, pela paciência e tempo dispensados.

À Prof^a. Dr^a. Andréia Ribeiro, por permitir a realização da primeira etapa desse experimento no Departamento de Zootecnia da UFRGS.

Ao Prof. Dr. Pedro Alves d'Azevedo, pela disponibilidade e por me receber nas dependências da UFCSPA, permitindo a realização de etapas importantes deste trabalho no Laboratório de Microbiologia.

A todos membros da Secretaria do PPGMAA, especialmente ao Coordenador do curso, Prof. Dr. José Carlos Germani, agradeço pela amizade.

Às gurias dos Laboratórios 164 e 209, agradeço pelo auxílio e convívio diários.

A todos familiares, colegas, amigos e professores que me auxiliaram de alguma forma durante esses anos e torceram por minha realização.
Em especial, aos colegas Mica, Camille e Élio, obrigada pela amizade, pelas festas e pelas várias *happy hours*. Torço pelo sucesso de vocês!

RESUMO

AVALIAÇÃO DA COLONIZAÇÃO E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *Enterococcus* sp. ISOLADOS DE “SWABS” CLOACAIS DE FRANGOS DE CORTE¹

Bactérias comensais do intestino de frangos tornaram-se objeto frequente de estudos, pois a alta taxa de exportação desses produtos tem aumentado a preocupação com a qualidade e a sanidade de granjas no que se refere à nutrição animal, ganho de peso e doenças infecciosas. O objetivo do presente estudo foi verificar a influência de diferentes dietas para frangos de corte na colonização, assim como no fenótipo e genótipo de resistência antimicrobiana de isolados *Enterococcus* sp. Amostras de “swabs” cloacais de frangos de corte foram utilizadas para isolamento de *Enterococcus* sp. Os frangos foram submetidos a diferentes dietas contendo promotores de crescimento, probióticos, óleos essenciais e coccidiostáticos ionóforos, e divididos em grupos conforme o tratamento empregado. Foram obtidos 240 isolados de *Enterococcus* sp. confirmados para gênero através da técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), submetidos a testes bioquímicos e moleculares para identificação de espécie, determinados os perfis de susceptibilidade a diversos antimicrobianos e testados para a presença de genes de resistência *tet(M)*, *tet(L)* e *erm(B)* por PCR. Observou-se uma alteração na composição ou no número de espécies de *Enterococcus* sp. de acordo com as dietas empregadas. Todas as dietas, independentes da presença ou não de coccidiostático ionóforo, apresentaram um aumento na frequência de *Enterococcus* resistentes quando comparados com o grupo controle. No entanto, nos grupos que os frangos receberam coccidiostático ionóforo, a taxa de *Enterococcus* sp. isolados foi menor quando comparada aos isolados dos grupos que não receberam essa composição. Do total de isolados resistentes à tetraciclina, 94% e 30%, continham os genes *tet(M)* e *tet(L)*, respectivamente. Dos isolados resistentes a eritromicina, 97,9% possuíam o gene de resistência *erm(B)*. Não houve correlação das diferentes dietas para frangos de corte na colonização, fenótipo e genótipo de resistência antimicrobiana de isolados de *Enterococcus* sp.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Microbiologia Molecular de Procariotos, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (89 p.) Março, 2010.

ABSTRACT

COLONIZATION AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE EVALUATION OF *Enterococcus* SP. ISOLATED FROM CLOACAL SWABS OF BROILER CHICKENS²

Commensal bacteria from the gut of chickens have been frequently object of studies because the high rate of exportation of these products the concern with the quality and health of poultry, in relation to animal nutrition, weight gain and infectious diseases has been increasing. The principal aim of this study was to verify the influence of different diets treated to broilers, in the colonization of *Enterococcus* strains, and as well the phenotype and genotype of resistance strains. Samples from cloacal swabs of broiler chickens were used for the isolation of strains of *Enterococcus* sp. The broilers were subjected to diets with growth promoter, probiotics, essential oils and ionophore coccidiostat and divided into groups according to treatment used. Two hundred forty isolates of *Enterococcus* sp. were confirmed the genus using the polymerase chain reaction (PCR), subjected to biochemical and molecular species identification, antibiotic susceptibility profile and verification of antibiotic resistance genes *tet(M)*, *tet(L)* e *erm(B)* by PCR. Accordingly to the diets employed to the chickens a changing the composition or the number of *Enterococcus* sp. was observed. All diets, regardless to the presence or absence of ionophore coccidiostat showed an increase in the frequency of *Enterococcus* resistant when compared with the control group. However, the groups that received ionophore coccidiostat, the rate of resistant *Enterococcus* sp. was lower than the groups that did not administered this composition. The isolates that presented resistant to tetracycline, 94% and 30%, contained the genes *tet(M)* and *tet(L)*, respectively. In the isolates resistant to erythromycin, 97.9% had the gene *erm(B)*. There was no correlation of different diets for broiler chickens on colonization, phenotype and genotype resistance in the *Enterococcus* sp strains.

²Master of Science dissertation in Agricultural Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (89 p.) March, 2010.

SUMÁRIO

RELAÇÃO DE TABELAS	viii
RELAÇÃO DE FIGURAS	ix
RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivo	3
1.2 Objetivos específicos	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
2.1 Características do gênero <i>Enterococcus</i>	1
2.2 Epidemiologia de <i>Enterococcus</i>	5
2.3 <i>Enterococcus</i> sp. como probiótico	6
2.4 Resistência bacteriana	8
2.4.1 Origem genética	11
2.4.2 Resistência cromossômica	11
2.4.3 Resistência extracromossômica	12
2.5 Resistência em microrganismos do gênero <i>Enterococcus</i>	12
2.5.1 Resistência a β -lactâmicos	13
2.5.2 Resistência a aminoglicosídeos	13
2.5.3 Resistência a glicopeptídeos	15
2.5.4 Resistência à tetraciclina	16
2.5.5 Resistência ao cloranfenicol	18
2.5.6 Resistência a macrolídeos	19
2.5.7 Resistência a quinolonas	20
2.5.8 Resistência a estreptograminas	21
2.6 Indústria Avícola	22
2.7 Antimicrobianos na ração de frangos de corte	23
2.8 Probióticos e óleos essenciais na ração de frangos de corte	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Amostras	27
3.2 Isolamento e identificação fenotípica das isolados de <i>Enterococcus</i> sp.	28
3.3 Confirmação molecular de gênero <i>Enterococcus</i>	29
3.4 Testes bioquímicos para identificação de espécies de <i>Enterococcus</i>	30
3.5 PCR-RFLP para confirmação das espécies <i>E. gallinarum</i> e <i>E. casseliflavus</i>	31
3.6 Teste de suscetibilidade a antimicrobianos	31

3.7 Detecção de genes de resistência antimicrobiana	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 Isolamento e identificação fenotípica e genotípica de <i>Enterococcus</i> sp.	35
4.2 Prevalência das espécies de <i>Enterococcus</i> em relação às dietas	37
4.3 Confirmação molecular das espécies <i>Enterococcus gallinarum</i> e <i>Enterococcus casseliflavus</i> por PCR-RFLP.....	40
4.4 Perfil de resistência a antimicrobianos	41
4.5 Perfil de susceptibilidade de <i>Enterococcus</i> sp. em relação às dietas suplementadas	47
4.6 Detecção de genes de resistência.....	50
5. CONCLUSÃO	56
6. REFERÊNCIAS.....	57
7. APÊNDICE.....	72
7.1 Meios de Cultura e Soluções utilizadas.....	73
7.1.1 Meio de Cultura Caldo Azida	73
7.1.2 Meio de Cultura Agar Brain Heart Infusion (BHI)	73
7.1.3 Meio de Cultura Agar BHI + NaCl 6,5%.....	73
7.1.4 Meio de Cultura Agar Bile Esculina.....	73
7.1.5 Meio de Cultura Agar Muller Hinton	73
7.1.6 Meio de Cultura Arabinose.....	74
7.1.7 Meio de Cultura Rafinose.....	74
7.1.8 Meio de Cultura Sorbitol.....	74
7.1.9 Meio de Cultura Sorbose	74
7.1.10 Meio de Cultura Manitol	75
7.1.11 Meio de Cultura Metyl-β-Dglucopyranoside (MGP).....	75
7.1.12 Meio de Cultura Piruvato.....	75
7.1.13 Meio de Cultura NaCl.....	75
7.1.14 Meios de Cultura Arginina e Controle	76
7.1.15 Solução Salina 0,9%.....	76
7.1.16 Tampão TAE 50X.....	76
7.1.17 Tampão TAE 1X.....	76
7.1.18 Oligonucleotídeos iniciadores	77
7.1.19 dNTPS(desoxirribonucleotídeos trifosfatados)	77
7.1.20 Tampão de amostra	77
7.2 Exigências Nutricionais de Frangos de Corte.....	78
8. VITA	80

RELAÇÃO DE TABELAS

TABELA 1 Grupos e dietas empregadas para os frangos de acordo com incremento.	28
TABELA 2 Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de PCR dos genes <i>tuf</i> , 16sRNA, <i>tet</i> (M), <i>tet</i> (L) e <i>erm</i> (B).	33
TABELA 3 Incidência de resistência antimicrobiana entre as espécies de <i>Enterococcus</i> isoladas de frangos de corte.	45
TABELA 4 Incidência de <i>Enterococcus</i> resistentes isolados de cloacas de frangos em relação à dieta empregada.....	48

RELAÇÃO DE FIGURAS

FIGURA 1 Espécies de <i>Enterococcus</i> isoladas de “swabs” cloacais de frangos de corte submetidos a diferentes dietas e identificadas através de testes bioquímicos e moleculares.....	36
FIGURA 2 Incidência de resistência antimicrobiana entre os isolados de <i>Enterococcus</i> sp. isolados de “swabs” cloacais de frangos de corte.	41
FIGURA 3 Incidência de resistência fenotípica e genotípica dos antimicrobianos tetraciclina e eritromicina..	52
FIGURA 4 Perfil genotípico de resistência antimicrobiana relacionado às espécies mais freqüentes.....	54

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATP- Trifosfato de Adenosina
DNA- Ácido Desoxirribonucléico
LAP- Leucina Aminopeptidase
MIC- Concentração Inibitória Mínima
MLS- Macrolídeos, Lincosaminas e Estreptogramínas
mRNA- Ácido Ribonucléico Mensageiro
PBP- Proteínas Ligadoras de Penicilina
PCR- Reação em Cadeia pela Polimerase
PCR-RFLP- Restriction Fragment Length Polymorphism
PFGE- Gel de Eletroforese em Campo Pulsado
PPM- Partes por Milhão
PYR- Pirrolidonil- β -naftilamida
RAPD- Random Amplification of Polymorphic DNA
rDNA- Ácido Desoxirribonucléico Ribossômico
rRNA- Ácido Ribonucléico Ribossômico
tRNA- Ácido Ribonucléico Transportador
UTI- Unidade de Terapia Intensiva
VRE- *Enterococcus* Resistentes à Vancomicina

1. INTRODUÇÃO

O setor avícola brasileiro é um dos mais desenvolvidos do mundo. Entre os países que se destacam no setor, o Brasil ocupa o terceiro lugar no mercado mundial de produção de carne de frango. No primeiro trimestre de 2009, 1,12 bilhão de frangos foram abatidos em todo o País. Desse total, o Rio Grande do Sul abateu 58,8 milhões de cabeças (IBGE, 2009). Para que o setor mantenha o sucesso, é preciso investir em produtividade a baixo custo, ter cuidado com a qualidade e sanidade de granjas, no que se refere principalmente à nutrição animal, ganho de peso e doenças infecciosas que possam vir a acometer os animais, comprometendo seu desempenho zootécnico, e também, com a questão ambiental, destacando-se a importância do aproveitamento dos resíduos da indústria avícola.

Muitos aspectos envolvem o desenvolvimento da avicultura no Brasil entre eles cita-se o uso de substâncias chamadas promotores de crescimento como aditivos nas rações. Um dos promotores de crescimento mais conhecidos são os antimicrobianos, que são empregados com fins profiláticos, com o objetivo de diminuir a incidência de infecções bacterianas e aumentar o ganho de peso nos animais. Entretanto, nos últimos anos, o uso de algumas dessas substâncias,

utilizadas em sub-doses como promotores de crescimento em frangos e suínos, foi proibido pela União Européia e Estados Unidos, podem estar relacionados com a seleção e a disseminação de bactérias resistentes no ambiente. Alguns estudos têm sugerido possíveis rotas de transmissão de bactérias resistentes a antimicrobianos de origem animal para humanos, através dos alimentos, contato direto com os animais e ambiente. As bactérias resistentes, uma vez no hospedeiro, podem fazer troca de material genético com as bactérias comensais presentes na microbiota. Já foi demonstrado que isolados de espécimes clínicas de pacientes hospitalizados, de alimentos (frangos e suínos) e de animais saudáveis apresentavam os mesmos genes de resistência. Isso classifica os animais como sendo um importante reservatório de bactérias resistentes e também uma fonte desta bactéria para humanos. Após as restrições para o uso de antimicrobiano como promotor de crescimento na produção avícola e suinícola, outras substâncias alternativas começaram a ser incorporadas como aditivos alimentares, substâncias probióticas e óleos essenciais.

Bactérias comensais do intestino de frangos tornaram-se objeto freqüente de estudos científicos e também de monitoramento por parte de órgãos públicos responsáveis pela fiscalização de produtos animais destinados à comercialização e consumo humano. Entre esses comensais, destacam-se bactérias do gênero *Enterococcus*, composto por mais de 28 espécies, destacando-se *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus raffinosus* e *Enterococcus hirae*. Como o nome sugere,

os enterococos são bactérias entéricas membros da microbiota de normal de humanos e de uma variedade de animais. Na área médica *E. faecalis* e *E. faecium* são encontradas causando infecções em humanos.

1.1 Objetivo

Avaliar a influência de diferentes dietas para frangos de corte na prevalência e no perfil de resistência a antimicrobianos de isolados de *Enterococcus* sp..

1.2 Objetivos específicos

- Isolar *Enterococcus* sp. a partir de “swabs” cloacais de frangos de corte;
- Confirmar gênero *Enterococcus* pela técnica de PCR;
- Identificar as espécies por testes bioquímicos padrões para esta bactéria;
- Verificar o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos destes isolados;
- Determinar pela técnica de PCR a presença dos genes de resistência *tet(M)*, *tet(L)* e *erm(B)* nos isolados;
- Relacionar as dietas empregadas para os frangos com os resultados obtidos nas análises.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características do gênero *Enterococcus*

Enterococcus são bactérias amplamente distribuídas no ambiente, sendo encontradas principalmente no trato gastrintestinal de humanos e animais, cavidade oral e trato genital feminino (Moreno et al. 2006; Mohamed, 2007). Entretanto, podem ser encontrados no solo, em alimentos, na água, em animais, pássaros e insetos (Teixeira & Facklam, 2003).

Na análise microscópica apresentam-se como Gram positivos com a forma de cocos arranjados aos pares ou ainda como pequenas cadeias. *Enterococcus* são anaeróbios facultativos, com temperatura ótima de multiplicação a 35°C, entretanto conseguem crescer em ampla variedade de temperaturas entre 10 e 45°C e podem sobreviver durante 30 minutos a 60°C, bem como suportam variações de pH entre 4,0 e 9,6. Têm habilidade de sobreviver em meios contendo elevadas, concentração de NaCl (acima de 6,5%) e 40% de sais biliares (Hew et al., 2007). Algumas espécies como *E. galinarum* e *E. casseliflavus* são móveis e a maioria hidrolisa o substrato pirrolidoni-β-naftilamida (**PYR**). Todas as linhagens produzem a enzima leucina-aminopeptidase (**LAP**)

(Schleifer & Kilpper-Baelz, 1984; Franz et al., 1999 ; Manero & Blanch, 1999 ; Corrêa et al., 2005).

Através da análise comparativa da seqüência do **rRNA** 16S foram identificadas até o momento 40 espécies: *E. asini*, *E. avium*, *E. caccae*, *E. camelliae*, *E. canintestini*, *E. canis*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. devriesei*, *E. dispar*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. flavescens*, *E. gallinarum*, *E. gilvus*, *E. haemoperoxidus*, *E. hermannienseis*, *E. hirae*, *E. italicus*, *E. malodoratus*, *E. moraviensis*, *E. mundtii*, *E. pallens*, *E. phoeniculicola*, *E. porcinus*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus*, *E. ratti*, *E. saccharolyticus*, *E. saccharominimus*, *E. seriolicida*, *E. silesiacus*, *E. solitarius*, *E. sulfureus*, *E. termitis*, *E. thailandicus* e *E. villorum* (Manero & Blanch, 1999; Hardie & Whiley, 1997; Hsueh et al., 2000; Tyrrell et al., 2002; Euzéby, 2010). As espécies apresentam um grande número de características fenotípicas que são divididas entre membros de grupos

A rotina de identificação das espécies usada em laboratórios clínicos é baseada em métodos fenotípicos (Bascom & Manafi, 1998; Devriese, 1993). Porém, técnicas moleculares têm auxiliado na discriminação das espécies, como a reação em cadeia da polimerase (**PCR**), amplificação randômica de DNA polimórfico (**RAPD**) e **PCR- RFLP** da região 16S rRNA (Cocconcelli et al., 1995; Tenover et al., 1995; Tyrrell et al., 1997; Medeiros et al., 2010).

