

Simone Quintão Silva

Detecção e identificação de genes de resistência aos antimicrobianos e de virulência em
Enterococcus spp. isolados de alimentos e de amostras clínicas

São José do Rio Preto-SP
Outubro/2016

Simone Quintão Silva

Detecção e identificação de genes de resistência aos antimicrobianos e de virulência em
Enterococcus spp. isolados de alimentos e de amostras clínicas

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mara Corrêa Lelles Nogueira

São José do Rio Preto - SP
Outubro/2016

Silva, Simone Quintão.

Detecção e identificação de genes de resistência aos antimicrobianos e de virulência em *Enterococcus* spp. isolados de alimentos e de amostras clínicas/ Simone Quintão Silva.-- São José do Rio Preto, 2016

99 f. : il., tabs.

Orientadora: Mara Corrêa Lelles Nogueira

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júliode Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia industrial. 2. Virulência (Microbiologia)
3. *Enterococcus*. 4. Agentes anti-infecciosos. 5. Drogas - Resistência em microrganismos. 6. Carne – Microbiologia. 7. Queijo minas frescal - Microbiologia. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 663.1

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Simone Quintão Silva

Detecção e identificação de genes de resistência aos antimicrobianos e de virulência em
Enterococcus spp. isolados de alimentos e de amostras clínicas

Tese apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto
ao Programa de Pós-Graduação Microbiologia, do
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Mara Corrêa Lelles Nogueira
UNESP - São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Dirce Yorika Kabuki
UNICAMP - Campinas

Prof^a. Dr^a. Mariza Landgraf
USP - São Paulo

Prof^a. Dr^a. Fátima Pereira de Souza
UNESP - São José do Rio Preto

Prof. Dr. Aripuanã Sakura Aranha Watanabe
FAMERP - Rio Preto

São José do Rio Preto
17 de outubro de 2016

Aos meus pais Antônio da Silva e Regina Maria Quintão Silva,
ao meu marido Fernando França da Cunha
e as minhas filhas Luísa Silva Cunha e Elisa Silva Cunha,
dedico esta realização!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força para prosseguir nessa caminhada e por mais esta realização.

Ao meu marido Fernando França da Cunha, pelo amor, carinho, empenho e ajuda durante todo este tempo. E as nossas filhas, Luísa Silva Cunha e Elisa Silva Cunha que me deram uma força incrível que impulsionaram este trabalho.

Aos meus pais Antônio da Silva e Regina Maria Quintão Silva e ao meu irmão Antônio José da Silva, pelo incentivo e apoio para minha formação.

À Professora Mara Corrêa Lelles Nogueira pela orientação, dedicação, compreensão, oportunidade de realizar este trabalho e ajuda durante toda minha caminhada.

À comissão examinadora pela disponibilidade e sugestões.

Ao Professor Maurício Lacerda Nogueira pelos esclarecimentos e por disponibilizar o Laboratório de Pesquisa em Virologia para a realização de parte deste trabalho.

Ao Tiago Casella, pela amizade, colaboração, “caronas” e ensinamentos aos quais sempre pude recorrer.

A Naiady Konno Madela, estagiária super dedicada, pela amizade, companheirismo e ajuda na condução dos experimentos.

A Juliana Tiemi Takahashi e Evelin Rodrigues Martins pela amizade, apoio e parceria dentro e fora do laboratório.

A Milena, Fernanda, Alessandra, Luana, Gislaine, Máira, Luciângela, Maisa, Carol, Maira Tomaz, Letícia, Leticinha e Tábata, pela amizade e agradável convivência.

A Ulcilea, Daniella e Meire, pela amizade e valioso companheirismo.

A todos os funcionários da FAMERP e UNESP pela dedicação e assistência durante todo o meu trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Virologia e do Laboratório de Micologia pela amizade e colaboração durante este período.

Ao IBILCE/UNESP, pela oportunidade de realização do curso.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Enfim, a todos que contribuíram ou torceram pelo sucesso deste trabalho.

