



Resistência a antimicrobianos em enterococos isolados de amostras de fezes de suínos*

Antimicrobial resistance analysis among enterococci isolated from pig feces

Adriana de Abreu Corrêa¹, Daiane Bopp Fuentefria² & Gertrudes Corção^{1,2}

RESUMO

Nos últimos anos, os enterococos têm sido considerados importantes patógenos nosocomiais associados a infecções de difícil tratamento, devido a multiresistência a antimicrobianos. Frequentes ocorrências de enterococos multiresistentes têm sido reportadas em amostras de origem animal, as quais atuam como reservatórios destas linhagens e contribuiriam para disseminação desta resistência através da cadeia alimentar. O presente estudo teve como objetivo comparar a resistência a 11 antimicrobianos em 85 isolados de *Enterococcus* provenientes de fezes de suínos arraçoados e em 88 isolados provenientes de suínos não arraçoados. No primeiro grupo foram isolados *E. faecalis* (21), *E. faecium* (18), *E. hirae* (9), *E. durans* (30) e *E. mundtii* (7) e no segundo grupo, *E. faecalis* (27), *E. faecium* (17), *E. durans* (1) e *E. mundtii* (43). Entre os *Enterococcus* spp. isolados de amostras de fezes de suínos arraçoados, foi observada uma maior porcentagem de cepas resistentes e a multiresistência entre estes isolados foi de 3 a 6 antimicrobianos, enquanto que entre os não arraçoados foi de 3 a 4 antimicrobianos. As diferenças na predominância de espécies e perfil de resistência entre as diferentes amostras pode estar relacionado à dieta alimentar dos animais.

Descritores: *Enterococcus*, resistência, multiresistência, antimicrobianos, cadeia alimentar.

ABSTRACT

In the last years, enterococci have been considered as important nosocomial pathogens, associated with infections difficult to treat due to their resistance to several antimicrobials. Frequent occurrences of multiresistant enterococci have been reported among animal origin samples, which could act as reservoir of these resistant strains and contribute to the spread of antibiotic resistance through the food chain. The aim of the present study was to compare the antimicrobial resistance against 11 antibiotics on 85 isolates of *Enterococcus* isolated from pig feces, fed with supplemented feed, and on 88 isolates from pig feces, fed with nonsupplemented feed. In the first group, isolates of *E. faecalis* (21), *E. faecium* (18), *E. hirae* (9), *E. durans* (30) and *E. mundtii* (7) were isolated and in the second group, *E. faecalis* (27), *E. faecium* (17), *E. durans* (1) and *E. mundtii* (43) were found. Among the *Enterococcus* spp. isolated from the supplemented feed pig, higher percentages of resistance were observed and multiple resistance was between three and six antibiotics, while among the nonsupplemented pigs, it was between three and four antibiotics. The differences on the species predominance and antibiotic resistance pattern among the samples can be related to the animal diet.

Key words: *Enterococcus*, resistance, multiple resistance, antimicrobials, food chain.

INTRODUÇÃO

O gênero *Enterococcus* pode ser encontrado em diversos ambientes, como solo, água, plantas e animais, é capaz de sobreviver em ambientes salinos, em concentrações de 6,5% de NaCl, em pH 9,6 e em temperaturas que variam de 10°C a 45°C [6,9]. A causa específica para o interesse em patogenias causadas por *Enterococcus* é seu amplo espectro de resistência a antimicrobianos e sua participação na disseminação desta resistência na cadeia alimentar [3,4,9].

A transferência de genes de resistência já foi identificada entre cepas de *E. faecalis* em águas de tratamento de esgoto, aumentando a possibilidade de se inferir sobre o papel de cepas ambientais na disseminação destes genes [6,7]. Além disso, *Enterococcus* sp. resistentes têm sido frequentemente observados em animais de corte, sugerindo que estes possam ser reservatórios de linhagens resistentes e consequentemente de genes de resistência, os quais podem ser transferidos para humanos através da cadeia alimentar [1, 4,15,16].

A partir desta idéia, o presente trabalho foi desenvolvido com a finalidade de comparar a resistência e multirresistência a antimicrobianos entre cepas de *Enterococcus* sp. provenientes de amostras de suínos arraçoados e de suínos não arraçoados, uma vez que o uso de ração associada a antimicrobianos pode acarretar o aumento de cepas resistentes no meio ambiente.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras

Foram coletadas quatro amostras de fezes de suínos arraçoados, provenientes de uma granja localizada na região do Vale do Taquari, e cinco amostras de fezes de suínos não arraçoados em criações domésticas, localizadas na região rural de Porto Alegre. Estas criações fazem parte do programa PRRO via Sui-nocultura do Departamento Municipal de Lixo Urbano da Prefeitura de Porto Alegre (DMLU-PMPA) com criadores de suínos desta região, no qual o DLMU fornece aos criadores restos de alimento coletados nos restaurantes de Porto Alegre.