2.2 Epidemiologia de *Enterococcus*

Desencadeada por uma dualidade aparente entre propriedades benéficas e prejudiciais, muitas pesquisas têm focado no papel de enterococos

isolados de alimentos como reservatório e/ou veículo de resistência a antimicrobianos e de fatores de virulência e uma possível interação entre estes antimicrobianos e seus fatores de virulência (Huys et al., 2004). Com isso, podem causar infecções em humanos e, durante as últimas décadas, *E. faecalis* e *E. faecium* multirresistentes têm adquirido um papel importante em infecções hospitalares (De Leener et al., 2004), atuando como patógenos oportunistas principalmente em pacientes idosos, imunocomprometidos, hospitalizados por longos períodos ou que fazem uso de terapia antimicrobiana de amplo espectro (Horner et al., 2005).

São agentes de infecções nosocomiais, afetando o trato urinário, corrente circulatória, regiões intra-abdominal e pélvica, feridas cirúrgicas e sistema nervoso central (Mohamed, 2007). Em particular, isolados de *E. faecium* têm sido relatadas como multirresistentes a antimicrobianos, incluindo penicilina, aminoglicosídeos (em níveis elevados) e vancomicinas, limitando as alternativas terapêuticas para o tratamento de infecções severas por *Enterococcus* sp. (Petsaris et al., 2005).

2.3 *Enterococcus* sp. como probiótico

Probióticos podem ser definidos como monoculturas ou culturas mistas de microrganismos vivos que quando consumidos pelo homem ou animal poderão afetar de forma positiva, melhorando as propriedades da microbiota endógena do hospedeiro. Frequentemente são constituídos de espécies que fazem parte do habitat

intestinal (Franz et al.; 1999). Um probiótico pode ser definido então, como um produto que contem uma dose adequada de microrganismos vivos que foram obtidos em estudos com objetivos de conferir benefícios à saúde. Precisa ser pesquisado a nível de cepas, possuir um alvo específico e deve ser formulado através de produtos que utilizem cepas e doses eficazes (Sanders, 2008). Para humanos, os probióticos são empregados na forma de iogurtes, leites fermentados, fórmulas infantis e preparações farmacêuticas. Seus efeitos benéficos são atribuídos aos seguintes mecanismos: i) ação antagônica em relação a outros microrganismos através da produção de substâncias que inibam ou eliminem os patógenos; ii) competição com patógenos por fontes de nutrientes ou locais de adesão; iii) modulação da resposta imune do hospedeiro (Bernet et al., 1994).

Estudos foram realizados avaliando o uso de linhagens de enterococos como probióticos para utilização em humanos ou animais, onde a linhagem de *E. faecium* SF68 é talvez a mais estudada em termos de atividade probiótica. Esses estudos relataram a importância do uso de isolados de *E. faecium* e *E. faecalis* como probiótico, pois os mesmos podem implicar em ganho de respostas imune, equilíbrio da microbiota intestinal, redução de enzimas fecais envolvidas em processos de câncer, tratamento de diarreia associado a antimicrobianos, controle de colites induzidas por Rotavírus, prevenção de úlceras causadas por *Helicobacter pilory*; redução de colesterol sérico, antagonismo a patógenos associados à contaminação de alimentos, microrganismos envolvidos em cáries dentárias, candidíase de trato urinário, além de outras atividades ainda não relatadas (Franz et al., 1999; Mercenier et al., 2002).

2.4 Resistência bacteriana

Enterococcus são intrinsecamente resistentes a uma ampla variedade de antimicrobianos e isto limita a escolha de agentes contra estes organismos. Com o aumento na prevalência mundial de *Enterococcus* envolvidos em infecções nosocomiais ocorreu um aumento do uso de antimicrobianos em hospitais (Kak & Chow, 2002). Conforme Kretsinger et al. (2003), nos Estados Unidos é comum o uso de gentamicina em certas espécies de animais, entre elas, frangos e suínos. Considerando este fator, os autores realizaram um trabalho com o objetivo de isolar estes microrganismos de carne de bovinos, suínos e aves, bem como avaliar sua resistência à gentamicina. Os autores observaram que a resistência a níveis elevados de gentamicina em *Enterococcus* sp. foi mais freqüente em isolados de frango (72%), menos em isolados de suínos (24%) e raro isolamento de carne bovina (4%).

Segundo um estudo sobre a prevalência de *Enterococcus* resistentes à vancomicina (**VRE**) na Europa, observou-se que a taxa de VRE ainda é baixa, mas considerando a alta prevalência de resistência a níveis elevados de gentamicina na Europa, *Enterococcus* podem representar um sério risco ao tratamento de pacientes com severos processos infecciosos (Schouten et al., 2000). Em outro estudo realizado em Portugal, com o objetivo de analisar a presença e a diversidade de *Enterococcus* resistentes a antimicrobianos em isolados de galinhas domésticas, os resultados obtidos foram bastante preocupantes, já que 48% dos isolados eram VRE, 34% apresentaram níveis

elevados de resistência a gentamicina e 32% a estreptomicina. A presença de resistência simultânea a vários antimicrobianos (tetraciclina, eritromicina, ciprofloxacina) foi observada em quase todos isolados (Novais et al., 2005).

Menezes et al. (2005) realizaram um estudo sobre a freqüência de *E. faecalis* isolados em urinoculturas no Hospital Geral de Fortaleza e observaram que os antimicrobianos mais susceptíveis para *E. faecalis* foram vancomicina (100%) e nitrofurantoína (100%), enquanto que os mais resistentes foram rifampicina (52%) e tetraciclina (48%). Entre amostras isoladas em hospitais do Canadá, *Enterococcus* sp. aparece em quinto lugar, representando 7,6% dos microrganismos; na Alemanha, resultados similares foram obtidos, assim como na Itália o resultado não foi muito diferente. Já na França os *Enterococcus* ocupam a sétima posição representando 3,4% dos microrganismos isolados de unidades de terapia intensiva (Jones et al., 2004).

No Brasil, um estudo foi realizado em um hospital universitário situado no estado de São Paulo sobre a incidência de microrganismos do gênero *Enterococcus*, no qual foi relatado um aumento progressivo da resistência à vancomicina nas culturas clínicas positivas para *Enterococcus* sp., durante os três anos de estudo. Em 2000, 9,5% das amostras eram VRE, em 2001 houve um aumento para 15,7% e em 2002, 15,8% de VRE foi observado. As unidades com maior número de isolados foram respectivamente: pronto-socorro (19,5%) e **UTI** geral (15%), sendo que urina (36%) e sangue (20%) apresentaram os maiores índices de contaminação. Os autores concluíram que existe a necessidade de implantação de medidas de controle mais efetivas para deter a disseminação do

VRE (Furtado et al., 2005). O primeiro caso de VRE em Porto Alegre foi notificado em 2000, em um isolado de *E. faecalis* (d'Azevedo et al., 2000).

Em Portugal, Poeta et al. (2005) investigaram a presença de *Enterococcus* resistentes a vancomicina em amostras fecais de frango que nunca receberam avoparcina como promotor de crescimento e em aves que receberam avoparcina. As amostras de *E. gallinarum* isoladas de fezes de frangos foram resistentes à vancomicina, independente do uso ou não de avoparcina como promotora de crescimento. A presença de níveis elevados de *Enterococcus* resistentes à gentamicina e quinupristina/dalfopristina foi relatada em amostras de carnes de suínos obtidos de armazéns nos Estados Unidos por McClellan et al. (2001). No estudo foram isolados um total de 569 microrganismos do gênero, os quais 78% eram *E. faecalis*, 15% *E. faecium* e 4% *E. galinarum*. Nos testes de sensibilidade, 4% dos isolados apresentaram níveis elevados de resistência a gentamicina e 78% dos *E. faecium* foram resistentes a quinupristina/dalfopristina. Esses microrganismos têm desenvolvido resistência a drogas comumente empregadas na terapêutica, seja pela aquisição de genes de resistência em plasmídeos ou transposons de outros microrganismos, ou ainda por mutações cromossômicas espontâneas (Salysers & Amábile-Cuevas, 1997; Furtado et al., 2005).

Em frangos, infecções clínicas por enterococos são raramente relatadas, contudo, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* e *E. cecorum* são ocasionalmente associados a uma variedade de patologias em aves, incluindo endocardite, septicemia, desordens do sistema nervoso central e laminite

(Cauwerts et al., 2007). No entanto, por seu potencial patogênico, *Enterococcus* sp. pode se tornar um reservatório de genes de resistência que podem ser disseminados ou transferidos a diferentes ecossistemas, e conseqüentemente, uma possível rota de transmissão de bactérias resistentes através da cadeia alimentar ou pelo contato direto com os animais (Shepard & Gilmore, 2002; Franz et al., 2003).

2.4.1 Origem genética

A maioria dos microrganismos resistentes a fármacos surge em decorrência de alterações genéticas e processos posteriores de seleção natural, resultante da exposição a agentes antimicrobianos (Salyers & Amábile-Cuevas, 1997).

2.4.2 Resistência cromossômica

Desenvolve-se em conseqüência de combinações de mutações espontâneas em diversos *loci* genéticos que codificam os alvos preferenciais dos antimicrobianos e é considerada resistência de nível reduzido ou de sensibilidade diminuída. A presença do antimicrobiano atua como mecanismo seletivo, suprimindo os mecanismos suscetíveis e permitindo o crescimento dos mutantes resistentes aos fármacos (Barreto et al., 2004). A mutação espontânea ocorre na frequência de 10^{-12} a 10^{-7} , caracterizando-se desta forma como situação pouco frequente no aparecimento de resistência farmacológica clínica em determinado paciente (Mouton, 1987).

2.4.3 Resistência extracromossômica

As bactérias em sua grande maioria contêm elementos genéticos extracromossômicos. Os fatores R são elementos genéticos intracelulares que compreendem uma classe de plasmídeos que transportam genes que codificam resistência a um ou vários agentes antimicrobianos e metais pesados. Genes plasmidiais para a resistência antimicrobiana normalmente expressam enzimas que inativam os agentes antimicrobianos por alterarem sua estrutura (Tortora et al., 2000). Os plasmídeos podem codificar enzimas que inativam o cloranfenicol (acetiltransferase), acetilam, adenilam ou fosforilam vários aminoglicosídeos, ou proteínas de membrana que bombeiam o antimicrobiano de dentro da célula bacteriana para fora, como por exemplo, o mecanismo de resistência a tetraciclina codificada pelo gene *tet(K)* e *tet(L)*, segundo Khan & Novick (1983) e Schwarz, et al. (1989).

2.5 Resistência em microrganismos do gênero *Enterococcus*

Uma importante característica deste gênero é a resistência intrínseca a muitos antimicrobianos utilizados rotineiramente no tratamento de infecções por cocos Gram positivos, tais como cefalosporinas, lincosaminas, co-trimoxazol e níveis reduzidos de penicilinas e aminoglicosídeos (Lewis & Jones, 2000; Murray, 2000; Johnston & Jaykus, 2004).

2.5.1 Resistência a β -lactâmicos

Os *Enterococcus* possuem uma resistência natural intrínseca a antimicrobianos β -lactâmicos devida à baixa afinidade de suas proteínas de ligação à penicilina. A resistência intrínseca difere entre os antimicrobianos desse grupo, com as penicilinas exercendo maior atividade frente a estes microrganismos, seguida por carbapenens e cefalosporinas. Entre as penicilinas, a ampicilina é a mais efetiva. A resistência intrínseca às cefalosporinas é tão elevada que o mesmo não pode ser empregado no tratamento de pacientes infectados com enterococos (Torres et al., 1993; Valdés et al., 1998; Kak & Chow, 2002).

O nível elevado de resistência a penicilinas é ocasionado principalmente pela superprodução de proteínas de ligação à penicilina (**PBP**) de baixa afinidade, ou ainda por mutações nas **PBP**, o que as torna menos suscetíveis à inibição pelas penicilinas. Já foram descritas linhagens de *E. faecalis* produtoras de β -lactamase codificadas pelo gene *blaZ* (Fontana et al., 1996).

2.5.2 Resistência a aminoglicosídeos

O grupo dos aminoglicosídeos inclui a gentamicina, a tobramicina, amicacina, netilmicina, canamicina, estreptomina, dibencacina e a neomicina. Esses fármacos são empregados principalmente no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram negativas, entretanto exercem efeito sinérgico com inibidores da síntese de parede celular em bactérias Gram positivas. Esses atuam

como bactericidas. Embora sejam fármacos importantes e amplamente utilizados, os mesmos são extremamente tóxicos, o que limita sua utilização. Os aminoglicosídeos exercem seu efeito bactericida por interferirem com a síntese de proteínas, pela ligação à porção 16S rRNA da subunidade ribossomal 30S (Hernández, 1998).

Estes microrganismos caracterizam-se por apresentarem resistência intrínseca a níveis reduzidos de aminoglicosídeos, através de um mecanismo que dificulta o transporte da droga através da membrana celular. Aminoglicosídeos não são efetivos como monoterapia contra *Enterococcus*. Entretanto, quando associados com agentes como penicilinas ou glicopeptídeos ocorre um aumento da concentração intracelular deste agente, causando a morte do microrganismo, resultante de uma ação sinérgica. A principal forma de resistência a este agente se deve à aquisição de genes de resistência que codificam enzimas modificadoras de aminoglicosídeos que podem ser fosfotransferases (fosforilam a molécula de aminoglicosídeo a partir de **ATP**), acetiltransferases (acetilam a molécula a partir de acetil-CoA) ou nucleotidiltransferases (adiciona molécula de adenina, também proveniente de **ATP**). Frequentemente, isolados clínicos de *Enterococcus* que apresentam níveis elevados de resistência a aminoglicosídeos possuem genes de resistência a esses antimicrobianos, como o *ant (6)-Ia* e o *ant (3'')-Ia* que codifica uma nucleotidiltransferase que modifica a estrutura deste antimicrobiano, ou ainda através de mudanças na subunidade ribossomal 30S que diminui a capacidade de ligação do antimicrobiano (Krogstad et al., 1978; Hernández,1998; Mingeot-Leclercq et al., 1999; Chow et al., 2000).

2.5.3 Resistência a glicopeptídeos

Pertencem a este grupo vancomicina e teicoplanina. Esses antimicrobianos exercem seus efeitos por inibirem a síntese da parede celular de bactérias sensíveis através de sua ligação de alta afinidade à extremidade terminal D-alanil-D-alanina de unidades precursoras da parede celular. São empregados no tratamento de infecções severas causadas por microrganismos Gram positivos (Bugg et al., 1991; Piñera et al., 1998). Cepas de **VRE**, principalmente *E. faecium*, surgiram como importantes patógenos nosocomiais em hospitais nos Estados Unidos. Tipicamente, estas cepas são resistentes a múltiplos antimicrobianos incluindo estreptomicina, gentamicina e ampicilina. A resistência à estreptomicina e gentamicina causa preocupação especial, visto que a combinação de um aminoglicosídeo a um inibidor de síntese de parede celular constitui o único esquema bactericida confiável para o tratamento de endocardite enterocócica. A resistência à vancomicina nesse gênero resulta de uma alteração de D-alanil-D-alanina em D-alanil-D-lactato ou D-alanil-D-serina, que apresentam baixa afinidade com a vancomicina, devido à ausência de um local crítico para a ponte de hidrogênio (Fines et al., 1999; Pootoolal et al., 2002; Lazo et al., 2006).

Teicoplanina se mostra ativa apenas contra bactérias Gram positivas. Trata-se de um bactericida confiável contra isolados sensíveis, exceto contra isolados de *Enterococcus*. Mecanismos de resistência à teicoplanina não foram elucidados, entretanto a presença do gene *vanA* codifica resistência a ambos, teicoplanina e vancomicina (Piñera et al., 1998; Lazo et al., 2006). Foram descritos

seis fenótipos de resistência, sendo cinco deles conhecidos por serem adquiridos (VanA, VanB, VanD, VanE e VanG), enquanto que um (VanC), é uma propriedade intrínseca de *Enterococcus* móveis (*E. casseliflavus* e *E. gallinarum*) (Kak & Chow, 2002; Teixeira & Facklam, 2003; Khan et al., 2005).

O gene *vanA* codifica uma resistência de níveis elevados a vancomicina (MIC \geq 64 μ g/mL) e teicoplanina (MIC \geq 16 μ g/mL) e é normalmente adquirido através do transposon Tn1546 ou membros da família relacionados como Tn3 (Arthur *et al.*, 1993). O gene *vanB* induz níveis variados de resistência à vancomicina (MIC 4-1000 μ g/mL), entretanto não induz resistência a teicoplanina encontra-se localizado normalmente no cromossomo bacteriano, mas também pode ser carregado por plasmídeos (Bugg et al., 1991; Pootoolal et al., 2002; Franz et al., 2003).

O gene *vanD* induz um nível moderado de resistência a vancomicina (MIC 64-128 μ g/mL) e teicoplanina (MIC 4-64 μ g/mL) e apresenta-se localizado no cromossomo (Casadewall & Courvalin, 1999). Os determinantes *vanE* e *vanG* codificam um nível reduzido de resistência a vancomicina (MIC <16 μ g/mL) e acredita-se que sejam adquiridos e induzíveis (Fines et al., 1999; McKessar et al., 2000).