RESUMO

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é um importante problema de saúde pública. Nos últimos anos tem sido frequente o isolamento de bactérias resistentes a partir de animais de produção e alimentos de origem animal. O objetivo desse estudo é identificar em *Enterococcus* spp. isolados de carnes (suína, bovina e frango) e de queijo Minas Frescal, o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos e a diversidade de genes de resistência aos antimicrobianos e de genes de virulência. Os resultados são comparados ao perfil observado em *Enterococcus* spp. isolados de pacientes internados em um hospital terciário no estado de São Paulo. Foram avaliados 102 *Enterococcus* spp. isolados de alimentos e 46 isolados clínicos. Entre os isolados de alimentos, 39% apresentaram resistência à tetraciclina, 32% à eritromicina, 17,5% à estreptomicina, 13% à norfloxacin, 10% ao cloranfenicol, 8% à ciprofloxacina e à fosfomicina, 6% à levofloxacina, 5,5% à quinupristina-dalfopristina, 4% à linezolida e à penicilina, 3,5% à moxifloxacina, 3% à ampicilina e 2% à gentamicina. Todos os *Enterococcus* spp. isolados de alimentos foram sensíveis à teicoplanina e à tigeciclina. Entre os isolados clínicos, 67,5% apresentaram resistência à ciprofloxacina, 56,5% à penicilina, 43,5% à ampicilina, 37% à estreptomicina, 24% à vancomicina e à teicoplanina, e 11% à gentamicina. Cepas multirresistentes foram detectadas entre os isolados de alimentos e de amostras clínicas. Nos *Enterococcus* isolados de alimentos resistentes à tetraciclina foram detectados os genes *tet M*, *tet L*, *tet K* e *tet C*. Os genes *ant6-Ia* e *aac(6')-Ie/aph(2'')-Ia* foram detectados em cepas de alimentos e de origem clínica. Com relação aos genes de virulência, entre os *Enterococcus* isolados de alimentos, 48% apresentaram o gene *efaA*, 42% o *gelE*, 37,5% o *ace*, 15% o *as*, 13% o *esp* e 11% o *cyl*. Entre os isolados clínicos, 61% apresentaram o gene *ace*, 56,5% o *efaA*, 43,5% o *gelE*, 11% o *cyl* e o *esp* e 6,5% o *as*. O gene *hyl* não foi detectado nesse estudo. Fenotipicamente, 63,5% foram positivos para gelatinase e 45% para citolisina entre os isolados de alimentos e 55% e 44,55% para gelatinase e citolisina, respectivamente, entre os clínicos. Entre os 102 isolados de alimentos, 62 foram identificados quanto à espécie, 59,5% foram identificados como *E. faecalis*, 22,5% como *E. faecium* e 18% como *E. durans*. Após análise do perfil de restrição de DNA de *Enterococcus* por PFGE, não foi observado similaridade entre as cepas de alimentos e clínicas. Esses alimentos podem representar um risco para a saúde dos consumidores, pois podem veicular *Enterococcus* spp. multirresistentes via cadeia alimentar, que além de causar infecções de difícil tratamento podem atuar como reservatórios para genes de resistência e de virulência.

Palavras-Chave: *Enterococcus*. Carne. Queijo. Resistência. Antimicrobianos. Virulência.