Isolamento e identificação dos *Enterococcus* spp.

As amostras de fezes (25 gramas) foram res-suspendidas em 250 mL de solução salina (0,9%) e semeadas em Caldo Azida¹. Após 24h de incubação, de cada tubo com crescimento bacteriano, foram reti-

radas nove alíquotas e inoculadas em nove placas de ágar KF², as quais foram incubadas por 48h a 37°C. As colônias amareladas, esbranquiçadas e punctiformes foram testadas para coloração de Gram e as que apresentaram cocos Gram positivos foram inoculadas em ágar PSE por 48h a 37°C. As colônias de coloração marrom, foram retiradas e armazenadas em ágar inclinado, para posterior identificação de gênero e espécie conforme Facklam & Collins [2].

Para confirmação do gênero *Enterococcus*, foram realizadas quatro provas bioquímicas: produção de catalase, crescimento em NaCl 6,5%, crescimento a 45°C e produção de pirrolidonil arilamidase (PYR³). Para identificação das espécies, foram feitos: teste de fermentação de carboidratos¹ (arabinose, rafinose, manitol, xilose e sorbitol), utilização de piruvato1%⁴, produção de pigmento amarelo, motilidade e descarboxilação da arginina¹. As cepas *E. faecalis* ATCC 29212, *E. hirae* ATCC 10541, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, foram utilizadas como controle positivo nos testes bioquímicos.

Teste de suscetibilidade a antimicrobianos

Os isolados identificados foram testados quanto a suscetibilidade a antimicrobianos pelo método de difusão em ágar, conforme metodologia NCCLS [12], utilizando como controle, a cepa *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Foram testados onze antimicrobianos⁵: cefalotina (30mcg), eritromicina (15mcg), vancomicina (30mcg), estreptomocina (300mcg), rifampicina (30mcg), tetraciclina (30mcg), cloranfenicol (30mcg), cefoxitina (30mcg), gentamicina (120mcg), amicacina (30mcg) e ampicilina (10mcg). A interpretação dos halos de inibição foi realizada conforme normas do NCCLS [12] e os isolados de *Enterococcus* classificados como resistentes ou sensíveis.

RESULTADOS

No presente estudo foram encontrados 85 isolados distribuídas em cinco espécies do gênero *Enterococcus*, a partir das amostras de fezes dos suínos arraçoados e 88 isolados, distribuídos em quatro espécies, das amostras de fezes de suínos não arraçoados (Tabela 1).

Nos testes de suscetibilidade a antimicrobianos, foram obtidos perfis diferentes entre os dois grupos testados (Tabela 2). A resistência à ampicilina, rifampicina, vancomicina e gentamicina não foi observada em ambos os grupos de isolados. Entre os isolados de suínos

Tabela 1. Distribuição das espécies de *Enterococcus* isolados de amostras de fezes de suínos arraçados e não arraçados.

| Origem da amostra | Espécies identificadas | | | | |
|--------------------------------------|------------------------|-------------------|-----------------|------------------|-------------------|
| | <i>E. faecalis</i> | <i>E. faecium</i> | <i>E. hirae</i> | <i>E. durans</i> | <i>E. mundtii</i> |
| Fezes de suínos não arraçados (n=88) | 27 | 17 | – | 1 | 43 |
| Fezes de suínos arraçados (n=85) | 21 | 18 | 9 | 30 | 7 |

arraçados, todos foram resistentes à tetraciclina e entre os isolados de fezes de suínos não arraçados, todos apresentaram-se sensíveis a estreptomomicina, cloranfenicol e tetraciclina.

Na análise de multiresistência em suínos arraçados, todas as espécies, com exceção de *E. durans*, foram multiresistentes a seis antimicrobianos (Figura 1A). Nas cepas de fezes de suínos não-arraçados, a multiresistência foi baixa, sendo máxima na espécie *E. mundtii*, multiresistente para até 4 antimicrobianos (Figura 1B).

DISCUSSÃO

Os resultados diferenciados para o número de isolados de cada espécie estão relacionados às distintas dietas consumidas pelos suínos. Nas duas amostras foram observados *E. faecalis* e *E. faecium*, todavia não foram as espécies predominantes, como encontrado em diversos trabalhos [1,7,9,13]. As espécies *E. faecalis* e *E. faecium* adquirem mais facilmente resistência, portanto são mais prevalentes nas fezes de suínos arraçados [1]. As espécies *E. durans* e *E. hirae* são encontradas em suínos [5,10], todavia não

Tabela 2. Resistência a antimicrobianos para os isolados de *Enterococcus* spp. provenientes de amostras de fezes de suínos arraçados e não arraçados.