2.5.4 Resistência à tetraciclina

A resistência à tetraciclina é um dos fenótipos de resistência adquirida mais observada em *Enterococcus* isolados de alimentos. Esse antimicrobiano é muito empregado na agricultura e piscicultura, principalmente como promotor de

crescimento em países europeus (Huys et al., 2004). Em humanos, possui amplo emprego em infecções do trato urogenital, doenças periodontais e tratamento da acne. Tetraciclina tem sido particularmente útil para a terapia de pacientes ambulatoriais por ser uma droga relativamente barata e que pode ser administrada oralmente (Speer et al., 1992). Dentre os isolados clínicos de *Enterococcus* cerca de 65% apresentam-se resistentes a este antimicrobiano (Roberts et al., 2003).

A tetraciclina é um bacteriostático de amplo espectro, com atividade contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, riquetsias, micoplasmas, clamídias, espiroquetas, borrelias, actinomicetos, legionelas e algumas micobactérias (Goodman & Gilman, 2003). Essa droga age inibindo a síntese de proteínas, bloqueando a união do RNA transportador (**tRNA**) ao complexo ribossômico de RNA mensageiro (**mRNA**). A união reversível se produz na subunidade ribossômica 30S dos microrganismos sensíveis (Speer et al., 1992).

Diversos análogos de tetraciclina estão atualmente disponíveis no Brasil para uso oral; o cloridrato e o fosfato de tetraciclina, a oxitetraciclina, a doxiciclina e a minociclina. A eficácia dos diversos análogos da tetraciclina é em geral similar, desde que utilizados em doses adequadas (Silva, 1998). O mecanismo de resistência a este antimicrobiano é resultante de três estratégias empregadas pelas bactérias: i) limitação do acesso da droga ao seu alvo pelo efluxo da droga através da membrana celular; ii) alteração ribossomal que dificulta uma ligação efetiva da droga ao seu respectivo alvo e; iii) produção de enzimas de inativação da tetraciclina (Tortora et al., 2000).

Até o momento foram identificadas sete classes de genes envolvidos na

resistência codificada por proteínas transmembrana responsáveis pelo efluxo da droga através da membrana celular. Classes de A até E são encontradas entre membros da família *Enterobacteriaceae* e do gênero *Haemophilus*, *Vibrio*, *Aeromonas* e *Moraxella* estando presente em plasmídeos. Classe K e L têm sido encontradas em bactérias Gram positivas como microrganismos pertencentes aos gêneros *Enterococcus*, *Staphylococcus* e *Streptococcus*, estando localizados principalmente em plasmídeos (Bismuth et al., 1990).

Existem três classes de genes que codificam resistência pela ligação de proteínas ao ribossomo e alteração de sua conformação, prevenindo a ligação da tetraciclina no ribossomo: *tet(M)* (mais comum, cromossomal e presente em *Tn916* e plasmídeos conjugativos), *tet(O)* e *tet(S)* (Zhanel et al., 2004).

O terceiro tipo de resistência à tetraciclina é dado pela produção de enzimas inativadoras de tetraciclina. Esse gene foi identificado em *E. coli* e *Bacteriodes spp.*, sendo designado por *tet(X)*, estando presente principalmente em plasmídeos, entretanto seu significado clínico ainda não está claro (Speer et al., 1992). Mais recentemente, a presença de genes transferíveis *tet(M)* e *tet(L)* foram identificadas em amostras de *Enterococcus* sp. isoladas de carcaças de frangos (Frazzon et al., 2009).

2.5.5 Resistência ao cloranfenicol

O cloranfenicol possui amplo espectro de atividade antimicrobiana. Atua primariamente através de sua ligação reversível à subunidade ribossômica 50S. Devido ao nível elevado de cepas enterocócicas resistentes, alguns hospitais têm

empregado o cloranfenicol como alternativa no tratamento desses processos infecciosos, entretanto cerca de 50% das linhagens pertencentes a este gênero são resistentes. Pode atuar também nas mitocôndrias de mamíferos, o que dificulta sua utilização pela elevada toxicidade, representada pelo alto índice de discrasias sanguíneas. Na maioria dos *Enterococcus* a resistência é mediada pela presença do gene *cat* que pode ser encontrado no cromossomo, bem como em plasmídeos, o qual codifica uma enzima acetiltransferase, que tem função de alterar a estrutura da droga, fazendo com que esta perca a capacidade de ligação à porção ribossomal (Trieu-Cuot et al., 1993; Lazo et al., 2006).

2.5.6 Resistência a macrolídeos

Dentro deste grupo merecem especial atenção eritromicina, claritomicina, clindamicina, roxitromicina e azitromicina. São antimicrobianos bacteriostáticos que inibem a síntese de proteínas através de sua ligação reversível às subunidades ribossômicas 50S de microrganismos sensíveis. O principal mecanismo de resistência aos macrolídeos presente entre *Enterococcus* é a alteração do sítio de ligação, conferida por uma enzima que metila um resíduo de adenina na porção 23S da subunidade 50S do RNA ribossomal, o que resulta numa dificuldade na ligação do antimicrobiano ao ribossomo. Esse mecanismo é usualmente mediado pelo gene *erm(B)* e raramente pelo gene *erm(A)*. O gene *mef(A)* codifica uma proteína de efluxo que expulsa os macrolídeos da célula. Esse gene parece estar localizado num elemento conjugativo e determinam níveis de resistência à eritromicina mais reduzidos do que aqueles mediados pelo gene

erm(B) (Piñera et al., 1998; Roberts et al., 1999; Lazo et al., 2006). Evidências da disseminação de resistência à eritromicina têm sido mostradas em *Enterococcus* sp. isolados de suínos, frangos e humanos (De Leener, et al., 2004).

2.5.7 Resistência a quinolonas

A primeira quinolona descrita foi o ácido nalidíxico, empregado amplamente no tratamento de infecções urinárias. Depois foram introduzidos a este grupo mais quatro quinolonas fluoradas, como ciprofloxacino, moxifloxacino, norfloxacino e gatifloxacino. Até o momento já existem mais de 20 quinolonas descritas. Esses antimicrobianos possuem como alvo a DNA-girase e a topoisomerase IV bacterianas. Para muitas bactérias Gram positivas, a topoisomerase IV é a principal atividade inibida pelas quinolonas. Em contrapartida, para bactérias Gram negativas o principal alvo das quinolonas é a DNA girase (Lazo et al., 2006).

A atividade da ciprofloxacina contra *Enterococcus* é moderada e a resistência nestes microrganismos a este antimicrobiano é bastante comum. Algumas fluorquinolonas (moxifloxacino e gatifloxacino) se mostram bastante efetivas *in vitro* contra bactérias do gênero *Enterococcus*, entretanto isolados resistentes a ciprofloxacino são normalmente resistentes a moxifloxacino e gatifloxacino. A resistência a quinolonas em *Enterococcus* não está bem esclarecida, quando comparado com os mecanismos de resistência em *Staphylococcus* e *Pneumococcus*. O mecanismo de resistência ocorre basicamente por mutações nas regiões *parC* e *gyrA* do **DNA** bacteriano (Kolar et

al., 2006; Lazo et al., 2006).

2.5.8 Resistência a estreptograminas

Pertencem ao grupo macrolídeos-lincosaminas-estreptograminas. A família das estreptograminas compreende micamicinas, pristinamicinas, oestreomicinas, virginiamicinas. Pristinamicinas tópicas e orais vêm sendo empregadas na França há um longo período no tratamento de infecções por bactérias do gênero *Staphylococcus* (Barriere et al., 1992). Essas drogas atuam inibindo a síntese de proteínas por interferir com a subunidade 50S do ribossomo bacteriano. As pristinamicinas deram origem aos derivados semi-sintéticos dalfopristin e quinupristin (Witte, 2000).

Devido à presença de níveis elevados de resistência a antimicrobianos, tem-se buscado o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, como quinupristina-dalfopristina. Essa associação atua de modo sinérgico e é normalmente bactericida, ao contrário de quando os mesmos são usados isoladamente ou comparados a antimicrobianos similares pertencentes ao grupo dos macrolídeos. Os principais alvos desse grupo são os microrganismos resistentes e que possuem opções terapêuticas limitadas. Entretanto, algum tempo após a aprovação destes dois medicamentos, microrganismos resistentes começaram a ser encontrados (Hershberger et al., 2003; Goodman & Gilman, 2003). Em geral, tem sido relatado que quinupristina/dalfopristina apresenta atividade inibitória contra *E. faecium*, incluindo os **VRE** que são resistentes a outros agentes clinicamente disponíveis. No entanto, dois genes já foram

descobertos em *E. faecium* como sendo responsáveis pela resistência a quinopristina/dalfopristina: *vanD* e *vanE*. *E. faecalis* é resistente à associação destas drogas devido à expressão do gene *Isa* ou por possuírem o gene *vanE* (Hershberger et al., 2003).

2.6 Indústria Avícola

A produção mundial de carne de frango tem como principais países produtores os Estados Unidos e China, com taxas de aproximadamente 15 e 9 milhões de toneladas de carne produzidas por ano, respectivamente (USDA, 2006). No que se refere à exportação de carne de frango, o Brasil lidera o *ranking*, tendo um aumento substancial da taxa de exportação na última década, com índices que variaram entre 900 mil e 3,2 milhões de toneladas de carne. No último biênio (2008-2009), o volume das exportações de carne de frango atingiu o volume de 3,6 milhões de toneladas, totalizando uma receita cambial de 6,5 bilhões de dólares. Os últimos dados correntes mostram que no período de janeiro a junho de 2008, os embarques somaram 1,8 milhão de toneladas, totalizando um acumulado de 3,3 bilhões de dólares, um crescimento de 19% no volume e 57% no valor em relação a 2007. No ano de 2009, a região Sul do Brasil obteve os maiores índices de exportações no setor, abrangendo 74,6% do total de exportações de carne de frango no país (ABEF, 2007).

Com o aumento do consumo da carne de frango e seus derivados, e conseqüentemente, aumento da produção aviária no mundo, inúmeras doenças

causadas por microrganismos surgiram devido à elevada densidade de frangos nos aviários. Em decorrência deste fato, modernas tecnologias de produção avícola têm implicado numa utilização cada vez maior do uso de substâncias químicas (antimicrobianos) durante todas as fases de produção (Palermo, 2001).

2.7 Antimicrobianos na ração de frangos de corte

O uso de antimicrobianos como promotores de crescimento na produção animal foi universal, tendo como objetivo a prevenção de doenças e o aumento da produtividade em aves confinadas (Davies & Roberts, 1999; Garcia et al., 2002). Antimicrobianos como promotores de crescimento são conhecidos por inibirem populações microbianas indesejadas, selecionar bactérias benéficas e efeitos negativos de metabólitos (Anderson et al., 1999; Collier et al., 2003). Uma ampla diversidade de antimicrobianos pode ser administrada oralmente em vários níveis subterapêuticos (Schwarz et al., 2001).

Fatores como a composição da dieta e fatores físicos, imunológicos e respostas fisiológicas ao estresse e patógenos, e aditivos, exercem um papel significativo na dinâmica da microbiota animal (Apajalahti et al., 2001). Entretanto, os antimicrobianos empregados como promotores exercem também uma pressão seletiva que favorece a seleção de microrganismos patogênicos e comensais resistentes, tornando os animais um grande reservatório de bactérias resistentes e de genes de resistência (Bager et al., 1997).

Durante o período de uso de antimicrobianos como promotores de crescimento, houve um aumento no número de *Enterococcus* resistentes a vários

agentes antimicrobianos, incluindo vancomicina, gentamicina e estreptograminas isolados de alimentos (Giraffa et al., 2000; Simjee et al., 2002; Donabedian et al., 2006). Uma preocupação crescente sobre a seleção de resistência através do uso de análogos de antimicrobianos humanos como promotores de crescimento em animais levou a União Européia a banir o uso de todos antimicrobianos como aditivos alimentares (Hammerum et al., 1998). Seu uso está proibido em toda a produção até os dias atuais.

No Brasil, que se classifica como um dos líderes entre os países exportadores de alimentos (USDA, 2006), vários esforços institucionais para garantir a segurança alimentar, têm sido realizados, como o programa nacional de monitoramento de resistência antibiótica de *Salmonella* e *Enterococcus* em carcaças de frangos, coordenado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Brasil, 2006). Esses programas são importantes para avaliações de risco, atualmente um pré-requisito para o comércio internacional de produtos alimentares (Singer et al., 2007).

A presença de microrganismos resistentes em animais produtores de alimentos e a possível contaminação de sua carcaça são aspectos importantes em termos de sanidade animal e de saúde pública (Moreno et al., 2006). Como consequência dessa pressão seletiva dentro da produção avícola, um amplo espectro de bactérias resistentes e genes de resistência têm sido formados e há uma preocupação generalizada sobre o potencial de infiltração desses determinantes de resistência em patógenos humanos (Singer et al., 2003). Giraffa

(2002) e Saavedra et al. (2003), relataram que *Enterococcus* isolados de alimentos foram resistentes a antimicrobianos e apresentaram genes de virulência.

2.8 Probióticos e óleos essenciais na ração de frangos de corte

Restrições para o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento nos últimos anos têm levado a busca de alternativas como a seleção de microrganismos probióticos, prebióticos, óleos essenciais e imunostimuladores (Mountzouris et al., 2007). Probióticos têm sido definidos como suplementos alimentares a base de microrganismos vivos, que exercem efeitos benéficos ao hospedeiro, por aumento do balanço microbiano intestinal (Fuller, 1989).

Promovendo a exclusão competitiva mais efetivamente, são compostos por culturas únicas ou mistas de microrganismos. As principais bactérias empregadas como probióticos para frangos pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Enterococcus* (Jin et al. 1998; Mountzouris et al. 2007). São preferencialmente isolados da microbiota gastrointestinal de espécies de interesse. Sensibilidade a antimicrobianos, produção de substâncias inibitórias e parede celular hidrofóbica são propriedades desejáveis para uso probiótico (Souza et al., 2007).

Outros produtos, como ácidos orgânicos e alimentos que induzem a formação de lecitinas e peptídeos, também têm sido propostos como alternativas à utilização de antimicrobianos promotores de crescimento (Thomke & Elwinger, 1998). Muitos estudos têm demonstrado o efeito antimicrobiano *in vitro* de muitas plantas, devido a seus componentes bioativos. Uma categoria de aditivos

alimentares relativamente nova é a mistura de óleos essenciais específicos. Esses produtos são misturas de compostos fitoquímicos, como o carvacrol e o timol, com propriedades antimicrobianas seletivas (Lee et al., 2004).

Alguns óleos essenciais específicos têm demonstrado resultados promissores em relação à redução da colonização e proliferação de *Clostridium perfringens*, controle de infecções por coccídios e, conseqüentemente, podem ajudar na redução de enterite necrótica (Gianennas et al., 2003; Saini et al., 2003; Mitsch et al., 2004). Outros autores também relataram que a adição de óleos essenciais na ração demonstrou que seus metabólitos secundários têm atividade antimicrobiana, antiinflamatória, antioxidante e coccidiostática (Kamel, 2000; Manzanilla et al., 2004; Silva et al., 2009).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras

Frangos de corte pertencentes ao Departamento de Zootecnia da UFRGS, foram utilizados para as coletas de amostras do trabalho. No mês de julho de 2008, tais aves, com aproximadamente 45 dias de idade, foram divididas em oito grupos e separadas em gaiolas de acordo com a dieta empregada (Tabela 1). Foram colhidas 48 amostras de “swabs” cloacais destes frangos de corte, sendo seis animais amostrados por cada grupo de dieta.

As dietas fornecidas às aves foram balanceadas e baseadas em uma mistura de milho, farelo de soja, óleo vegetal, minerais e vitaminas e suplementadas ou não com promotor de crescimento (dissalciato metileno de bacitracina), aditivos (óleos essenciais) ou probióticos (*Enterococcus faecium*).

As aves dos Grupos 2, 4 e 6 receberam 100 ppm do coccidiostático ionóforo (monensina) desde o primeiro dia de vida. Por via intra-esofágica, aos 14 dias de idade, todas as aves, com exceção do grupo controle (Grupo 8), foram administradas uma solução contendo 500.000 oocistos de *Eimeria acervulina* e 30.000 oocistos de *Eimeria maxima*. Os ensaios foram realizados em três repetições diferentes simultaneamente. As exigências nutricionais das aves foram

atendidas de acordo com indicações das tabelas gerais de Rostagno (2005). A água foi fornecida *ad libitum*.

TABELA 1. Grupos e dietas empregadas para os frangos de acordo com incremento (promotor de crescimento, probióticos, aditivos e coccidiostático ionóforo) utilizadas no presente estudo.

Grupos	Dietas
1	Sem coccidiostático ionóforo ¹
2	Com coccidiostático ionóforo ¹
3	Probiótico ² e sem coccidiostático ionóforo ¹
4	Probiótico ² e com coccidiostático ionóforo ¹
5	Aditivo ³ e sem coccidiostático ionóforo ¹
6	Aditivo ³ e com coccidiostático ionóforo ¹
7	Promotor de crescimento ⁴ e sem coccidiostático ionóforo ¹
8*	Com coccidiostático ionóforo ¹

*Aves que não foram inoculadas com *Eimerias* (controle negativo);

¹Monensina; ²*Enterococcus faecium*; ³Óleos Essenciais; ⁴Antimicrobiano bacitracina.

