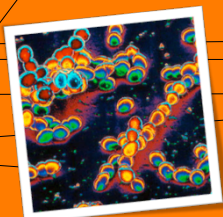


Estará o uso de cobre a contribuir para a selecção de bactérias resistentes aos antibióticos na produção animal e em humanos?



Eduarda Silveira^{1*}, Ana R. Freitas¹, Patrícia Antunes^{1,4}, Teresa M. Coque³, Luísa Peixe¹, Carla Novais^{1,2**}

¹REQUIMTE. Faculdade de Farmácia. Universidade do Porto. Portugal

²CEBIMED. Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade Fernando Pessoa. Porto. Portugal.

³Servicio de Microbiología. Hospital Ramón y Cajal. Madrid. Espanha.

⁴Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação. Universidade do Porto. Portugal



*eduardamorenosilveira@gmail.com

**cnovais@ufp.edu.pt

Introdução e Objectivos

O uso massivo de antibióticos (AB) tem contribuído para a selecção de bactérias resistentes em diferentes nichos ecológicos. Adicionalmente, tem sido sugerido que outros compostos como metais, antisépticos e desinfetantes também podem contribuir para a selecção e manutenção de genes de resistência aos AB e/ou dos elementos genéticos móveis (ex: plasmídeos) que os transportam (Hasman *et al.*, 2006; SCENIHR, 2009).

O cobre (Cu) tem sido utilizado como antiséptico, preservante e ainda como promotor de crescimento animal (Hasman *et al.*, 2009). Embora seja um elemento essencial para os organismos vivos, em altas concentrações é citotóxico devido à produção de radicais livres (Soliz *et al.*, 2003). Muitas bactérias utilizam um mecanismo de homeostase de forma a manter concentrações intracelulares de Cu ideais (Stoyanov *et al.*, 2010). Outras possuem ainda mecanismos de resistência adicionais que lhes permitem sobreviver a concentrações elevadas deste metal.

A resistência adquirida ao Cu em *Enterococcus* tem sido associada ao gene *tcrB* (codifica para uma bomba de efluxo) e raramente ao gene *cueO* (codifica para uma oxidase) (Hasman *et al.*, 2006, Willems *et al.*, 2010). A presença destes genes em *Enterococcus* de diversos nichos ecológicos é ainda desconhecida.

Este trabalho teve como objectivo analisar a ocorrência e distribuição dos genes de resistência ao cobre (Cu^R), *tcrB* e *cueO*, em *Enterococcus* spp de diferentes nichos ecológicos e avaliar a sua co-localização e co-transferência com genes de resistência a antibióticos.

Material e Métodos

Isolados bacterianos. Foram estudados 667 *Enterococcus* spp (274 *E. faecium*, 226 *E. faecalis* e 167 *Enterococcus* spp) isolados de suínos e ambiente de suiniculturas de produção intensiva, frangos disponíveis para o consumidor em talhos, fezes de humanos saudáveis, águas de esgotos hospitalares e urbanos e isolados clínicos.

Caracterização da resistência aos antibióticos. Foi avaliada a susceptibilidade a 12 antibióticos de diferentes famílias pelos métodos de diluição em agar e difusão por discos, segundo as normas do CLSI (CLSI, 2010). Pesquisou-se a presença de genes que codificam para a resistência aos glicopéptidos (*vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2*), macrolídeos (*ermA*, *ermB*, *ermC*), tetraciclina (*tetM*, *tetL*, *tetO*, *tetK*, *tetS*) e aminoglicosídeos (*aac(6')*-*le-aph(2')*, *aph2-1b*, *aph2-1c*, *aph2-1d*) por PCR (Aarestrup *et al.*, 2000; Novais *et al.*, 2005).

Pesquisa de genes de resistência ao cobre. A detecção dos genes *tcrB* e *cueO* foi realizada por PCR utilizando primers previamente descritos ou desenhados para este estudo (Hasman *et al.*, 2006; CueOF-ccttagcggtgtttcattca; CueOR-tcattgtcaaggaacacaa).

Clonalidade e localização genética de genes de resistência ao cobre. A clonalidade foi estudada por *Pulsed-Field-Gel-Electrophoresis* (PFGE/*SmaI*) em isolados representativos de diferentes nichos, perfis de resistência a AB e genes de Cu^R (Tenover *et al.*, 1995; Novais *et al.*, 2005). A co-localização dos genes Cu^R e AB^R em plasmídeos foi estudada por hibridação com sondas específicas (*tcrB*, *cueO*, *tetM*, *tetL*, *ermB*, *pbp5*) em DNA submetido a restrição com S1 e separado por PFGE (Novais *et al.*, 2005).

