

AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *ENTEROCOCCUS* SP. ISOLADOS DE FRANGOS DE CORTE

Casseneo, A.P.V.¹; Spadari, C.²; D'azevedo, P.A.³; Frazzon, J.⁴; Van Der Sand, S. T.⁵; Frazzon, A.P.G.⁵

¹Estudante do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente- UFRGS; E-mail: ana.casseneo@ufrgs.br; ²Estudante de Iniciação Científica do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia- UFRGS; ³Professor do Departamento de Microbiologia- UFCSPA; ⁴Professor do Instituto de Ciências e Tecnologia dos Alimentos- UFRGS; ⁵Professor do Departamento de Microbiologia- UFRGS

Resumo- Bactérias comensais do intestino de frangos tornaram-se objeto de estudos, pois a alta taxa de exportação desses produtos tem aumentado a preocupação com a qualidade e a sanidade de granjas quanto à nutrição animal, ganho de peso e doenças infecciosas. O objetivo do estudo foi verificar fenótipo e genótipo de resistência antimicrobiana em isolados de *Enterococcus* sp.. Suabes cloacais de frangos de corte foram utilizados para isolamento de *Enterococcus* sp.. Os frangos foram submetidos a diferentes dietas contendo promotores de crescimento e coccidiostáticos ionóforos e divididos em grupos conforme tratamento empregado. Foram utilizados 240 isolados de *Enterococcus* sp. determinantes dos perfis de susceptibilidade a diversos antimicrobianos e testados para a presença de genes de resistência à tetraciclina e macrolídeos. Do total de isolados, 98% apresentaram-se resistentes à bacitracina, 92,5% foram resistentes 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. Do total de isolados resistentes à tetraciclina, 94% e 30%, continham os genes *tetM* e *tetL*, respectivamente. Dos isolados resistentes a eritromicina, 97,9% possuíam o gene de resistência *ermB*. Não houve correlação das diferentes dietas para frangos de corte no fenótipo e genótipo de resistência antimicrobiana de isolados de *Enterococcus*.

Palavras-chave: *Enterococcus* sp.; frangos de corte; dietas; resistência antimicrobiana.

Introdução

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 (Shepard & Gilmore, 2002). 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 (Garcia et al., 2002).

Uma ampla diversidade de antimicrobianos pode ser administrada oralmente em vários níveis subterapêuticos (Schwarz et al., 2001). Conseqüentemente, a presença de microrganismos resistentes em animais produtores de alimentos e a possível contaminação de sua carcaça tornaram-se aspectos importantes em termos de sanidade animal e de saúde pública (Moreno et al., 2006). Para tanto, restrições no 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 imunoestimuladores. O objetivo do estudo foi avaliar a influência de diferentes dietas para frangos de corte no perfil de resistência a antimicrobianos em isolados de *Enterococcus* sp..

Materiais e Métodos

Frangos de corte foram submetidos a dietas contendo promotores de crescimento e coccidiostático ionóforo e divididos em grupos conforme o tratamento empregado. Amostras de suabes cloacais foram realizadas e utilizadas para o isolamento de *Enterococcus* sp.

Os isolados foram confirmados fenotípica e genotipicamente por PCR para amplificação do gene *tuf* para o gênero *Enterococcus* sp. e submetidos à identificação bioquímica para determinação de espécie. O perfil de resistência das cepas isoladas foi determinado pelo método de difusão de disco antimicrobiano em Ágar Muller Hinton testados para os seguintes antimicrobianos: ampicilina, penicilina, eritromicina, cloranfenicol, nitrofurantoína, ciprofloxacina, bacitracina, vancomicina, rifampicina e tetraciclina. Em seguida, o DNA genômico de *Enterococcus* sp. foi extraído utilizando-se o método de lise térmica e PCR foram realizadas para verificar a presença dos genes *tetM*, *tetL* e *ermB*.

Resultados e Discussão

Ao todo 240 *Enterococcus* sp. foram isolados, identificados bioquimicamente e confirmados para gênero por PCR para gene *tuf*. Todos os 240 isolados utilizados 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. 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% a esses 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 frequentemente entre isolados de *E. faecalis* do que entre *E. faecium*, tanto do ambiente de produção quanto de produtos de carne crua. Observou-se nos grupos que não receberam antimicrobiano suplementado na ração, uma elevada prevalência de *Enterococcus* sp. 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).

Dos 97 isolados que apresentaram fenótipo de resistência à eritromicina, 97,9% apresentavam o gene *ermB*. 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* sp. (Aarestrup et al., 2000). O gene *tetM* foi encontrado em 94% dos 217 isolados que foram resistentes à tetraciclina, e o gene *tetL* foi detectado em 30% dos *Enterococcus* sp. isolados resistentes ao mesmo antimicrobiano. Dos isolados positivos para o gene *tetM*, 41,17% continham também o gene *ermB*. A alta ocorrência de *Enterococcus* sp. 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.

Conclusões

Observou-se 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 *tetM*, *ermB* e *tetL* foram detectados entre os isolados, no entanto, não houve correlação entre o perfil de resistência e a presença dos genes *tetM*, *ermB* e *tetL* nos isolados de *Enterococcus* sp. com as diferentes dietas empregadas nos frangos de corte.

Apoio

CNPq- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

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**. 37, 127-137, 2000.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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**. 69, 7153-7160, 2003.
- MORENO, M.R.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E.; DEVUYST, L. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**. 106,1-24, 2006.
- SCHWARZ, S.; KEHRENBERG, C.; WALSH, T.R. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. **International Journal of Antimicrobial Agents**. 17, 431-437, 2001.
- SHEPARD, B.D.; GILMORE, M.S. Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. **Microbes Infections**. 4, 215-224, 2002.