3.2 Isolamento e identificação fenotípica das isolados de *Enterococcus* sp.

Os “swabs” cloacais foram inoculados em caldo azida (Himedia, Mumbai, Índia) por 24 horas à temperatura de 36°C. Após, 100µl do caldo foram semeados em placas contendo meio ágar infusão de cérebro e coração (**BHI**) (Himedia, Mumbai, Índia) acrescidos de 6,5% de NaCl e incubadas nas mesmas condições anteriores. As colônias presentes no meio de cultura foram

selecionadas aleatoriamente e re-isoladas em meio ágar BHI. As colônias identificadas fenotipicamente como cocos Gram positivos através de coloração, crescimento em 6,5% de NaCl, hidrólise da esculina e catalase negativa foram caracterizadas como membros do gênero *Enterococcus* (Facklam & Collins, 1989).

Para os testes moleculares, os isolados foram crescidos em ágar BHI (36°C/24h) e o DNA genômico foi extraído pelo método de lise térmica, onde uma colônia da amostra foi colocada em um criotubo com 100µL de água MiliQ estéril e submetido à fervura a 100°C por 10 minutos. Após esse período, as amostras foram submetidas a uma centrifugação por 10 minutos a 13000 x g em microcentrífuga (Eppendorf Minispin). Após a centrifugação, 1µL do sobrenadante foi retirado e submetido à reação de PCR.

3.3 Confirmação molecular de gênero *Enterococcus*

Os isolados de *Enterococcus* sp. provenientes dos “swabs” cloacais foram confirmados genotipicamente para o gênero *Enterococcus* pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) seguindo o protocolo para amplificação do gene *tuf* (Tabela 2). As reações de amplificação foram realizadas com um volume final de 25µl contendo 1µl de DNA genômico de *Enterococcus*; 10µM de cada oligonucleotídeo iniciador; 200µM de dNTPs; 1U de *Taq* DNA Polimerase; 1,5µM de MgCl₂; tampão de reação 10X e água MiliQ. Nos controles negativos foram incluídos todos os reagentes, exceto o DNA genômico.

As condições de amplificação das reações consistiram em uma desnaturação inicial de 95°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos; temperatura de anelamento (Tabela 2) por 30 segundos; 72°C por 1 minuto, e extensão final de 72°C por 7 minutos. O produto da amplificação, um fragmento de DNA de 112 pares de base (pb) foi visualizado em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio (0,5 µg ml⁻¹) e observado sob luz ultravioleta (UV).

3.4 Testes bioquímicos para identificação de espécies de *Enterococcus*

A caracterização das espécies foi realizada através dos testes bioquímicos descritos por Devriese (1993). Os testes consistem da utilização dos açúcares L-arabinose (ARA), rafinose (RAF), sorbitol (SBL), sorbose (SOR), manitol (MAN) na concentração 1%, no com a produção de ácido, crescimento em Metil-α-D-glicopiranosida (MGP), piruvato (PIR), NaCl 6,5% e hidrólise de arginina (ARG).

Os isolados foram crescidos em meio ágar BHI. Culturas com 24 horas de crescimento à 36°C foram diluídas em solução salina 0,9% até atingir a escala 0,5 de McFarland. Três gotas desta solução foram inoculadas nos açúcares em tubos de ensaio e observadas durante 7 dias consecutivos sendo a leitura realizada a cada 24 horas a partir da inoculação.

3.5 PCR-RFLP para confirmação das espécies *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*

Os isolados classificados bioquimicamente como *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* foram confirmados para a espécie pela técnica de PCR-RFLP, utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos da região ribossômica 16S rDNA de *Enterococcus* (Tabela 2), como descrito por Medeiros et al. (2010).

O produto amplificado foi um fragmento de 661pb que foi submetido à digestão enzimática com a enzima de restrição *Hin*I seguindo as especificações descrita pelos fornecedores. Os fragmentos foram resolvidos em gel de agarose 2% por 2 horas.

3.6 Teste de suscetibilidade a antimicrobianos

Todos os isolados, independente da dieta empregada, foram submetidos a teste de suscetibilidade a antimicrobianos pelo método de Kirby-Bauer (método de difusão de disco antimicrobiano em ágar Muller Hinton).

Os isolados a serem testados foram semeados em meio agar BHI a temperatura de 36°C por 24 horas e colônias provenientes da cultura foram diluídas em solução salina 0,9% na escala 0,5 de McFarland. A solução contendo as bactérias foi inoculada sobre o meio de cultura com auxílio de “swab”. Após, prosseguiu-se a colocação de discos de papel impregnados com concentrações conhecidas de diferentes antimicrobianos: ampicilina, penicilina, eritromicina,

cloranfenicol, nitrofurantoína, ciprofloxacina, bacitracina, vancomicina, rifampicina e tetraciclina.

O antimicrobiano difundiu-se de forma radial na superfície do ágar e sua leitura foi realizada após 18-24 horas de incubação à 36°C à partir do diâmetro de inibição formado ao redor do disco. Os isolados foram classificados como sensíveis, de resistência intermediária, ou resistentes, de acordo com tabelas elaboradas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008).

3.7 Detecção de genes de resistência antimicrobiana

O DNA genômico de *Enterococcus* foi extraído utilizando-se o método de lise térmica. A presença dos genes *tet(M)* e *tet(L)* e do gene *erm(B)* foram pesquisados utilizando-se PCR em todos os 240 isolados de *Enterococcus*. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados estão descritos na Tabela 2.

Todas as amplificações de PCR foram realizadas com um volume final de 25µl contendo 1µl de DNA genômico de *Enterococcus*; 10µM de cada oligonucleotídeo iniciador; 200µM de dNTPs; 1U de *Taq* DNA Polimerase; 1,5µM de MgCl₂; tampão de reação 10X e água MiliQ. Nos controles negativos foram incluídos todos os reagentes, exceto o DNA genômico.

TABELA 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de PCR dos genes *tuf*, 16sRNA, *tet(M)*, *tet(L)* e *erm(B)*.

Genes	Oligonucleotídeos iniciadores (5'-3')	Tamanho do amplicon (pb)*	Temperatura de anelamento (°C)	Referências
<i>tuf</i>	TACTGACAAACCATTCATGATG AACTTCGTCACCAACGCGAAC	112	54	Ke et al., 1999
16sRNA	CTGACGCTGAGGCTCGAAAGCG GTGACGGGCGGTGTACAAGGC	661	53	Medeiros et al., 2010
<i>tet(M)</i>	GTGGACAAAGGTACAACGAG CGGTAAAGTTCGTCACACAC	406	54	Ng et al., 2001
<i>tet(L)</i>	ATAAATTGTTTCGGGTCGGTAAT AACCAGCCAACTAATGACAAGT	625	58	Frazzon et al., 2009
<i>erm(B)</i>	GAAAAGA/GTACTCAACCAAATA AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC	640	57	Sutcliffe et al., 1996

*pb: pares de bases

As condições de amplificação dos oligonucleotídeos iniciadores *tet(M)* e *tet(L)* consistiram em uma desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos; 30 ciclos 94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento (Tabela 2), 72°C por 1 minuto; e extensão final a 72°C por 5 minutos. Para amplificação do gene *erm(B)* foram utilizadas as seguintes condições: desnaturação inicial de 93°C por 3 minutos; seguido de 35 ciclos de 93°C por 1 minuto, temperatura de anelamento (Tabela 2), e 72°C por 1 minuto; com extensão final de 72°C por 5 minutos. Todos os produtos de PCR foram analisados por eletroforese de gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídeo ($0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$), observado sobre transiluminador com luz ultravioleta e fotografados por Kodak Digital Science TM DC120.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento e identificação fenotípica e genotípica de *Enterococcus* sp.

Um total de 240 *Enterococcus* foram isolados de “swabs” cloacais de frangos de corte, identificados bioquimicamente e todos confirmados para gênero pela técnica de PCR e pesquisa do gene *tuf*. A figura 1 mostra a distribuição das espécies identificadas.

Enterococcus faecalis foi a espécie que apresentou maior prevalência 39,6% (96/240) seguida por 12,1% *E. faecium* (25/240), 11,25% *E. casseliflavus/gallinarum* (38/240) e 11,25% *E. mundtii* (26/240). As demais espécies representam 27,08% dos isolados que foram identificados como *E. columbae* (14/240), *E. pseudoavium* (8/240), *E. saccharolyticus* (3/240), *E. avium* (3/240), *E. hirae* (2/240), *E. durans* (2/240), *E. cecorum* (2/240), *E. sulfureus* (2/240), *E. asini* (1/240), *E. malodoratus* (1/240), *E. raffinosus* (1/240) e *Enterococcus* sp. (16/240).

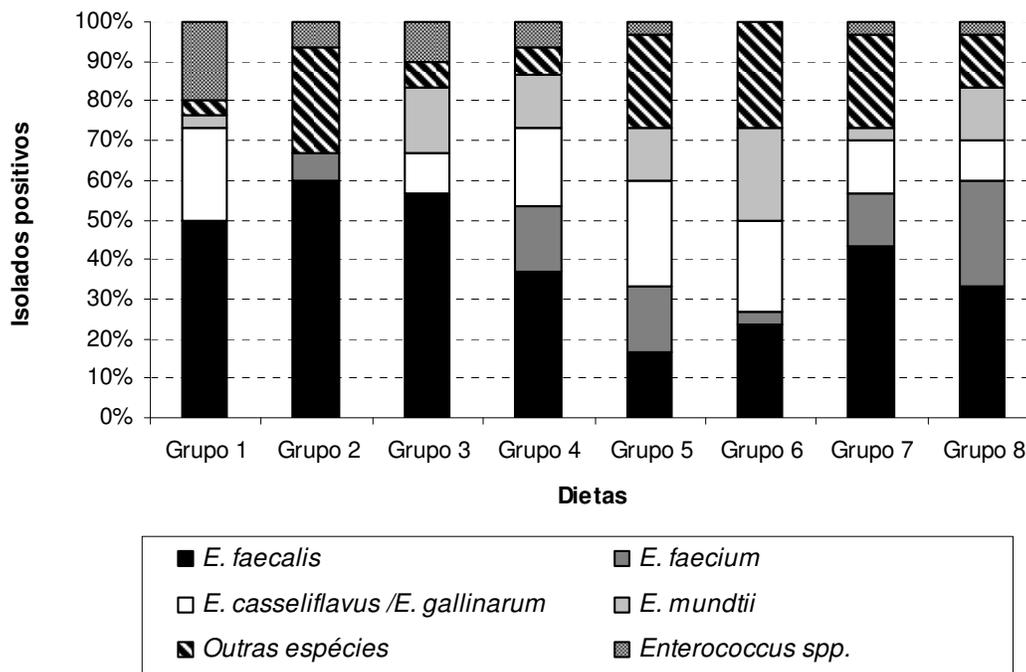


FIGURA 1. Espécies de *Enterococcus* isoladas de “swabs” cloacais de frangos de corte submetidos a diferentes dietas e identificadas através de testes bioquímicos e moleculares.

Em humanos e outros animais, *E. faecalis* e *E. faecium* são as espécies mais frequentemente encontradas, sendo a primeira com maior frequência que a última. Em frangos, a presença dessas espécies varia de acordo com a idade, sendo que nos primeiros dias de vida estas são as espécies mais observadas, e com a maturidade dos frangos, ocorre primeiramente o declínio de *E. faecium*, seguido por *E. faecalis*, permitindo o crescimento das outras espécies como *E. cecorum* (Devriese et al., 2006). Alguns autores ressaltam a alta prevalência de isolados de *E. faecium* e *E. faecalis* em produtos de origem animal. Na produção de animais como aves, bovinos e suínos, *E. faecium* é a espécie mais comumente isolada, seguido de *E. faecalis* e *E. cecorum* (Gomes et al., 2008; Riboldi et al.,

2008). Uma elevada prevalência de espécies como *E. casseliflavus* foi observada no presente estudo. Embora isolados de *E. casseliflavus* sejam originalmente típicos de plantas, essa espécie já foi isolada de alimentos (Gomes et al., 2008; Riboldi et al., 2008). Estas espécies também foram isoladas de produtos lácteos e vegetais, além de produtos cárneos e vegetais minimamente processados (Franzetti et al., 2004, Gomes et al., 2008). Isso demonstra uma grande diversidade na ecologia do gênero *Enterococcus* (Klein, 2003).

Nesse estudo, 16 dos 240 isolados (6,6%) não puderam ser identificados em nível de espécie. Resultados similares foram obtidos por Hayes et al. (2003), onde amostras de *Enterococcus* sp. isoladas de frangos não puderam ser identificadas. Devriese et al. (1993) descreveram que *E. faecium* isolados de humanos e de frangos diferem na fermentação de açúcares, condição que pode dificultar a sua identificação.

4.2 Prevalência das espécies de *Enterococcus* em relação às dietas

De acordo com as dietas empregadas nos frangos, observou-se uma alteração na composição ou no número de espécies de *Enterococcus* isoladas quando comparados com o controle (Grupo 8), como demonstrado na Figura 1. Nos Grupos 1, 2 e 3 foi observada uma alteração na composição das espécies. Nos Grupos 1 e 3, nos quais as aves não receberam coccidiostáticos na ração não foi detectada a presença da espécie *E. faecium*.

As infecções por coccídios causam uma diarreia sanguinolenta que leva a um desequilíbrio microbiano definido como disbacteriose. Este desequilíbrio pode levar a uma alteração no número ou composição das bactérias intestinais não-patogênicas. Foi observado por Fukata et al. (1987) que frangos infectados com *Eimeria tenella* apresentaram uma maior prevalência das bactérias *Lactobacillus acidophilus* do que os que os frangos que não foram infectados com *E. tenella*.

Por outro lado, no Grupo 2, onde os animais só receberam coccidiostáticos não foi observada presença das espécies *E. gallinarum/casseliflavus* e *E. munditti*. Frangos tratados com coccidiostáticos têm um menor índice de diarreias causadas por espécies de *Eimerias*, fato que pode ter determinado a alteração na composição dos *Enterococcus* isolados no intestino desses animais.

Nos Grupos 4, 5, 6 e 7 foi observada uma alteração no número das espécies isoladas. Nos animais do Grupo 4, que receberam probióticos e coccidiostático na dieta, foi observado uma diminuição em relação ao grupo controle, referente ao número de *E. faecium* e um aumento de *E. gallinarum/casseliflavus*. A presença do probiótico neste grupo pode ter auxiliado na manutenção das espécies de *Enterococcus*, pois microrganismos utilizados com essa função devem possuir certas propriedades, como por exemplo, a exclusão competitiva e colonização do trato intestinal que proporciona a multiplicação da bactéria no trato intestinal, exclusão competitiva de patógenos e estímulo à microbiota benéfica (Santos & Turnes, 2005).

Nos Grupos 5 e 6, nos quais as dietas foram suplementadas com óleos essenciais e as aves receberam ou não coccidiostático, observou-se uma distribuição muito semelhante das espécies nesses grupos, com uma diminuição na prevalência das espécies *E. faecalis* e *E. faecium* em ambos os grupos. A presença somente de óleo essencial na dieta das aves do Grupo 5, pode ter tido um efeito coccidiostático, devido à diminuição no número dessas espécies comumente isoladas. O efeito coccidiostático do óleo promove a eliminação de *Eimeria*, permitindo o crescimento de espécies de bactérias do gênero *Enterococcus* por exclusão da competição por nutrientes no organismo animal entre esses microrganismos. *Giannenas et al. (2003)*, observaram que óleos essenciais do orégano tinham um efeito coccidiostático sobre *E. tenella*. Em outro estudo, frangos alimentados com timol e carvacol e infectados com *Eimeria acervulina* apresentaram melhora na integridade intestinal das aves (*Ibrir et al., 2001*).

No Grupo 7, onde a ração dos frangos foi suplementada somente com antimicrobiano, houve uma diminuição na prevalência de *E. faecium* e *E. munditti* e um aumento na população de *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*. Já foi observado que frangos alimentados somente com promotor de crescimento e sem coccidiostático apresentavam uma maior relação vilo:cripta em comparação com os frangos do controle negativo (*Silva et al., 2009*), fato que pode influenciar positivamente a absorção e a ação dos antimicrobianos, regulando o equilíbrio microbiano, controlando as infecções subclínicas e potencializando a absorção de nutrientes.

4.3 Confirmação molecular das espécies *Enterococcus gallinarum* e *Enterococcus casseliflavus* por PCR-RFLP

Dos 39 isolados identificados bioquimicamente como *E. casseliflavus* e *E. gallinarum*, 37 confirmaram pertencer às respectivas espécies pela técnica de PCR-RFLP. Os outros dois isolados, não apresentaram perfil de digestão enzimática esperado para as espécies e foram classificados como *Enterococcus* sp. Os produtos de amplificação classificados como *E. casseliflavus* e *E. gallinarum* possuem um sítio de restrição para a enzima *Hinfi*, onde dois fragmentos de 590 e 70bp são formados. As demais espécies de *Enterococcus* possuem dois sítios de restrição para *Hinfi*, o que torna possível a diferenciação das duas espécies citadas para com as demais, onde seus produtos de digestão apresentam três fragmentos de 570, 70 e 20bp., respectivamente.