ABSTRACT

Bacterial resistance to antibiotics is a major public health. In recent years there has often been the isolation of resistant bacteria from production and animal food animals. The aim of this study is to identify in *Enterococcus* spp. isolated from meat (pork, beef and chicken) and Frescal Minas cheese, susceptibility profile to antimicrobials and the diversity of antimicrobial resistance genes and virulence genes. The results are compared to the profile observed in *Enterococcus* spp. isolated from patients admitted to a tertiary hospital in São Paulo. One hundred two *Enterococcus* spp. were isolated from food and 46 were from clinical isolates. Resistances to different classes of antimicrobials has been observed, and among the isolates of food were resistant to tetracycline (39%), erythromycin (32%), Streptomycin (17.5%), norfloxacin (13%), chloramphenicol (10%), ciprofloxacin and fosfomicin (8%), levofloxacin (6%), quinupristin-dalfopristin (5.5%), penicillin and linezolid (4%), moxifloxacin (3.5%), ampicillin (3%) and gentamicin (2%). All *Enterococcus* spp. isolates from foods were sensitive to teicoplanin and tigecycline. Among clinical isolates, were resistant to ciprofloxacin (67.5%), penicillin (56.5%), ampicillin (43.5%), streptomycin (37%), vancomycin and teicoplanin (24%) and gentamicin (11%). Multidrug-resistant strains were detected among isolates from food and clinical samples. In *Enterococcus* spp. tetracycline resistant, the genes *tet M*, *tet L*, *tet K* and *tet C* were detected. The genes *ant6-la* and *aac(6')-Ie/aph(2'')-Ia* were detected in strains of food and clinical origin. Regarding the virulence genes among *Enterococcus* isolates from food, 48% had the gene *efaA*, 42% the *gelE*, 37.5% the *ace*, 15% the *as*, 13% the *esp* and 11% the *cyl*. Among the clinical isolates, 61% had the *ace*, 56.5% the *efaA*, 43.5% the *gelE*, 11% the *cyl* and *esp*, and 6.5% the *as*. The *hyl* gene was not detected in this study. Phenotypically, 63.5% were positive for gelatinase and 45% for cytolysin A isolated from food and 55% and 44.55% for gelatinase and cytolysin, respectively, among clinicals. Among the 102 isolated from foods, 62 were identified as the species, 59.5% were identified as *E. faecalis*, *E. faecium* (22.5%) and *E. durans* (18%). After analysis of DNA restriction profile by PFGE, similarity between the strains of food and clinical was not observed. These foods may pose a risk to the health of consumers because they may serve of source of *Enterococcus* spp. multiresistant, which in addition to a cause infections difficult to treat can act as reservoirs for resistance genes and virulence.