| Antimicrobianos testados | Isolados de suínos arraçados (n = 85) | Isolados de suínos não arraçados (n = 88) |
|--------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------------|
| Cefoxitina | 49,50% | 69,30% |
| Cefalotina | 64,50% | 34,00% |
| Cloranfenicol | 2,10% | 0% |
| Tetraciclina | 100% | 0% |
| Amicacina | 97,80% | 6,80% |
| Ampicilina | 0% | 0% |
| Rifampicina | 0% | 0% |
| Vancomicina | 0% | 0% |
| Eritromicina | 98,90% | 36,30% |
| Estreptomomicina | 26,90% | 0% |
| Gentamicina | 0% | 0% |

são predominantes neste tipo de amostra. A predominância de *E. durans* entre os isolados de fezes de suínos arraçados do presente estudo, deve-se, provavelmente, a sua maior resistência aos antimicro-

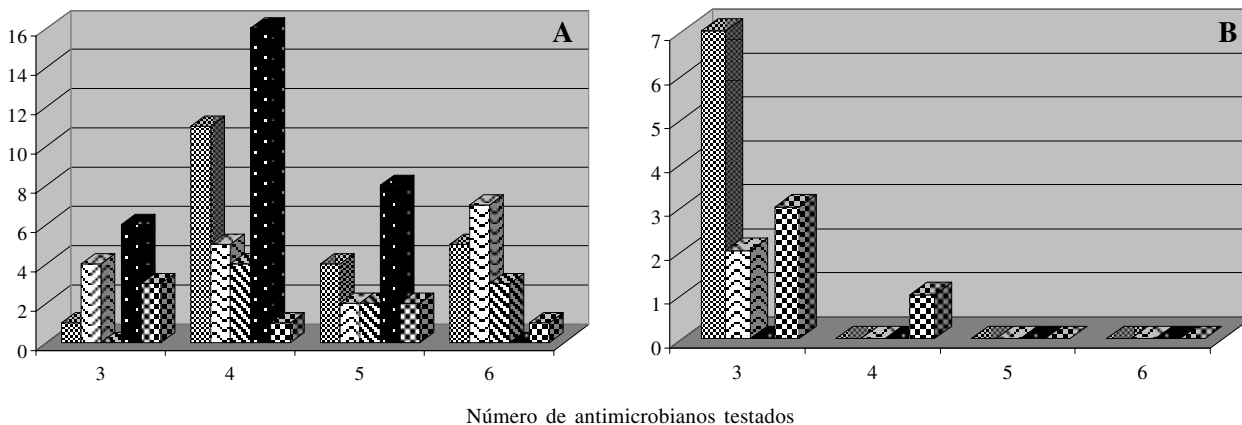


Figura 1. Perfil de multiresistência dos isolados de amostras de fezes de suínos arraçados (A) e de suínos não arraçados (B). No gráfico A estão indicados o número de isolados multiresistentes para as espécies *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. durans* e *E. mundtii*, respectivamente, e no gráfico B, para as espécies *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* e *E. mundtii*, respectivamente.

bianos. *E. mundtii* foi menos predominante em fezes de suínos alimentados com ração suplementada do que entre os suínos alimentados com restos de comida. Como *E. mundtii* não é considerada uma espécie de origem fecal e sim de origem ambiental [8], a predominância destas cepas, pode estar relacionado com a metodologia de coleta das fezes, uma vez que neste grupo as amostras foram coletadas do chão das baias.

A resistência observada para cefoxitina, cefalotina e amicacina nos isolados das duas origens era esperada, pois o gênero *Enterococcus* apresenta resistência intrínseca a algumas cefalosporinas e a baixas concentrações de aminoglicosídeos [11]. A resistência para gentamicina e estreptomicina foi baixa devido às altas concentrações testadas, no entanto, estudos atuais indicam que algumas linhagens de *Enterococcus* têm adquirido resistência a altas concentrações de aminoglicosídeos [14]. Nenhum dos isolados mostrou-se resistente à vancomicina, este resultado é de especial interesse, uma vez que esta resistência tem sido muito observada entre cepas de *E. faecium* de alimentos de origem animal [3,15] e de amostras clínicas e constitui um risco no tratamento de infecções nosocomiais em pacientes imunocomprometidos, causadas por esta espécie [9].

Tetraciclina e eritromicina são alguns dos antimicrobianos utilizados nas rações dos suínos arraçoados do presente estudo, provavelmente por isso uma grande porcentagem das cepas provenientes de tais amostras apresentaram-se resistentes a estes dois agentes. A multiresistência observada entre os isolados das

duas origens apresentou diferenças significativas. O uso de antimicrobianos associados a rações gera uma pressão seletiva resultando em cepas multiresistentes, as quais podem ser liberadas no ambiente e contribuir para a disseminação destes genes [16].