Todas as seqüências de DNA depositadas da região 16S rDNA no GenBank do NCBI para *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* apresentam uma timina (T) conservada na posição 1248, enquanto as outras espécies de *Enterococcus* tem uma cisteína (C) ou T predominante na mesma posição. Uma única base conservada nessa posição em *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* elimina o sítio de restrição para *Hinfi*. A identificação correta dessas espécies possui grande importância, pois *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* apresentam resistência intrínseca à vancomicina. A correta identificação é importante a fim de distinguir entre resistência intrínseca e adquirida à vancomicina.

4.4 Perfil de resistência a antimicrobianos

Todos os 240 isolados no ensaio de antibiograma foram susceptíveis à ampicilina, 98% apresentaram-se resistentes à bacitracina, 92,5% isolados foram à tetraciclina, 48,75% à penicilina, 42,6% à eritromicina, 38,3% à rifampicina, 19,2% à estreptomicina, 4,6% à ciprofloxacina, 4,6% à vancomicina, 3,6% à nitrofurantoina e 2,9% ao cloranfenicol (Figura 2).

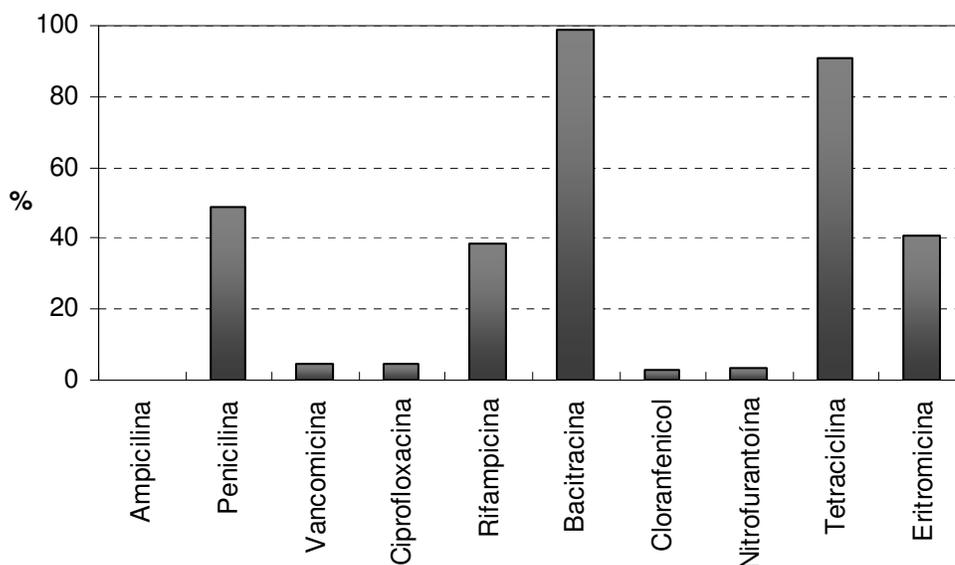


FIGURA 2. Incidência de resistência antimicrobiana entre os isolados de *Enterococcus* sp. isolados de “swabs” cloacais de frangos de corte.

Os fenótipos de resistência encontrados no presente estudo estão de acordo com os observadas por Apata (2009) em amostras de *Enterococcus* isoladas de frangos. Vários autores relatam alta sensibilidade à ampicilina em *Enterococcus* sp. isolados de frangos (Kólar et al., 2002; Souza et al., 2007; Valenzuela et al., 2008). Resistentes à tetraciclina, eritromicina e ciprofloxacina

foram observados em *Enterococcus* sp. isolados de aves em Portugal (Costa et al., 2007).

Embora tetraciclina seja um antimicrobiano não aprovado pela União Européia como suplemento alimentar para frangos, seu uso terapêutico e profilático é comum, e diante disso, *Enterococcus* resistentes à tetraciclina são frequentemente encontrados em ração animal (Michalova et al., 2004). Costa et al. (2007) encontraram amostras de *Enterococcus* sp. resistentes à tetraciclina, rifampicina, eritromicina e à nitrofurantoína isoladas em ração de frangos. Contrastando com resultados obtidos por Aarestrup et al. (2000) e Hayes et al. (2003), que obtiveram níveis reduzidos de resistência à penicilina em isolados de frangos, este estudo obteve níveis elevados de resistência a esse antimicrobiano. O desenvolvimento de alta resistência à penicilina pode ter conseqüências negativas no tratamento de infecções por *Enterococcus*, pois o referido antimicrobiano é amplamente utilizado em ambientes hospitalares, assim como em animais, como alternativa terapêutica.

A alta taxa de resistência à rifampicina observada no presente estudo sugere que esse tipo de resistência pode ser uma contribuição da manipulação desses animais por humanos, já que o referido antimicrobiano é usado exclusivamente em casos da clínica humana, geralmente em tratamento contra tuberculose (Andrasevic et al., 2002). Baixa frequência de resistência a cloranfenicol foi encontrada entre todas as espécies (2,9%). Frazzon et al. (2009), relataram que as espécies *Enterococcus faecium*, *E. gallinarum* e *E. hirae* isoladas de alimentos, apresentavam susceptibilidade a esse antimicrobiano. Valenzuela et

al. (2008), também relataram baixa resistência ao cloranfenicol em isolados alimentares no Marrocos. Resistência a antimicrobianos comumente utilizados na agricultura como bacitracina e lincomicina, mostraram uma alta frequência de ocorrência entre bactérias isoladas de alimentos, assim como níveis elevados de resistência a aminoglicosídeos também é relatado em isolados alimentares (Riboldi et al., 2009).

O resultado do perfil de susceptibilidade das espécies de *Enterococcus* sp. isoladas de cloacas de frangos de corte está demonstrado na Tabela 3. Entre as espécies resistentes, observou-se que *E. faecalis* teve maior prevalência, com índices de resistência de 97,9%, 75,8% e 32,6%, à tetraciclina, bacitracina e eritromicina, respectivamente. Seguido por *E. faecium*, com resistência de 72,4%, 65,5% e 44,8% aos mesmos antimicrobianos. *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* e *E. mundtii*, juntamente com *E. faecalis* demonstraram índice elevado de resistência à penicilina, variando entre 50% e 59,2%.

A distribuição das resistências entre as espécies observadas nas amostras isoladas de cloaca de frangos está de acordo com dados publicados por Hayes et al. (2003), onde a prevalência de resistência a antimicrobianos tem sido relatada mais frequentemente entre isolados de *E. faecalis* do que entre *E. faecium*, tanto do ambiente de produção quanto de produtos de carne crua.

Resistência ao cloranfenicol foi detectada em 4,2% dos *E. faecalis* e 7,4% dos *E. mundtii*. Frazzon et al. (2009), observaram que 9% a 22% dos isolados de *E. faecalis* de carcaças de frangos eram resistentes a cloranfenicol. Em relação à ciprofloxacina foi observado que 20,7% dos *E. faecium* e 34,7% *E.*

faecalis isolados dos frangos apresentaram resistência intermediária. A frequência de *E. faecium* encontrada no presente estudo foi semelhante à observada por Hayes et al. (2003) em isolados de frangos e perus. Estudo realizado por Moyaert et al. (2006) em *E. faecium* isolados de gatos demonstrou alta porcentagem de resistência à penicilina, relatada em relação a isolados de frangos, suínos e humanos.

TABELA 3. Incidência de resistência antimicrobiana entre as espécies de *Enterococcus* isoladas de frangos de corte.

Antimicrobiano ^a	<i>E. faecalis</i> (n=95)		<i>E. faecium</i> (n=29)		<i>E. casseliflavus/ E. gallinarum</i> (n=38)		<i>E. mundtii</i> (n=27)		<i>E. columbae</i> (n=14)		Outras espécies (n=32)		<i>Enterococcus</i> sp. (n=16)	
	R*(%)	I*(%)	R(%)	I(%)	R(%)	I(%)	R(%)	I(%)	R(%)	I(%)	R(%)	I(%)	R(%)	I(%)
AMP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PEN	52,6	0	27,6	0	50	0	59,2	0	35,7	0	23,5	0	85,7	0
VAN	9,4	36,8	0	10,3	2,6	18,4	3,7	11,1	0	7,1	0	11,7	0	78,6
CIP	2,1	34,7	3,4	20,7	5,2	36,8	7,4	25,9	7,1	35,7	0	71,4	7,1	21,4
RIF	36,8	29,5	24,1	6,9	55,3	18,4	48,1	13,8	42,8	14,3	23,5	35,7	21,4	78,6
BAC	75,8	1	65,5	0	97,4	0	70,4	0	64,3	0	94,1	0	100	0
CLO	4,2	25,3	0	6,9	0	23,7	7,4	7,4	0	21,4	0	8,8	0	7,1
NIT	1	1	0	3,4	2,6	13,1	3,7	0	0	0	5,9	8,8	0	7,1
TET	97,9	1	72,4	3,4	78,9	7,9	77,7	3,7	92,8	0	91,1	0	71,4	0
ERI	32,6	29,5	44,8	20,7	63,1	21	37	11,1	42,8	28,5	38,2	78,5	42,8	35,7

*R: resistente; I: Intermediário. ^aAMP, ampicilina; VAN, vancomicina; CIP, ciprofloxacina; CLO, cloranfenicol; NIT, nitrofurantoína; RIF, rifampicina; ERI, eritromicina; PEN, penicilina; TET, tetraciclina; BAC, bacitracina.

Nove isolados de *E. faecalis* e um de *E. mundtii* apresentaram resistência à vancomicina. *E. faecalis* têm sido isolados de pacientes hospitalizados, sendo também associadas à carne de aves de produção na Ásia e Nova Zelândia (Manson et al., 2003). O isolamento de *Enterococcus* resistentes à vancomicina de animais pode estar relacionado ao uso de avoparcina na ração animal. Mesmo com a proibição de seu uso desde 2002, estudos mostram que a reversão dessa resistência não ocorre rapidamente (Aarestrup et al., 2001; Borgen et al., 2001).

Leme et al. (2000), em estudo realizado no Brasil, relataram isolados de *E. faecium* de frangos em granjas de São Paulo com resistência à vancomicina, também relacionando o fato ao impacto do uso de avoparcina como promotor de crescimento, pois estabelece pressão seletiva e favorece a emergência de *Enterococcus* com resistência a glicopeptídeos. Todos os promotores de crescimento têm mecanismo de ação similar, selecionando os organismos mais adaptados na microbiota. Isto foi relatado com benzilpenicilina usado como promotor em ração, também selecionando *E. faecium* resistentes (Jeffries et al., 1977). *Enterococcus* resistentes à vancomicina possuem grande importância, pois os animais podem ser um reservatório importante de isolados resistentes à vancomicina, além da possibilidade dos genes de resistência serem transferidos às bactérias do intestino humano através da cadeia alimentar e/ou pelo manejo dos animais (Poeta et al., 2005).

4.5 Perfil de susceptibilidade de *Enterococcus* sp. em relação às dietas suplementadas

De acordo com as dietas empregadas observaram-se diferenças na prevalência da resistência entre as espécies de *Enterococcus* que foram isoladas, quando comparados com o Grupo 8 (controle). A prevalência de resistência antimicrobiana avaliada de acordo com as dietas está demonstrada na Tabela 4.

Os animais dos Grupos 1 e 2 que não receberam promotor de crescimento, óleos essenciais ou probióticos apresentaram um aumento na frequência de isolados resistentes à penicilina, eritromicina, tetraciclina, gentamicina e bacitracina quando comparados ao controle. No Grupo 1 observou-se um aumento no número de isolados resistentes à eritromicina (40%). Nos Grupos 3 e 4, onde os frangos receberam probióticos nas dietas, foi notado um aumento na frequência de isolados resistentes à penicilina e eritromicina. Foi observada, também nestes grupos, uma diferença entre os animais que receberam coccidiostáticos e os que foram mantidos na ausência desses. Os animais do Grupo 3 apresentaram um aumento na frequência de isolados resistentes para ciprofloxacina. Por outro lado, os animais do Grupo 4, que receberam coccidiostáticos, demonstraram uma diminuição de resistência aos antimicrobianos ciprofloxacina e rifampicina.

Os animais dos Grupos 5 e 6, no qual a dieta foi suplementada com óleos essenciais, apresentaram um perfil de resistência muito semelhante ao grupo controle, com exceção do antimicrobiano eritromicina. Os animais do Grupo

7 que só receberam promotor de crescimento apresentaram uma maior frequência de isolados resistentes à eritromicina e penicilina.

TABELA 4. Incidência de *Enterococcus* resistentes isolados de cloacas de frangos em relação à dieta empregada.

Antimicrobiano ⁵	Resistência (%)							
	Grupo 1	Grupo 2 ⁴	Grupo 3 ³	Grupo 4 ^{3,4}	Grupo 5 ²	Grupo 6 ^{2,4}	Grupo 7 ¹	Grupo 8 ^{4,*}
AMP	0	0	0	0	0	0	0	0
VAN	0	10	6,6	6,6	3,3	0	6,6	0
CIP	0	6,6	13,3	3,3	0	6,6	0	6,6
CLO	0	0	0	13,3	0	6,6	3,3	0
NIT	3,3	0	0	0	6,6	0	0	3,3
RIF	23,3	33,3	63,3	26,6	20	20	63,3	56,6
ERI	50	6,6	56,6	70	53,3	26,6	50	10,34
PEN	66,6	40	73,3	60	36,6	36,6	50	30
TET	56,6	100	100	90	100	86,6	93,3	100
BAC	100	100	100	93,3	100	100	100	100

Dietas: ¹Bacitracina; ²Óleos Essenciais; ³*Enterococcus faecium*; ⁴Monensina.

*Aves que não foram inoculadas com eimerias.

⁵ Antimicrobianos: AMP, ampicilina; VAN, vancomicina; CIP, ciprofloxacina; CLO, cloranfenicol; NIT, nitrofurantoína; RIF, rifampicina; ERI, eritromicina; PEN, penicilina; TET, tetraciclina; BAC, bacitracina.

Interações entre coccidiostáticos ionóforos e antimicrobianos são conhecidas em frangos e perus. Em estudo realizado por Jacob et al. (2008), contrastando os resultados deste estudo, o uso de monensina foi associado a um aumento na resistência de espécies de *Enterococcus* aos macrolídeos. Outros coccidiostáticos como tilosina e narasina ou outros fatores de estresse no

ambiente intestinal, podem causar danos na parede celular, aumentando a penetração de antimicrobianos em *Enterococcus* e contribuindo significativamente para a eliminação de cepas susceptíveis (Costa et al., 2009). Segundo Souza et al. (2007), frangos criados comercialmente apresentam uma maior porcentagem de isolados de *Enterococcus* sp. resistentes a antimicrobianos do que frangos criados em regime extensivo, o que sugere que o uso de antimicrobianos promotores de crescimento e coccidiostáticos em granjas avícolas induz uma alta presença de bactérias resistentes a drogas antimicrobianas (Bedford, 2000; Edens, 2003; Wage, 2003).

Observou-se que nos Grupos 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 8 que não receberam antimicrobiano suplementado na ração, houve uma elevada prevalência de *Enterococcus* resistentes. Graham et al. (2009) isolaram nos EUA *E. faecium* e *E. faecalis* resistentes a antimicrobianos de amostras de camas de três aviários com 120 dias de utilização. Além disso, a eliminação do uso de antimicrobianos pode não ter um resultado imediato na redução de resistência antimicrobiana. O curto ciclo de crescimento dos frangos pode não fornecer tempo suficiente para que determinantes de resistência sejam perdidos de uma só vez em tratamentos sem antimicrobianos (Costa et al., 2009).

Os dados apresentados indicam que é muito importante monitorar a prevalência de bactérias resistentes não somente na população, mas no ambiente e também nos animais, a fim de detectar a transferência de genes entre bactérias ou a transferência de genes de resistência de origem animal para humanos ou vice-versa. A presença de *Enterococcus* resistentes isolados de “swabs” cloacais

de frangos criados em sistema de confinamento é preocupante, uma vez que essas bactérias podem ser disseminadas ao ambiente através de diversas vias, como por exemplo, excrementos das aves que podem ser utilizados como adubo para irrigar plantações frutíferas e hortaliças. Através da manipulação dos animais ou partículas aerossóis contendo bactérias resistentes, essas podem ser inaladas por indivíduos saudáveis. A emergência de cepas bacterianas resistentes compromete a eficácia da terapia antimicrobiana em doenças infecciosas. Além disso, os patógenos resistentes têm sua capacidade de sobrevivência aumentada no mundo todo, disseminando clones e seus mecanismos de resistência (Apata, 2009).

4.6 Detecção de genes de resistência

Dos 97 isolados que apresentaram fenótipo de resistência à eritromicina, 95 (97,9%) apresentavam o gene *erm(B)* quando submetidos a amplificação por PCR. Este gene é frequentemente observado entre isolados resistentes à macrolídeos, sendo relatado por ser o mais comum gene codificador de resistência a essa classe de antimicrobianos em *Enterococcus* (Jensen et al., 1999; Aarestrup et al., 2000). O gene *tet(M)* foi encontrado em 204 (94%) dos 217 isolados que foram resistentes à tetraciclina, e o gene *tet(L)* foi detectado em 30% (n=65) dos *Enterococcus* sp. isolados resistentes ao mesmo antimicrobiano. A pesquisa dos genes determinantes para resistência à tetraciclina e eritromicina do total de isolados (n=240) comparados ao fenótipo de resistência desses

antimicrobianos, estão demonstrados na Figura 3. Dos isolados positivos para o gene *tet(M)*, 84 isolados (41,17%) continham também o gene *erm(B)*.