Keywords: *Enterococcus*. Meat. Cheese. Resistance. Antimicrobials. Virulence.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Eletroforese em gel de agarose mostrando o produto de amplificação do gene *tuf* para a identificação do gênero *Enterococcus*. Amostras 52-59, 72, 94-100: *Enterococcus* spp.; 70, 71, 73, 74, 75, 111, 113: amostras negativas; 112: *Lactococcus garvieae*; C+: *E. faecalis* ATCC 29212; Br: branco; M: marcador de 100p. 30
- Figura 2** - Porcentagem de resistência a antimicrobianos em *Enterococcus* spp. isolados de carnes e queijos. AMP: Ampicilina; C: Cloranfenicol; CIP: Ciprofloxacina; FOS: Fosfomicina; LZD: Linezolida; NOR: Norfloxacin; EST: Estreptomicina; TE: Tetraciclina; P: Penicilina; TEC: Teicoplanina; LEV: Levofloxacina; VAN: Vancomicina; CN: Gentamicina. 33
- Figura 3** - Porcentagem de resistência a antimicrobianos em *Enterococcus* spp. isolados de carne bovina. AMP: Ampicilina; C: Cloranfenicol; CIP: Ciprofloxacina; FOS: Fosfomicina; LZD: Linezolida; NOR: Norfloxacin; EST: Estreptomicina; TE: Tetraciclina; P: Penicilina; TEC: Teicoplanina; LEV: Levofloxacina; VAN: Vancomicina; CN: Gentamicina. 34
- Figura 4** - Porcentagem de resistência a antimicrobianos em *Enterococcus* spp. isolados de carne suína. AMP: Ampicilina; C: Cloranfenicol; CIP: Ciprofloxacina; FOS: Fosfomicina; LZD: Linezolida; NOR: Norfloxacin; EST: Estreptomicina; TE: Tetraciclina; P: Penicilina; TEC: Teicoplanina; LEV: Levofloxacina; VAN: Vancomicina; CN: Gentamicina. 35
- Figura 5** - Porcentagem de resistência a antimicrobianos em *Enterococcus* spp. isolados de carne de frango. AMP: Ampicilina; C: Cloranfenicol; CIP: Ciprofloxacina; FOS: Fosfomicina; LZD: Linezolida; NOR: Norfloxacin; EST: Estreptomicina; TE: Tetraciclina; P: Penicilina; TEC: Teicoplanina; LEV: Levofloxacina; VAN: Vancomicina; CN: Gentamicina. 36
- Figura 6** - Porcentagem de resistência a antimicrobianos em *Enterococcus* spp. isolados de queijo Minas Frescal. AMP: Ampicilina; C: Cloranfenicol; CIP: Ciprofloxacina; FOS: Fosfomicina; LZD: Linezolida; NOR: Norfloxacin; EST: Estreptomicina; TE: Tetraciclina; P: Penicilina; TEC: Teicoplanina; LEV: Levofloxacina; VAN: Vancomicina; CN: Gentamicina. 37
- Figura 7** - Comparativo da resistência a antimicrobianos em *Enterococcus* spp. isolados de alimentos (a) e clínicos (c). AMP: Ampicilina; CIP: Ciprofloxacina; LZD: Linezolida; EST: Estreptomicina; P: Penicilina; TEC: Teicoplanina; VAN: Vancomicina; CN: Gentamicina. 46
- Figura 8** - Porcentagem de genes de resistência à tetraciclina em *Enterococcus* spp isolados de alimentos. 47
- Figura 9** - Eletroforese em gel de agarose mostrando o produto de amplificação do gene *tet C*. Amostra 94: *Enterococcus* spp.; Amostra 95: *E. faecalis*; Amostra 96: *Enterococcus* spp.; Amostra 100: *Enterococcus* spp.; Amostra 112: *Lactococcus garvieae*; Br: branco; M: marcador de 100pb. 48
- Figura 10** - Porcentagem de genes de virulência em *Enterococcus* spp. isolados de alimentos (a) e clínicos (c). *as*: substância de agregação; *ace*: adesina de colágeno; *gelE*: gelatinase; *cyl*: citolisina; *efaA*: antígeno A; *esp*: proteína de superfície de *Enterococcus*. 51
- Figura 11** - Ágar Müeller-Hinton suplementado com 3% de gelatina, demonstrando resultado positivo (presença de zonas claras) e negativo (ausência de zonas claras). 60
- Figura 12** - Dendrograma baseado em UPGMA, gerado a partir dos perfis de restrição de DNA de *E. faecalis* isolados de alimentos e amostras clínicas, obtidos por eletroforese em campo pulsado (PFGE). 63
- Figura 13** - Dendrograma baseado em UPGMA, gerado a partir dos perfis de restrição de DNA de *E. faecium* isolados de alimentos obtidos por eletroforese em campo pulsado (PFGE). 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - <i>Primers</i> usados para detectar o gene <i>tuf</i> do gênero <i>Enterococcus</i> spp.	21
Tabela 2 - <i>Primers</i> e temperatura de anelamento usados para detectar genes de virulência em <i>Enterococcus</i> spp.	24
Tabela 3 - <i>Primers</i> e temperatura de anelamento usados para detectar genes de resistência em <i>Enterococcus</i> spp.	26
Tabela 4 - <i>Enterococcus</i> spp. isolados de alimentos de origem animal	31
Tabela 5 - Distribuição de fatores de virulência em <i>Enterococcus</i> spp. de origem clínica e de alimentos	51
Tabela 6 - Ocorrência de fatores de virulência em <i>E. faecalis</i> isolados de carnes e queijos...	55
Tabela 7 - Ocorrência de fatores de virulência em <i>E. faecalis</i> isolados de urina e sangue	56
Tabela 8 - Distribuição de fatores de virulência em <i>E. faecalis</i> de origem clínica e de alimentos	57
Tabela 9 - Ocorrência de resistência a antimicrobianos em 37 <i>E. faecalis</i> isolados de carnes e queijos	58
Tabela 10 - Ocorrência de resistência a antimicrobianos em 14 <i>E. faecium</i> isolados de carnes e queijos	59
Tabela 11 - Ocorrência de fenótipos de resistência e genes de resistência e de virulência em <i>E. faecalis</i>	64
Tabela 12 - Ocorrência de fenótipos de resistência e genes de resistência e de virulência em <i>E. faecium</i>	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - Porcentagem
μM - Micromolar
°C - Graus Celsius
μg - Micrograma
μL - Microlitro
AACs - acetiltransferases
Ace - Adesina de colágeno
AMP - Ampicilina
ANTs - Nucleotíldiltransferases
APHs - Fosfotransferases
As - Substância de agregação
ATCC - *American Type Culture Collection*
ATP - Adenosina Trifosfato
BSA - Soro albumina bovina
C - Cloranfenicol
CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*
CIM - Concentração Inibitória Mínima
CIP - Ciprofloxacina
CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*
CN - Gentamicina
Cyl - Citolisina
DNA - Ácido desoxirribonucleico
DO - Densidade óptica
EDTA - Ácido etileno-diamino tetracético
EfaA - Antígeno A de *Enterococcus faecalis*
ERI - Eritromicina
ermB - Gene de resistência à macrolídeos
ERV - *Enterococcus* resistente à vancomicina
Esp - Proteína de superfície de *Enterococcus*
EF-TU - Fator de alongamento
EUA - Estados Unidos da América
F - *Forward primer*
FDA - *Food and Drug Administration*
FAMERP - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
FOS - Fosfomicina
GTP - Guanosina Trifosfato
GelE - Gelatinase
HB - Hospital de Base
Hyl - Hialuronidase
I - Resistência intermediária
Kb - Quilobases
LEV - Levofloxacina
LZD - Linezolida
mg - Miligrama
mL - Mililitro
MLST - *Multilocus Sequencing Typing*
MOX - Moxifloxacina
NaCl - Cloreto de Sódio