Co-transferência de genes de resistência a antibióticos e cobre. Os ensaios de conjugação foram realizados em isolados representativos *tcrB*⁺ (n=1) e *tcrB*+*cueO* (n=18) de diferentes espécies, nichos e perfis AB^R. Foram utilizadas como receptoras as bactérias *E. faecalis* JH2.2, *E. faecium* BM4105 RF e *E. faecium* GE-1 que estavam na proporção de 1:1 com as bactérias dadoras. Os transconjugantes foram seleccionados em BHI suplementado com ácido fusídico, rifampicina e/ou vancomicina, tetraciclina, eritromicina, gentamicina ou ampicilina.

Conclusões

- Este estudo demonstra que o nicho animal (onde se consome maior quantidade de sulfato de cobre) é o principal reservatório de *Enterococcus* com genes de resistência ao cobre.
- Os genes de resistência ao cobre encontram-se frequentemente co-localizados nos mesmos plasmídeos que transportam genes de resistência à tetraciclina e eritromicina, antibióticos comumente utilizados em veterinária e na terapêutica humana.
- O uso do Cobre no ambiente de produção animal pode favorecer a selecção de *Enterococcus* resistentes aos antibióticos que, através da cadeia alimentar (expansão clonal e/ou disseminação de elementos genéticos móveis), pode contribuir para a ocorrência de estirpes resistentes aos antibióticos no Homem.

Referências Bibliográficas

Aarestrup FM, *et al.* 2000. DMD. 37:127-37. Cavaco *et al.*, 2011. J. VMA. 150 (3-4):344-348. CLSI. Approved standard. M100-S17. CLSI, Wayne, PA; Freitas *et al.*, 2011. JCM. 49(3):925-931; Gomez *et al.*, 2011. JMM. 301:165-175; Hasman *et al.*, 2002. AAC. 46:1410-1416; Hasman *et al.*, 2006. AEM. 72:5784-5789; Hasman *et al.*, 2009. JMM. 78:20-24; Novais *et al.*, 2005. JAC. 56:1139-1143; SCENIHR. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides. 2009. http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihir/docs/scenihir_o_021.pdf; Soliz *et al.*, 2003. FEMS. 27:183-195; Stoyanov *et al.*, 2010. FEMS. 302:69-75; Tenover *et al.*, 1995. JCM. 33(9):2233-2239; Schalk *et al.*, 2010. BMC. 11:239.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado por Universidade do Porto/Santander Totta "Projectos Pluridisciplinares 2010; Eduarda Silveira recebeu uma bolsa de doutoramento da Fundação para a Ciência e Tecnologia (FRHR/BD/63955/2009).

Resultados

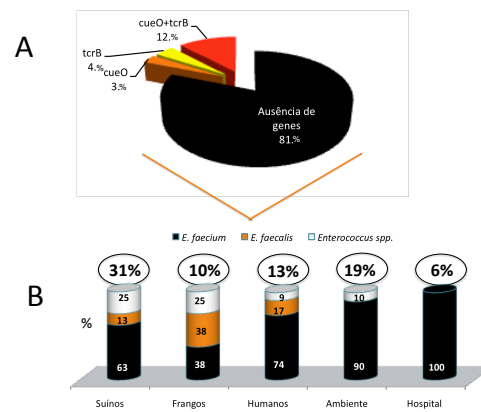


Fig. 1. Incidência dos genes de resistência ao cobre nos isolados estudados (A) e sua distribuição por espécies e nichos ecológicos (B). Na imagem B as percentagens envolvidas por círculos correspondem à incidência global de *Enterococcus* com genes de resistência ao cobre em cada nicho ecológico. Dentro de cada coluna está representada a distribuição dos genes de resistência ao cobre pelas diferentes espécies isoladas em cada nicho ecológico.