No presente estudo, *tet(M)* foi o gene encontrado com maior frequência. Esses resultados estão de acordo com estudos realizados por vários autores (Aarestrup et al., 2000; De Leener et al., 2004; Cauwerts et al., 2007; Frazzon et al., 2009). Esse gene, comumente localizado no cromossomo bacteriano, pode ser carregado por transposons conjugativos da família Tn916/Tn1545, onde *tet(M)* está associado com *erm(B)* (Clewell et al., 1995; Rice & Carias, 1998). No entanto, estudos recentes indicam também *tet(L)* como sendo uma determinante freqüente de resistência à tetraciclina (Hummel et al., 2007). O gene *tet(L)* codifica proteínas de membrana, denominadas de efluxo, na qual carregam para fora da célula moléculas como tetraciclina e doxiciclina (Chopra & Roberts, 2001).

Cinco dos isolados investigados apresentavam pelo menos um dos genes *tet* apesar de não demonstrarem fenótipo de resistência à tetraciclina. Isso pode ser atribuído à ausência de expressão do gene de resistência, como descrito por Martineau et al. (2000) e Martel et al. (2003). Segundo estudo realizado por Cauwerts et al. (2007), *Enterococcus* isolados de frangos que possuem níveis elevados de resistência fenotípica e genotípica à tetraciclina carregam o gene *ermB*, aumentando a especulação quanto ao uso freqüente de tetraciclina em frangos como sendo uma ferramenta de co-seleção para resistência aos antimicrobianos macrolídeos, lincosaminas e estreptograminas (**MLS**).

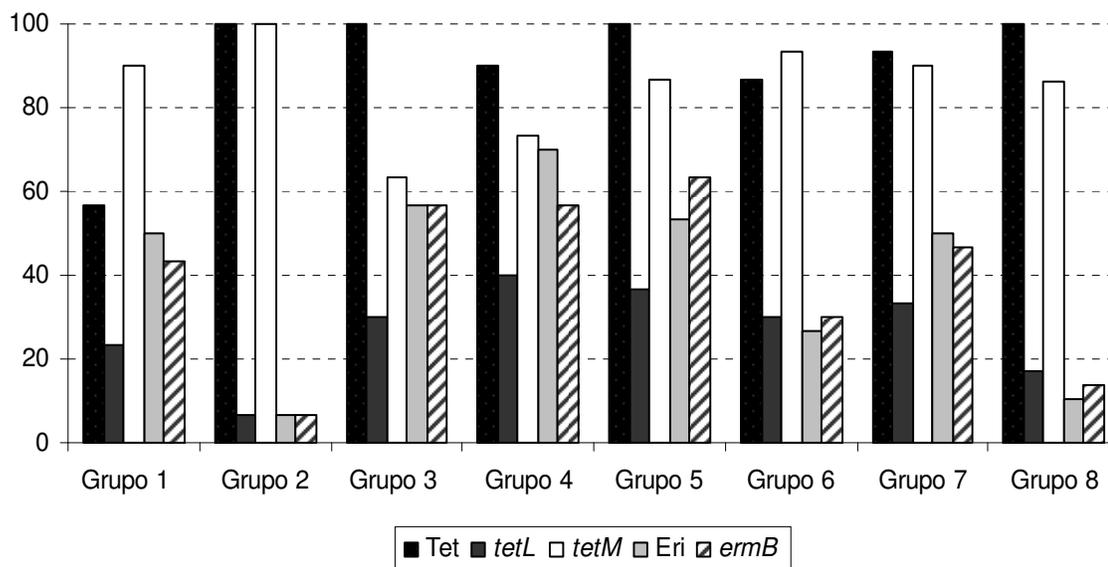


FIGURA 3. Incidência de resistência fenotípica e genotípica dos antimicrobianos tetraciclina e eritromicina. (Tet) Fenótipo de resistência à tetraciclina; (*tetL* e *tetM*) Genes de resistência à tetraciclina; (Eri) Fenótipo de resistência à eritromicina; (*ermB*) Gene de resistência à eritromicina.

Huys et al. (2004) isolaram *E. faecalis* e *E. durans* e obtiveram 100% dos isolados positivos para o gene *ermB*, considerado o maior gene causador de resistência a macrolídeos em *Enterococcus* sp. isolados de animais ou alimentos. De Leener et al. (2004), realizaram a pesquisa dos genes *erm(B)*, *tet(L)* e *tet(M)* em isolados de suínos e humanos, detectando presença do gene *erm(B)* em 85% e 100% dos isolados de suínos e humanos, respectivamente. O gene *tet(L)* foi observado em 65-68% dos isolados e 89-95% do total de isolados positivos para o gene *tet(M)*.

Em relação aos genes *tet*, uma situação similar foi encontrada durante uma grande pesquisa realizada em hospitais na França onde 229 *Enterococcus* foram isolados durante 10 coletas. Neste estudo, os genes *tet(M)* e *tet(L)* foram os

dominantes e determinantes para resistência à tetraciclina (Charpentier et al., 1994). Frazzon et al. (2009) relataram alta frequência dos genes *tet(L)* e *tet(M)* em *Enterococcus* sp. isolados de alimentos, com 88% dos isolados positivos para *tet(M)*, 9% com presença do gene *tet(L)* e em 13% do total de 112 isolados foram detectados os dois genes de resistência.

O gene *tet(L)* pode ser transferido na presença de plasmídeos conjugativos, mas eles não são capazes de transferir-se de forma independente, assim a sua propagação na população acontece lentamente (Chopra & Roberts, 2001). A associação do gene *tet(M)* com elementos conjugativos como transposons, tem sido um fator importante para a disseminação de resistência à tetraciclina em enterococci. Combinado ao fato de espécies de *Enterococcus* serem importantes fontes de resistência antibiótica por transferência horizontal de genes, tornam-se potencialmente patogênicas, ocorrendo também na cadeia alimentar (Rizzotti et al., 2009).

Os estudos citados apresentam uma alta ocorrência de resistência antimicrobiana e presença de genes similares em *E. faecalis* e *E. faecium*, assim como tem sido descrito em outras espécies encontradas em menor frequência em isolados de humanos, suínos e frangos. Estes dados reforçam os resultados obtidos no presente estudo (Figura 4).

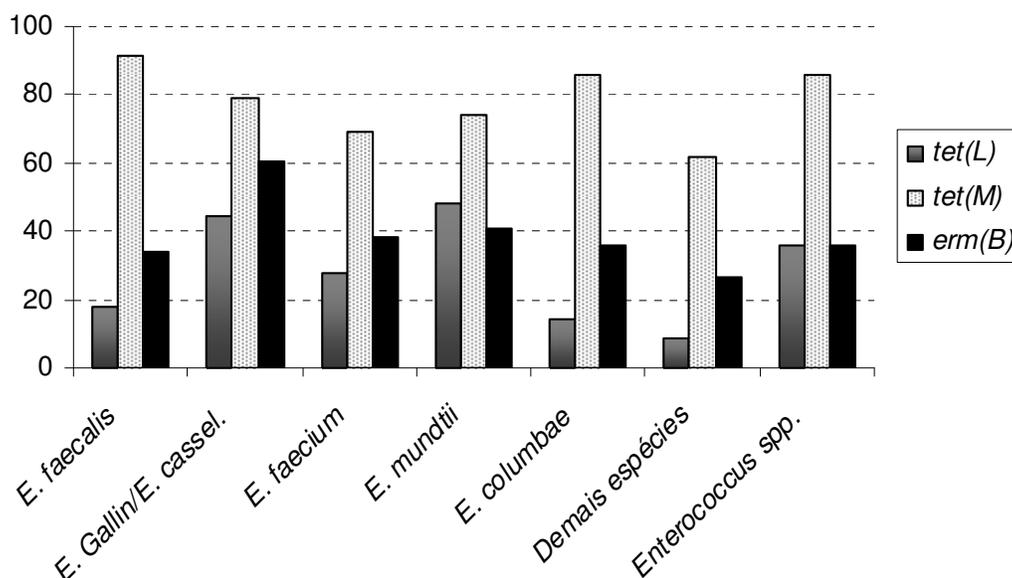


FIGURA 4. Perfil genotípico de resistência antimicrobiana relacionado às espécies mais freqüentes.

Nesses trabalhos, algumas diferenças no nível de resistência foram observadas entre os isolados de diferentes reservatórios, provavelmente refletindo diferenças na pressão seletiva constituída pelo uso de agentes microbianos com diversos objetivos. Na freqüência dos genes de resistência a tetraciclina foi observada diferenças entre os isolados, contudo, genes foram detectados indicando transmissão de resistência entre *Enterococcus* isolados de humanos, suínos e frangos.

A alta ocorrência de *Enterococcus* resistentes a antimicrobianos sugere uma manutenção da pressão seletiva por uso de diferentes antimicrobianos ou outras substâncias na indústria avícola, e uso terapêutico em humanos e animais. Esses isolados representam *Enterococcus* adaptados às condições ambientais e

de hospedeiros, podendo contribuir para a persistência da resistência, consistindo em um reservatório de isolados não suscetíveis. Os resultados representados no presente estudo demonstram a persistência de *Enterococcus* resistentes na criação de frangos de corte.

5. CONCLUSÃO

Com base nos objetivos apresentados no presente estudo e após análise dos resultados obtidos, pode-se concluir que 17 espécies de *Enterococcus* foram isoladas a partir de “swabs” cloacais de frangos de corte, onde o número ou a composição das espécies variou de acordo com as dietas empregadas para as aves.

Foram observadas elevadas taxas de resistência aos antimicrobianos bacitracina, tetraciclina e penicilina nos isolados de *Enterococcus* sp. e nos grupos onde os frangos receberam coccidiostático ionóforo suplementados na ração, a prevalência de *Enterococcus* sp. resistentes foi menor quando comparada aos grupos que não receberam essa substância.

Os genes *tet(M)*, *erm(B)* e *tet(L)* foram detectados entre os isolados, no entanto, não houve correlação entre o perfil de resistência e a presença dos genes *tet(M)*, *erm(B)* e *tet(L)* nos isolados de *Enterococcus* com as diferentes dietas empregadas nos frangos de corte.

6. REFERÊNCIAS

AARESTRUP, F.M.; AGERSO, Y.; GERNER-SMIDT, P.; MADSEN, M.; JENSEN, L.B. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 37, p. 127-137, 2000.

AARESTRUP, F.M.; SEYFARTH, A.M.; EMBORG, H.D.; PEDERSEN, K.; HENDRIKSEN, R.S.; BAGER, F. Effect of abolishment on the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 45, p. 2054-2059, 2001.

ABEF (Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos). Exportações Brasileiras de carne de frango, 2007. Disponível em: <<http://www.abef.com.br/Estatisticas/MercadoExterno/Atual.php>>. Acesso em: 28 Jan. 2010.

ANDERSON, R.C.; STANKER, L.H.; YOUNG, C.R.; BUCKLEY, S.A.; GENOVESE, K.G.; HARVEY, R.B.; DELOACH, J.R.; KELTH, N.K.; NISBET, D.J. Effect of competitive exclusion treatment on colonization of early-weaned pigs by *Salmonella* serovar Choleraesuis. **Journal of Swine Health and Production**. v. 7, n. 4, p. 155-160, 1999.

ANDRASEVIC, A.T., AMBIC, T., KALENIC, S., JANKOVIC, V. Working Group of the Croatian Committee for Antibiotic Resistance Surveillance. Surveillance for antimicrobial resistance in Croatia. **Emergence Infection Disease**. v. 8, p. 14-18, 2002.

APAJALAHTI, J.H.; KETTUNEN, A.; BEDFORD, M.R.; HOLBEN, W.E. Percent G + C profiling accurately reveals diet-related differences in the gastrointestinal microbial community of broiler chickens. **Applied Environmental Microbiology**. v. 67, p. 5656-5667, 2001.

APATA, D.F. Antibiotic Resistance in Poultry. **International Journal of Poultry Science**. v. 8, n. 4, p. 404-408, 2009.

ARTHUR, M.; MOLINAS, C.; DEPARDIEU, F. & COURVALIN, P. Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursor in *Enterococcus faecium* BM4147. **Journal of Bacteriology**. v. 175, n. 1, p. 117-127, 1993.

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

BARRETO, N.A.; SANT'ANNA, R.R.P.; SILVA, L.B.G.; UEHARA, A.A.; GUIMARÃES, R.C.; DUARTE, I.M.; ASENSI, M.D. Caracterização fenotípica e molecular de *Neisseria gonorrhoeae* isoladas no Rio de Janeiro, 2002 –2003. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**. v. 16, n. 3, p. 32-42, 2004.

BARRIERE, J.C.; BOUANCHAUD, D.H.; PARIS, J.M.; ROLIN, O.; HARRIS, N.V.; SMITH, C. Antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* of semisynthetic injectable streptogramins: RP59500 and related compounds. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 30, p. 1–8, 1992.

BEDFORD, M. Removal of antibiotic growth promoters from poultry diets: implications and strategies to minimize subsequent problems. **World Poultry Science Journal**. v. 56, p. 347-365, 2000.

BERNET, M.F.; BRASSART, D.; NEESER, J.R.; SERVIN, A.L. *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. **Gut**. v. 35, n. 4, p. 483-489, 1994.

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

BORGEN, K.; SORUM, M.; WASTESON, Y.; KRUSE, H. VanA-type vancomycin-resistant enterococci (VRE) remain prevalent in poultry carcasses 3 years after avoparcin was banned. **International Journal of Food Microbiology**. v. 64, p. 89-94, 2001.

BRASIL. Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango — PREBAF. Relatório de curso e reunião geral do PREBAF 2006. Available from: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/prebaf_04_06.pdf. Acesso em: 28 Abr. 2008.

BUGG, T.D.H.; DUTKA-MALEN, S.; ARTHUR, M.; COURVALIN, P.; WALSH, C.T. Identification of vancomycin resistance protein vanA as a D-alanine: D-alanine ligase of altered substrate specificity. **Biochemistry**. v. 30, n. 8, p. 2017–2021, 1991.

CASADEWALL, B.; COURVALIN, P. Characterization of the *vanD* glycopeptide resistance gene cluster from *Enterococcus faecium* BM4339. **Journal of Bacteriology**. v. 181, n. 12, p. 3644-3648, 1999.

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

CHARPENTIER, E.; GERBAUD, G.; COURVALIN, P. Presence of *Listeria* tetracycline resistance genes *tet(S)* in *Enterococcus faecalis*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 38, p. 2330-2335, 1994.

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

CHOW, J. W. Aminoglycoside resistance in Enterococci. **Clinical Infectious Diseases**. v. 31, p. 586-589, 2000.

CLEWELL, D.B.; FLANNAGAN, S.E.; JAWORSKI, D.D. Unconstrained bacterial promiscuity- the Tn916-Tn1545 family of conjugative transposons **Trends in Microbiology**. v. 3, p. 229-236, 1995.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing, Tables M100- S18 2008 e MS 100-15. v. 25, p. 1, 2008.

COCCONCELLI, P.S.; PORRO, D.; GALANDINI, S.; SERINI, L. Development of RAPD protocol for typing of strains of lactic acid bacteria and enterococci. **Letters of Applied Microbiology**. v. 21, p. 376-379, 1995.

COLLIER, C.T.; SMIRICKY-TJARDES, M.R.; ALBIN, D.M.; WUBBEN, J.E.; GABERT, V.M.; DEPLANCKE, B.; BANE, D.; ANDERSON, D.B.; GASKINS, H.R. Molecular ecological analysis of porcine ileal microbiota responses to antimicrobial growth promoters. **Journal of animal Science**. v. 81, p. 3035-3045, 2003.

CORRÊA, A. A.; FUENTEFRIA, D. B.; CORÇÃO, G. Resistência a antimicrobianos

em Enterococos isolados de amostras de fezes de suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 33, n. 2, p. 155-159, 2005.

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

COSTA, P.M.; BELO, A.; GONÇALVES, J.; BERNARDO, F. Field trial evaluating changes in prevalence and patterns of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. isolated from growing broilers medicated with enrofloxacin, apramycin and amoxicillin. **Veterinary Microbiology**. v. 139, p. 284-292, 2009.

DAVIES, R.; ROBERTS, T.A. Antimicrobial susceptibility of enterococci recovered from commercial swine carcasses: Effect of feed additives. **Letters in Applied Microbiology**. v. 29, n. 5, p. 327-333, 1999.

D'AZEVEDO, P.A.; KACMAN, S.B.; SCHMALFUSS, T.; SILVA, A.; RODRIGUES, L.F. Primeiro caso de *Enterococcus* resistente à vancomicina isolado em Porto Alegre, RS. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 36, p. 258-260, 2000.