O presente estudo contribuiu para o conhecimento da resistência entre *Enterococcus* spp. isolados de fezes de suínos, a qual é pouca estudada uma vez que esta bactéria não está vinculada a infecções neste hospedeiro. Todavia, existe uma preocupação cada vez maior com a participação destas espécies na disseminação de genes de resistência através da cadeia alimentar e no ambiente, sendo que muitas vezes o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento pode contribuir para este fenômeno.

Agradecimentos. À Marcia Maria Nascimento de Almeida, Coordenadora do PPRRO via Suinocultura da Divisão Municipal de Limpeza Urbana, DMLU-PMPA e à Profa Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária - UFRGS, pela colaboração na obtenção das amostras. À CAPES, pelo financiamento do projeto; ao CNPq, pelo financiamento das bolsas de Mestrado; e à Pró Reitoria de Pesquisa-UFRGS, pelo financiamento da bolsa de Iniciação Científica.

NOTAS INFORMATIVAS

¹VETEC Química Fina Ltda, Rio de Janeiro/Brasil.

²Oxoid Ltd, Hampshire/England.

³PROBAC do Brasil Produtos bacteriológicos, São Paulo/Brasil.

⁴SIGMA - ALDRICH, St Louis/USA.

⁵DME - Diagnósticos Microbiológicos Especializados, Araçatuba/Brasil

REFERÊNCIAS

- 1 Aarestrup F.M., Hasman H., Jensen L.B., Moreno M., Herrero I.A., Dominguez L., Finn M. & Franklin A. 2002. Antimicrobial Resistance among Enterococci from Pigs in Three European Countries. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 4127-4129.
- 2 Facklam R.R. & Collins M.D. 1989. Identification of Enterococcus species isolated from human infections by a conventional test scheme. *Journal of Clinical Microbiology*. 27: 731-734.
- 3 Franz C.M.A.P., Muscholl-Silberhorn A.B., Yousif N.M., Vancanneyt M., Swings J. & Holzapfel W.H. 2001. Incidence of Virulence Factors and Antibiotic Resistance among Enterococci Isolated from Food. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 4385-4389.
- 4 Giraffa G. 2002. Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews*. 26: 163-171.
- 5 Godfree A.F., Kay D. & Wyer M.D. 1997. Faecal streptococci as indicator of faecal contamination in water. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*. 83: 110-119.
- 6 Harwood V.J., Whitlock J. & Withington V. 2000. Classification of Antibiotic Resistance Patterns of Indicator Bacteria by Discriminant Analysis: Use in Predicting the Source of Faecal Contamination in Subtropical Waters. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 3698-3704.
- 7 Junco M.T.T., Martin M.G. & Toledo M.L.P. 2001. Identification and antibiotic resistance of faecal enterococci isolated from water samples. *International Journal of Hygienic and Environmental Health*. 203: 363-368.

- 8 **Klein G. 2003.** Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *International Journal of Food Microbiology*. 88: 123-131.
- 9 **Kühn I., Iversen A., Burman L.G., Olsson-Liljequist B., Franklin A., Finn M., Aarestrup F., Seyfarth A.M., Blanch A.R., Vilanova X., Taylor, H., Caplin J., Moreno M.A., Dominguez L., Herrero I.A. & Möllby R. 2003.** Comparison of enterococcal populations in animals, humans and the environmental - a European study. *International Journal of Food Microbiology*. 88: 133-145.
- 10 **Leclerc H., Devriese L.A. & Mossel D.A.A. 1996.** A Review: Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: consequence on their use as indicators of faecal contamination in drinking water. *Journal of Applied Bacteriology*. 81: 459-466.
- 11 **Morrison D., Woodford N. & Cookson B. 1997.** Enterococci as emerging pathogens of humans. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*. 83 (Suppl): 89-99
- 12 **National Committee For Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2000.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Tenth Informational Supplement, M100-S10(M2). Wayne, Pa. 54p.
- 13 **Pinto B., Pierotti R., Canale G. & Reali D. 1999.** Characterization of 'Faecal Streptococci' as indicators of faecal pollution and distribution in the environment. *Letters in Applied Microbiology*. 29: 258-263.
- 14 **Rice E.W., Messer J.W., Johnson C.H. & Reasoner D.J. 1995.** Occurrence of High-Level Aminoglycoside Resistance in Environmental Isolate of Enterococci. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 374-376.
- 15 **Sakai Y., Tsukahara T. & Ushida K. 2003.** Isolation of vancomycin-resistant enterococci from pigs in Japan. *Animal Science Journal*. 74: 521-523.
- 16 **Sengeløv G., Sørensen B.H. & Aarestrup F. 2003.** Susceptibility of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecium* isolated from pigs and broiler chickens to tetracycline degradation products and distribution of tetracycline resistance determinants in *E. coli* from food animals. *Veterinary Microbiology*. 95: 91-101.