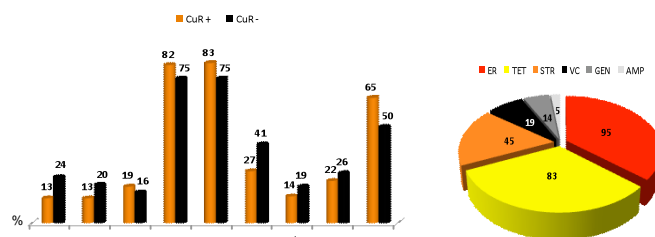


Fig. 2. Percentagem de genes de resistência aos antibióticos de *Enterococcus* portadores e não portadores de genes Cu^R. Vc- vancomicina, Tc- tetraciclina, Amp- ampicilina, Tet- tetraciclina, Ery- eritromicina, Cip- ciprofloxacina, Cl- cloramfenicol, Gent- HLR- gentamicina, Str- HLR- estreptomicina, CuR⁺- portadores de *tcrB* e/ou *cueO*; CuR⁻- não portadores de *tcrB* e/ou *cueO*.

Fig. 3. Percentagem de transconjugantes com genes Cu^R que adquiriram simultaneamente genes de resistência aos antibióticos. ER- eritromicina, TET- tetraciclina, STR- HLR- estreptomicina, VC- vancomicina, GEN- HLR- gentamicina, AMP- ampicilina.

Tabla 1. Localización de genes de resistencia ao cobre e antibióticos em *Enterococcus* de diferentes espécies, nichos e clones

Espécies	PFGE (subtí po)	No. Isolados	Origem/Amostra	Tamanho e conteúdo plasmídico
<i>E. faecium</i>	A (4)	6	Suminicultura D. E. F (fezes de suínos e ambiente, n=5); isolado clínico (n=1)	180kb (<i>tcrB</i> - <i>ermB</i>) ou 180kb (<i>tcrB</i> - <i>ermB</i>) e 25kb (<i>tetM</i> - <i>tetL</i> - <i>ermB</i>)
	SN208 (1)	3	Suminicultura B (ambiente)	180kb (<i>tcrB</i> - <i>ermC</i>) e 70kb (<i>tetM</i> - <i>tetL</i> - <i>ermB</i>)
	SN226 (2)	3	Suminicultura C (ambiente)	190kb (<i>tcrB</i> - <i>tetM</i> - <i>tetL</i> - <i>ermB</i>) e 25kb (<i>tetM</i> - <i>tetL</i> - <i>ermB</i>), ou 190kb (<i>tcrB</i> - <i>cueO</i> - <i>tetM</i> - <i>tetL</i> - <i>ermB</i>)
	SN215	1	Suminicultura F (ambiente)	200kb (<i>tcrB</i>) e 60kb (<i>tetL</i> - <i>ermB</i>)
	SN216	1	Suminicultura E (fezes de suínos)	230kb (<i>tcrB</i> - <i>ermB</i>)
	SN231	1	Suminicultura C (ambiente)	180kb (<i>tcrB</i> - <i>ermC</i> - <i>ermB</i>)
	SN241	1	Suminicultura A (ambiente)	300kb (<i>cueO</i> - <i>ermB</i>) e 50kb (<i>tetM</i> - <i>tetL</i>)
	SN242	1	Suminicultura C (ambiente)	300kb (<i>cueO</i> - <i>ermB</i>) e 50kb (<i>tetM</i> - <i>tetL</i> - <i>aac6-aph2</i>)
	ET	1	Esgoto hospitalar A	240kb (<i>tcrB</i> - <i>ermB</i> - <i>ermB</i>)
	EU	1	Esgoto hospitalar B	210kb (<i>tcrB</i> - <i>ermC</i> - <i>ermB</i>) e 50kb (<i>tetM</i> - <i>tetL</i>)
	ES	1	Esgoto hospitalar B	220kb (<i>tcrB</i> - <i>ermC</i> - <i>ermB</i>)
	EA	1	Esgoto hospitalar C	300kb (<i>tcrB</i> - <i>ermC</i> - <i>ermB</i>)
	<i>E. faecalis</i>	CD	1	Humanos saudáveis A (fezes)
CE		1	Humanos saudáveis B (fezes)	210kb (<i>tcrB</i> - <i>ermC</i> - <i>ermB</i>)
CF		1	Humanos saudáveis C (fezes)	300kb (<i>tcrB</i>)
CB		1	Humanos saudáveis D (fezes)	200kb (<i>tcrB</i> - <i>ermC</i> - <i>ermB</i>)
CH		1	Humanos saudáveis E (fezes)	210kb (<i>tcrB</i> - <i>ermC</i> - <i>ermB</i>)
<i>E. faecalis</i>	SN227	3	Suminicultura C (ambiente)	120kb (<i>tcrB</i> - <i>ermC</i> - <i>ermB</i>) e 50kb (<i>tetM</i> - <i>tetL</i>)