DE LEENER, E.; MARTEL, A.; DECOSTERE, A.; HAESBROUCK, F. Distribution of the *erm(B)* gene, tetracycline resistance genes, and Tn1545-like transposons in macrolide- and lincosamide-resistant enterococci from pigs and humans. **Microbial Drug Resistance**. v. 10, n. 4, p. 341-345, 2004.

DEVRIESE, L.A.; POT, B.; COLLINS, M.D. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 75, p. 399-408, 1993.

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

DONABEDIAN, S.M.; PERRY, M.B.; VAGER, D.; HERSHBERGER, E.; MALANI, P.; SIMJEE, S.; CHOW, J.; VERGIS, E.N.; MUDER, R.R.; GAY, K.; ANGULO, F.J.; BARTLETT, P.; ZERVOS, M.J. Quinupristin-Dalfopristin Resistance in *Enterococcus faecium* Isolates from Humans, Farm Animals, and Grocery Store Meat in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 44, n. 9, p. 3361–3365, 2006.

EDENS, F.W. An alternative for antibiotic use in poultry: probiotics. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. v. 5, p. 1-40, 2003.

EUZÉBY, J.P. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - Genus *Enterococcus*. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/e/enterococcus.html>. Acesso em: 05 Abr. 2010.

FACKLAM, R.R.; COLLINS, M.D. Identification of *Enterococcus* Species Isolated from Human Infections by a Conventional Test Scheme. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 27, p. 731-734, 1989.

FINES, M.; PERICHON, B.; REYNOLDS, P.; SAHM, D. F.; COURVALIN, P. VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 43, n. 9, p. 2161-2164, 1999.

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

FRANZ, C.M.A.P.; HOLZAPFEL, W.H.; STILES, M.E. Enterococci at the crossroads of food safety? **International Journal of Food Microbiology**. v. 47, n. 1, p. 1-24, 1999.

FRANZ, C.M.; STILES, M.E.; SCHLEIFER, K.H.; HOLZAPFEL, W.H. Enterococci in foods- a conundrum for food safety. **International Journal of Food Microbiology**. v. 88, p. 105-122, 2003.

FRAZZON, A.P.G.; GAMA, B.A.; HERMES, V.; BIERHALS, C.G.; PEREIRA, R.I.; GUEDES, A.G.; D'AZEVEDO, P.A.; FRAZZON, J. Prevalence of antimicrobial resistance and molecular characterization of tetracycline resistance mediated by *tet(M)* and *tet(L)* genes in *Enterococcus* spp. isolated from food in Southern Brazil. **World Journal Microbiology and Biotechnology (On line)**. doi: 10.1007/s11274-009-0160-x, 2009.

FUKATA, T.; KAGEYAMA, A.; BABA, E.; ARAKAWA, A. Effect of infection with *Eimeria tenella* upon the cecal bacterial population in monoflora chickens. **Poultry Science**. v. 66, p. 841-844, 1987.

FURTADO, G.H.C.; MARTINS, S.T.; COUTINHO, A.P.; SOARES, G.M.M.; WEY, S. B.; MEDEIROS, E. A. S. Incidence of vancomycin-resistant *Enterococcus* at a university hospital in Brazil. **Revista de Saúde Pública**. v. 39, n. 1, p. 1-5, 2005.

GARCIA, R.G.; CALDARA, F.R.; ABREU, A.P.N. Perspectivas de mercado do frango certificado alternativo no estado de São Paulo. Projeto da disciplina de Tópicos em sistemas de gestão agroalimentar. **Botucatu**: FMVZ-UNESP, 2002.

GIANNENAS, I.; FLOROU-PANERI, P.; PAPAZHARIADOU, M.; CHRISTAKI, E.; BOTSOGLOU, N.A.; SPAIS, A.B. Effect of dietary supplementation with oregano essential oil on performance of broilers after experimental infection with *Eimeria tenella*. **Arch. Tierernahr.** v. 57, n. 2, p. 99-106, 2003.

GIRAFFA, G.; ROSSETTI, L.; NEVIANI, E. An evaluation of chelex-based DNA purification protocols for the typing of lactic acid bacteria. **Journal of Microbiological Methods.** v. 42, n. 2, p. 175-184, 2000.

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

GRAHAM, J.P.; PRICE, L.B.; EVANS, S.L.; GRACZYK, T.K.; SILBERGELD, E.K. Antibiotic resistant enterococci and staphylococci isolated from flies collected near confined poultry feeding operations. **Science Total Environmental.** v. 407, n. 8, p. 2701-2710, 2009.

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

GOODMAN & GILMAN. **The Pharmacological Basis of Therapeutics.** New York: McGraw-Hill Professional. 11^aed., 1984p., 2003.

HAMMERUM, A.M.; JENSEN, L.B.; AARESTRUP, F.M. Detection of the *sanA* gene and transferability of virginiamycin resistance in *Enterococcus faecium* from food-animals. **FEMS Microbiology Letters.** v. 168, p. 145-151, 1998.

HARDIE, J.M.; WHILEY, R.A. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. **Journal Applied Microbiology Symposium Supplement.** v. 83, n. 1S– 11S, 1997.

HAYES, J.R., ENGLISH, L.L., CARTER, P.J., PROESCHOLDT, T., LEE, K.Y., WAGNER, D.D., WHITE, D.G. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Enterococcus* Species Isolated from Retail Meats. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 69, p. 7153-7160, 2003.

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

HERSHBERGER, E.; DONABEDIAN, S.; KONSTANTINOY, K.; ZERVOS, M.J. Quinupristin-dalfopristin resistance in gram-positive bacteria: mechanism of resistance and epidemiology. **Clinical Infectious Disease.** v. 38, n. 1, p. 92-98, 2003.

HEW, C.M.; MAHER, K.; VOGEL, R.F. Expression of virulence-related genes by *Enterococcus faecalis* in Response to different environments. **Systematic and Applied Microbiology**. v. 30, p. 257-267, 2007.

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

HSUEH, P.R.; TENG, L.J.; CHEN, Y.C.; YANG, P.C.; HO, S.W.; LUH, K.T. Recurrent bacteremic peritonitis caused by *Enterococcus cecorum* in a patient with liver cirrhosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 2450-2452, 2000.

HUMMEL, A.; HOLZAPFEL, W.H.; FRANZ, C.M.A.P. Characterisation and transfer of antibiotic resistance genes from enterococci isolated from food. **Systematic and Applied Microbiology**. v. 30, p. 1-7, 2007.

HUYS, G.; D'HAENE, K.; COLLARD, J. M.; SWINGS, J. Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from food. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 70, n. 3, p. 1555-1562, 2004.

IBRIR, F.; GREATHEAD, H.M.R.; FORBES, J.M. **The effect of thymol/carvacol treatments on the performance of broiler chickens infected with *Eimeria acervulina***. Proceedings of Alternatives to Feed Antibiotics and Anticoccidials in Pig and Poultry Meat Production, Oslo, 2001.

JACOB, M.E., FOX, J.T., NARAYANAN, S.K., DROUILLARD, J.S., RENTER, D.G., NAGARAJA, T.G. Effects of feeding wet corn distillers grains with solubles with or without monensin and tylosin on the prevalence and antimicrobial susceptibilities of fecal foodborne pathogenic and commensal bacteria in feedlot cattle. **Journal of Animal Science**. v. 86, p.1182-1190, 2008.

JEFFRIES, L.; COLEMAN, K.; BUNYAN, J. Antimicrobial substances and chick growth promotion: comparative studies on selected compounds *in vivo*. **Brazilian Poultry Science**. v. 18, p. 295-308, 1977.

JENSEN, L.B.; FRIMODT-MOLLER, N.; AARESTRUP, F.M. Prevalence of the *erm* genes in gram positive bacterial spp. of animal and human origin. **FEMS Microbiology Letters**. v. 170, p. 151-158, 1999.

JIN, L.Z.; HO, Y.W.; ABDULLAH, N.; JALALUDIN, S. Growth performance, intestinal microbial populations, and serum cholesterol of broilers fed diets containing *Lactobacillus* cultures. **Poultry Science**. v. 77, p. 1259-1265, 1998.

JOHNSTON, L.M.; JAYKUS, L.A. Antimicrobial Resistance of Enterococcus Species Isolated from Produce. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 70, n.5, p.3133–3137, 2004.

JONES, M.E.; DRAGHI, D.C.; THORNSBERRY, C.; KARLOWSKY, J.A.; SAHM, D.F.; WENZEL, R.P. Emerging resistance among bacterial pathogens in the intensive care unit—a European and North America surveillance study (2000-2002). **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. v. 3, n. 14, 2004.

KAK, V.; CHOW, J.W. Acquired antibiotic resistances in enterococci. In: Gilmore, M.S. **The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance**. p.355-376, 2002.

KAMEL, H.E.M. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* on fibre digestion and ruminal fermentation in sheep fed berseem hay (*Trifolium alexandrinum*) as a sole diet. Asian-australas **Journal of Animal Science**. v. 13, p. 139-142, 2000.

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

KHAN, S.A.; NAWAZ, M.S.; KHAN A.A.; HOPPER, S.L.; JONES, R.A.; CERNIGLIA, C.E. Molecular characterization of multidrug-resistant *Enterococcus* spp. from poultry and dairy farms: detection of virulence and vancomycin resistance gene markers by PCR. **Molecular and Cellular Probes**. v. 19, p. 27-34, 2005.

KHAN, S.A.; NOVICK, R.P. Complete nucleotide sequence of pT181, a tetracycline resistance plasmid from *Staphylococcus aureus*. **Plasmid**. v. 30, p. 163-166, 1983.

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

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

KOLAR, M.; URBANEK, K.; VAGNEROVA, I.; KOUKALOVA, D. The influence of antibiotic use on the occurrence of vancomycin-resistant enterococci. **Journal of Clinical Pharmacy & Therapeutics**. v. 31, n. 1, p. 67-72, 2006.

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

KROGSTAD, D.J.; JKORFHAGEN, T.R.; MOELLERING, R.C.; WENNERSTEN JR., C.; SWARTS, M. N. Aminoglycoside-inactivating enzymes in clinical isolates of *Streptococcus faecalis*: an explanation for resistance to antibiotic synergism. **Journal of Clinical Investigation**. v. 62, n. 2, p. 480-486, 1978.

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

LEE, K.W.; EVERTS, H.; BEYNEN, A.C. Essential oils in broiler nutrition. **International Journal of Poultry Science**. v. 3, p. 738-752, 2004.

LEME, I.L.; FERREIRA, A.J.P.; BOTTINO, J.A.; PIGNATARI, A.C.C. Glycopeptides susceptibility among enterococci isolated from a poultry farm in São Paulo, Brazil (1996/1997). **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 31, p. 53-57, 2000.

MANERO, A.; BLANCH, A.R. Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 65, n. 10, p. 4425-4430, 1999.

MANSON, J.M., KEIS, S., SMITH, J.M. A clonal lineage of *VanA*-type *Enterococcus faecalis* predominates in vancomycin-resistant enterococci isolated in New Zealand. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 47, p. 204-210, 2003.

MANZANILLA, E.G.; PEREZ, J.F.; MARTIN, M.; KAMEL, C.; BAUCCELLS, F.; GASA, J. Effect of plant extracts and formic acid on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. **Journal of Animal Science**. v. 82, p. 3210-3218, 2004.

MARTEL, A.; MEULENAERE, V.; DEVRIESE, L.A.; DECOSTERE, A.; HAESEBROUCK, F. Macrolide and lincosamide resistance in the gram-positive nasal and tonsillar flora of pigs. **Microbial drug resistance: mechanisms, epidemiology and disease**. v. 9, p. 293-297, 2003.

MARTINEAU, F.; PICARD, F.J.; LANSAC, N.; MENARD, C.; ROY, P.H.; OUELLETTE, M.; BERGERON, M.G. Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus epidermidis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 44, p. 231-238, 2000.

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

MCKESSAR, S.J.; BERRY, A.M.; BELL, J.M.; TURNIDGE, J.D.; PATON, J.C. Genetic characterization of *vanG*, a novel resistance locus of *Enterococcus faecalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 44, n. 11, p. 3224-3228, 2000.

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

MENEZES, E.A.; LIMA, K.C.; CUNHA, F.A.; ÂNGELOM, R.F.; SALVIANO, N.C.; OLIVEIRA, I.R.N. Infecções hospitalares urinárias causadas por *Enterococcus faecalis* na cidade de Fortaleza. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. v. 37, n. 2, p. 65-67, 2005.

MERCENIER, A.; PAVAN, S.; POT, B. Probiotics as biotherapeutic agents: present knowledge and future prospects. **Current Pharmaceutical Desing**. v.8, p. 99-110, 2002.

MINGEOT-LECLERCQ, M.P.; GLUPCZYNSKI, Y.; TULKENS, P.M. Aminoglicosides phosphotransferases type III from *Enterococcus*: over expression, purification, and substrate specificity. **Biochemistry**. v. 33, p. 6936-6944, 1999.

MITSCH, P.; ZITTERL-EGLESEER, K.; KOHLER, B.; GABLER, C.; LOSA, R.; ZIMPERNIK, I. The effect of two different blends of essential oil components on the proliferation of *Clostridium perfringens* in the intestines of broiler chickens. **Poultry Science**. v. 83, n. 4, p. 669-675, 2004.

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

MOHAMED, J.A.; HUANG, D.B. Biofilm formation by enterococci. **Journal of Medical Microbiology**. v. 56, p. 1581-1588, 2007.

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

MOUTON, R.P. Resistance to quinolones. **Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition**. v. 9, n. 1, p. 1-4, 1987.

MOUNTZOURIS, K.C.; TSIRTSIKOS, P.; KALAMARA, E.; NITSCH, S.; SCHATZMAYR, G.; FEGEROS, K. Evaluation of the Efficacy of a Probiotic Containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* Strains in Promoting Broiler Performance and Modulating Cecal Microflora Composition and Metabolic Activities. **Poultry Science**. v. 86, p. 309-317, 2007.

MOYAERT, H.; DE GRAEF, E.M.; HAESEBROUCK, F.; DECOSTERE, A. Acquired antimicrobial resistance in the intestinal microbiota of diverse cat populations. **Research in Veterinary Science**. v. 81, p. 1-7, 2006.

MURRAY, B.E. Vancomycin-resistant enterococcal infections. **The New England Journal of Medicine**. v. 342, p. 710-721, 2000.

NG, L.K.; MARTIN, I.; ALFA, M.; MULVEY, M. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistance genes. **Molecular Cell Probes**. v. 15, p. 209-215, 2001.

NOVAIS, C.; COQUE, T.M.; COSTA, M.J.; SOUSA, J.C.; BAQUERO, F.; PEIXE, L.V. High occurrence and persistence of antibiotic-resistant enterococci in poultry food samples in Portugal. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 56, p. 1139-1143, 2005.

PALERMO NETO, J. A questão dos Resíduos de Antimicrobianos em Alimentos. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária- CFMV**. v. 22, 2001.

PIÑERA, J.G.G.; PENIÉ, J.B.; RODRÍGUEZ, M.Á.; REYES, A.M.; MORA E.; LESCAY, M. Glicopéptidos. **Acta Medica**. v. 8, n. 1, p. 54-57, 1998.

POETA, P.; ANTUNES, T.; RODRIGUES, J. *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina isolados de fezes de frangos, pombos, gamos e ratos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 58, n. 3, p. 412-414, 2005.

POOTOOLAL, J.; NEU, J.; WRIGHT, G.D. Glycopeptide antibiotic resistance. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. v. 42, p. 381-408, 2002.

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

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

RICE, L.B.; CARIAS, L.L. Transfer of Tn5385, a Composite, Multiresistance Chromosomal Element from *Enterococcus faecalis*. **Journal of Bacteriology**. v. 180, n. 3, p. 714-721, 1998.

RIZZOTTI, L.; LA GIOIA, F.; DELLAGLIO, F.; TORRIANI, S. Molecular diversity and transferability of the tetracycline resistance gene *tet(M)*, carried on Tn916-1545 family transposons, in enterococci from a total food chain. **Antonie Van Leeuwenhoek**. v. 96, p. 43-52, 2009.

ROBERTS, M.C.; MONCLA, B.J.; HILLIER, S.H. Characterization of unusual tetracycline-resistant gram-positive bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 35, n. 12, p. 1555-1557, 2003.

ROBERTS, M.C.; SUTCLIFFE, J.; COURVALIN, P.; BOGO JENSEN, L.; ROOD, J.; SEPPALA, H. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptograminB resistance determinants. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 43, n. 12, p. 2823-2830, 1999.

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L.; GOMES, P.C.; OLIVEIRA, R.F.; LOPES, D.C.; FERREIRA, A.F.; BARRETO, S.L.T. **Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos: Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais**. UFV-Departamento de Zootecnia, Viçosa 2ª ed., p.83, 2005.

SAAVEDRA, L.; TARANTO, M.P.; SESMA, F.; DE VALDEZ, G.F. Homemade traditional cheeses for the isolation of probiotic *Enterococcus faecium* strains. **International Journal of Food Microbiology**. v. 88, n. 2-3, p. 241-245, 2003.

SAINI, R.; DAVIS, S.; DUDLEY-CASH, W. Oregano essential oil reduces the expression of coccidiosis in broilers. **Proceedings...52nd WEST POULTRY DISEASE CONFERENCE**, Sacramento, CA. 2003. Veterinary Extension, University of California. p. 97-98, 2003.

SALYERS, A.A.; ÁMABILE-CUEVAS, C.F. Why are antibiotic resistance genes so resistance to elimination? **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 41, n. 11, p. 2321-2325, 1997.

SANDERS, M.E. **Clinical Infectious Diseases. Developing Probiotics as Food and Drugs: Scientific and Regulatory Challenges**. Chicago: The University Chicago Press. v. 46, 472p., 2008.

SANTOS, G.J.R.; TURNES, C.G. Probiotics in aviculture. **Ciência Rural**. v. 35, n. 3, p. 741-747, 2005.

SCHLEIFER, K.H.; KLIPPER-BÄLZ, R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom.rev. as *Enterococcus faecalis* comb.nov. and *Enterococcus faecium* comb.nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 34, p. 31-34, 1984.

SCHOUTEN, M.A.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J.A.A.; MEIS, J.F.G.; VOSS, A. Prevalence of vancomycin-resistant *Enterococci* in Europe. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease**. v. 19, n. 11, p. 816-822, 2000.

SCHWARZ, S.; KEHRENBURG, C.; WALSH, T.R. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 17, n. 431-437, 2001.

SCHWARZ, S.; CARDOSO, M.; BLOBEL, H. Plasmid-mediated Chloramphenicol Resistance in *Staphylococcus hyicus*. **Journal of General Microbiology**. v. 135, p. 3329-3336, 1989.

SHEPARD, B.D.; GILMORE, M.S. Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. **Microbes Infections**. v. 4, p. 215-224, 2002.

SILVA, N.A.; SILVA, J.K.; ANDRADE, E.H.; CARREIRA, L.M.; SOUSA, P.J.; MAIA, J.G. Essential oil composition and antioxidant capacity of *Lippia schomburgkiana*. **Natural Product Communications**. v. 4, n. 9, p. 1281-1286, 2009.

SILVA, P. **Farmacologia**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1314 p., 1998.

SIMJEE, S.; WHITE, D.G.; MENG, J.; WAGNER, D.D.; QAIYUMI, S.; ZHAO, S.; HAYES, J.R.; MCDERMOTT, P.F. Prevalence of streptogramin resistance genes among *Enterococcus* isolates recovered from retail meats in the greater Washington DC area. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 50, p. 877-882, 2002.

SINGER, R.S.; FINCH, R.; WEGENER, H.C.; BYWATER, R.; WALTERS, J.; LIPISITCH, M. Antibiotic resistance – the interplay between antibiotic use in animals and human beings. **Lancet Infectious Disease**. v. 3, p. 47-51, 2003.

SINGER, R.S.; COX J.R.; L.A.; DICKSON, J.S.; HURD, H.S.; PHILLIPS, I.; MILLER, G.Y. Modeling the relationship between food animal health and human foodborne illness. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 79, p. 186-203, 2007.

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

SPEER, B.S.; SHOEMAKER, N.B.; SALYERS, A.A. Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 5, n. 4, p. 387-399, 1992.

SUTCLIFFE, J.; GREBE, T.; TAIT-KAMRADT, A.; WONDRACK, L. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 40, p. 2562-2566, 1996.

TEIXEIRA, L.M.; FACKLAM, R.R. Enterococcus. In: MURRAY, P.R. *et al.* **Manual of Clinical Microbiology**. 8^{ed}. Washington, D.C.: American Society for Microbiology. p. 422-33, 2003.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.; GOERING, R.V.; MICKELSEN, P.A.; MURRAY, B.E.; PERSING, D.H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting. Chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-Field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 33, p. 2233-2239, 1995.

THOMKE, S.; ELWINGER, K. Growth promotants in feeding pigs and poultry. II. Alternatives to antibiotic growth promotants. **Ann Zootech**. v. 47, p. 245-271, 1998.

TORRES, C.; TENORIO, C.; LANTERO, M.; GASTAÑARES, M. J.; BAQUERO, F. High-level penicillin persistence and penicillin-gentamicin synergy in *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 37, p. 2427-2431, 1993.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.D.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 6^{ed}. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000. 830p.

TRIEU-CUOT, P.; DE CESPÉDÈS, G.; BENTORCHA, F.; DELBOS F.; GASPARD, E.; HORAUD, T. Study of heterogeneity of chloramphenicol acetyltransferase (CAT) genes in streptococci and enterococci by polymerase chain reaction: characterization of a new CAT determinant. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 37, n. 12, p. 2593-2598, 1993.

TYRRELL, G.J.; TURNBULL, L.; TEIXEIRA, L.M.; LEFEBVRE, J.; CARVALHO, M. D.A.G.; FACKLAM, R.R.; LOVGREN, M. *Enterococcus gilvus* sp. nov. and *Enterococcus pallens* sp. nov. isolated from human clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, n. 4, p. 1140-1145, 2002.

TYRRELL, G.N.; BETHUNE, R.N.; WILLEY, B.; LOW, D.E. Species identification of enterococci via intergenic ribosomal PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 35, n. 5, p.1054-1060, 1997.

USDA (United States Department of Agriculture). Economic Research Service. 2006. Disponível em: <http://www.ers.usda.gov/Brieng/Brazil/S>. Acesso em: 25 Jan. 2010.

USDA (United States Department of Agriculture). Produção Mundial de Carne de Frango, 2009. Disponível em: <http://www.abef.com.br/Estatisticas/MercadoMundial/MercadoMundial.php>. Acesso em: 28 Jan. 2010.

VALDÉS, D.L.; MUGUERCIA, H.L.; TORRES, M.L.H.; ARIAS, E.R.; MARÍN, R. Z.; PRADERES, L.J. Penicilinas. **Acta Medica**. v. 8, n. 1, p. 28-39, 1998.

VALENZUELA, A.S.; OMAR, N.B.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R.L.; ORTEGA, E.; CAÑAMERO, M.M.; GÁLVEZ, A. Risk factors in enterococci isolated from foods in Morocco: Determination of antimicrobial resistance and incidence of virulence traits. **Food and Chemical Toxicology**. v. 46, p. 2648-2652, 2008.

WAGE, S.W. **The role of Enteric Antibiotics in Livestock Production**. Avcare Limited: Camberra, 338p, 2003.

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

ZHANEL, G.G.; HOMENUK, K.; NICHOL, K.; NOREDDIN, A.; VERCAIGNE, L.; EMBIL, J.; GIN, A.; KARLOWSKY, J.A.; HOBAN, D.J. The glycylicyclines: a comparative review with the tetracyclines. **Drugs**. v. 64, n. 1, p. 63-88, 2004.

7. APÊNDICE

7.1 Meios de Cultura e Soluções utilizadas

7.1.1 Meio de Cultura Caldo Azida

34,7g caldo Azida
1000ml água destilada

7.1.2 Meio de Cultura Agar Brain Heart Infusion (BHI)

37g agar BHI
1000ml água destilada

7.1.3 Meio de Cultura Agar BHI + NaCl 6,5%

37g agar BHI
65g Cloreto de Sódio (NaCl)
1000ml água destilada

7.1.4 Meio de Cultura Agar Bile Esculina

43,5g agar Bile Esculina
1000ml água destilada

7.1.5 Meio de Cultura Agar Muller Hinton

38g agar Muller Hinton
1000ml água destilada

7.1.6 Meio de Cultura Arabinose

10g Arabinose
10g Peptona caseína
1g NaCl
1000ml água destilada
(pH 7,4)

7.1.7 Meio de Cultura Rafinose

10g Rafinose
10g Peptona caseína
1g NaCl
1000ml água destilada
(pH 7,4)

7.1.8 Meio de Cultura Sorbitol

10g Sorbitol
10g Peptona caseína
1g NaCl
1000ml água destilada
(pH 7,4)

7.1.9 Meio de Cultura Sorbose

10g Sorbose
10g Peptona caseína
1g NaCl
1000ml água destilada
(pH 7,4)

7.1.10 Meio de Cultura Manitol

10g Manitol
10g Peptona caseína
1g NaCl
1000ml água destilada
(pH 7,4)

7.1.11 Meio de Cultura Metyl- β -Dglucopyranoside (MGP)

10g MGP
10g Peptona caseína
1g NaCl
1000ml água destilada
(pH 7,4)

7.1.12 Meio de Cultura Piruvato

10g Piruvato
5g extrato de fungo
5g K₂HPO₄ (potássio fosfato dibásico)
5g NaCl
1000ml água destilada
Azul de Bromotimol (10 gotas)

7.1.13 Meio de Cultura NaCl

65g NaCl
1g glicose
37g BHI caldo
Púrpura de Bromocresol (10 gotas)

7.1.14 Meios de Cultura Arginina e Controle

7.1.14.1 Arginina

10g arginina
5g peptona de carne
3g extrato de levedura
1g glicose
pH 6,5

7.1.14.2 Controle

5g peptona de carne
3g extrato de levedura
1g glicose
pH 6,5

7.1.15 Solução Salina 0,9%

90g NaCl
1000ml água destilada

7.1.16 Tampão TAE 50X

242g de Tris
57,1 ml ác.acético glacial
100 ml EDTA 0,5m Ph 8,0
1000 ml água destilada

7.1.17 Tampão TAE 1X

20 ml TAE 50X
980 ml de água destilada

7.1.18 Oligonucleotídeos iniciadores

Os Oligonucleotídeos iniciadores foram diluídos em milliQ (100ng/ μ l) e estacados à -20°C .

7.1.19 dNTPS(desoxiriibonucleotídeos trifosfatados)

Os dNTPS (LUDWIG) foram diluídos a uma concentração de 2,5 mM, em cada, em água milli-Q e estocados a -20°C .

7.1.20 Tampão de amostra

0,25% (p/v) azul de bromofenol

40% (p/v) sacarose em água

7.2 Exigências Nutricionais de Frangos de Corte

Tabela 27 - Exigências Nutricionais de Frangos de Corte Machos de Desempenho Médio¹

		Idade, dias				
		1-7	8-21	22-33	34-42	43-46
Peso Médio	Kg.	0,124	0,463	1,330	2,198	2,675
Ganho	g/dia	19,6	45,8	77,6	87,0	85,7
Consumo	g/dia	23,0	65,8	134,5	178,4	196,1
Exigência Lis.Dig.	g/dia	0,306	0,754	1,443	1,814	1,902
		Nutriente				
Energia Metabolizável	kcal/kg	2,950	3,000	3,100	3,150	3,200
Proteína	%	22,04	20,79	19,41	18,03	17,24
Cálcio	%	0,939	0,884	0,824	0,763	0,728
Fósforo Disponível	%	0,470	0,442	0,411	0,380	0,363
Potássio	%	0,593	0,588	0,590	0,584	0,584
Sódio	%	0,223	0,214	0,205	0,194	0,189
Cloro	%	0,200	0,190	0,180	0,170	0,164
Ácido Linoléico	%	1,081	1,058	1,039	1,011	0,999
		Aminoácido Digestível				
Lisina	%	1,330	1,146	1,073	1,017	0,970
Metionina	%	0,519	0,447	0,429	0,407	0,388
Metionina + Cistina	%	0,944	0,814	0,773	0,732	0,698
Triptofano	%	0,213	0,183	0,182	0,173	0,165
Treonina	%	0,865	0,745	0,697	0,661	0,631
Arginina	%	1,397	1,203	1,127	1,068	1,019
Valina	%	0,998	0,860	0,826	0,783	0,747
Isoleucina	%	0,865	0,745	0,719	0,681	0,650
Leucina	%	1,436	1,238	1,170	1,109	1,057
Histidina	%	0,479	0,413	0,386	0,366	0,349
Fenilalanina	%	0,838	0,722	0,676	0,641	0,611
Fenilalanina + Tirosina	%	1,530	1,318	1,234	1,170	1,116
		Aminoácido Total				
Lisina	%	1,466	1,263	1,183	1,121	1,069
Metionina	%	0,572	0,493	0,473	0,448	0,428
Metionina + Cistina	%	1,041	0,897	0,852	0,807	0,770
Triptofano	%	0,235	0,202	0,201	0,191	0,182
Treonina	%	0,997	0,859	0,804	0,762	0,727
Arginina	%	1,495	1,288	1,207	1,143	1,090
Glicina + Serina	%	2,199	1,895	1,656	1,569	1,443
Valina	%	1,114	0,960	0,923	0,874	0,834
Isoleucina	%	0,968	0,834	0,804	0,762	0,727
Leucina	%	1,583	1,364	1,289	1,222	1,165
Histidina	%	0,528	0,455	0,426	0,404	0,385
Fenilalanina	%	0,924	0,796	0,745	0,706	0,673
Fenilalanina + Tirosina	%	1,671	1,440	1,349	1,278	1,219

¹ A porcentagem do nutriente foi determinada utilizando: Tabela 21 (Exigência de lis. dig. de acordo com o desempenho), Tabela 24 (Relação aminoácido / lisina) e Tabela 25 (Equações - % nutriente / Mcal. EM). A exigência de Lisina Total foi calculada considerando a digestibilidade verdadeira da lisina como sendo em média de 90,7%.

Tabela 30 - Exigências Nutricionais de Frangos de Corte Fêmeas de Desempenho Médio¹

		Idade, dias				
		1-7	8-21	22-33	34-42	43-46
Peso Médio	Kg.	0,123	0,442	1,189	1,874	2,228
Ganho	g/dia	18,9	41,7	63,3	65,3	63,0
Consumo	g/dia	22,5	61,1	117,5	148,6	159,8
Exigência Lis.Dig.	g/dia	0,296	0,688	1,172	1,343	1,369
		Nutriente				
Energia Metabolizável	kcal/kg	2.950	3.000	3.100	3.150	3.200
Proteína	%	20,98	19,90	18,74	17,53	16,86
Cálcio	%	0,891	0,839	0,781	0,723	0,691
Fósforo Disponível	%	0,448	0,421	0,391	0,362	0,345
Potássio	%	0,564	0,560	0,560	0,554	0,553
Sódio	%	0,211	0,203	0,195	0,185	0,180
Cloro	%	0,191	0,182	0,172	0,162	0,156
Ácido Linoléico	%	1,040	1,003	0,985	0,959	0,947
		Aminoácido Digestível				
Lisina	%	1,316	1,126	0,997	0,904	0,857
Metionina	%	0,513	0,439	0,399	0,362	0,343
Metionina + Cistina	%	0,934	0,799	0,718	0,651	0,617
Triptofano	%	0,211	0,180	0,169	0,154	0,146
Treonina	%	0,855	0,732	0,648	0,588	0,557
Arginina	%	1,382	1,182	1,047	0,949	0,900
Valina	%	0,987	0,845	0,768	0,696	0,660
Isoleucina	%	0,855	0,732	0,668	0,606	0,574
Leucina	%	1,421	1,216	1,087	0,985	0,934
Histidina	%	0,474	0,405	0,359	0,325	0,309
Fenilalanina	%	0,829	0,709	0,628	0,570	0,540
Fenilalanina + Tirosina	%	1,513	1,295	1,147	1,040	0,986
		Aminoácido Total				
Lisina	%	1,450	1,241	1,099	0,997	0,945
Metionina	%	0,566	0,484	0,440	0,399	0,378
Metionina + Cistina	%	1,030	0,881	0,791	0,718	0,680
Triptofano	%	0,232	0,199	0,187	0,169	0,161
Treonina	%	0,986	0,844	0,747	0,678	0,643
Arginina	%	1,479	1,266	1,121	1,017	0,964
Glicina + Serina	%	2,175	1,862	1,539	1,396	1,276
Valina	%	1,102	0,943	0,857	0,778	0,737
Isoleucina	%	0,957	0,819	0,747	0,678	0,643
Leucina	%	1,566	1,340	1,198	1,087	1,030
Histidina	%	0,522	0,447	0,396	0,359	0,340
Fenilalanina	%	0,914	0,782	0,692	0,628	0,595
Fenilalanina + Tirosina	%	1,653	1,415	1,253	1,137	1,077

¹ A porcentagem do nutriente foi determinada utilizando: Tabela 21 (Exigência de lis. dig. de acordo com o desempenho), Tabela 24 (Relação aminoácido / lisina) e Tabela 25 (Equações - % nutriente / Mcal. EM). A exigência de Lisina Total foi calculada considerando a digestibilidade verdadeira da lisina como sendo em média de 90,7%.

(Rostagno et al., 2005)

8. VITA

8.1 Dados Pessoais:

Nome: Ana Paula Vaz Cassenego

Endereço: Trav. Comendador Batista, 62/503. Bairro: Cidade Baixa.

CEP: 90050-150, Porto Alegre, RS

Telefone: (51) 93597109

E-mail: ana.cassenego@ufrgs.br

8.2 Formação Acadêmica/Titulação:

2008-2010: Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente- Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

2002-2008: Faculdade de Medicina Veterinária- Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

1999-2001: E.E.E.M. Cilon Rosa- Santa Maria- RS.

1990-1998: E.E.E.F. Marieta d'Ambrósio- Santa Maria- RS.

8.3 Atuação Profissional:

2007: Estagiária do Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva (HCV)- UFRGS.

2006-2007: Estagiária do Laboratório de Bacteriologia (LABAC)- UFSM.

2004-2006: Bolsista de Iniciação Científica do Laboratório Central de Diagnósticos de Patologia Aviária (LCDPA)- UFSM.