ng - Nanograma
NOR - Norfloxacin
NT - Não testado
P - Penicilina
pb - Pares de bases
PCR - *Polymerase chain reaction*
PFGE - *Pulsed Field Gel Electrophoresis*
pH - Potencial hidrogeniônico
Q/D – Quinupristina-Dalfopristina
Qnr - *Quinolone resistance*
R - Resistente
Rp - *Reverse primer*
RNA - Ácido ribonucléico
rRNA - RNA ribossômico
S - Sensível
EST - Estreptomicina
SENTRY - *Antimicrobial Surveillance Program*
TA - Temperatura de anelamento
TEC - Teicoplanina
TET - Tetraciclina
TBE - Tris, EDTA, Ácido bórico
TE - Tris EDTA
TGI - Trato gastrointestinal
Tris - Hidroximetilaminometano
tuf - gene que codifica fator de alongamento
TSA - Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos
TSB - *Tryptic Soy Broth*
U - Unidade
UPGMA - *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*
VAN - Vancomicina
vat - gene de resistência à estreptogramina
V/cm - Volts por centímetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Características gerais do gênero <i>Enterococcus</i>	3
2.2 Fatores de Virulência em <i>Enterococcus</i>	3
2.2.1 Substância de agregação (As).....	4
2.2.2 Proteína de superfície de <i>Enterococcus</i> (Esp)	5
2.2.3 Adesina de colágeno de <i>Enterococcus faecalis</i> (Ace).....	5
2.2.4 Antígeno A de <i>Enterococcus faecalis</i> (EfaA)	6
2.2.5 Gelatinase (GelE)	6
2.2.6 Citolisina (Cyl)	7
2.2.7 Hialuronidase (Hyl)	8
2.3 <i>Enterococcus</i> como agentes de infecções nosocomiais.....	8
2.4 Principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos em <i>Enterococcus</i> de importância clínica	9
2.4.1 Resistência à vancomicina.....	10
2.4.2 Resistência a altos níveis de aminoglicosídeos	11
2.4.3 Resistência às estreptograminas	12
2.4.4 Resistência às tetraciclinas	13
2.4.5 Resistência à fosfomicina	14
2.4.6 Resistência às quinolonas	14
2.4.7 Resistência ao cloranfenicol	15
2.4.8 Resistência aos Beta-lactâmicos	15
2.4.9 Resistência à linezolida	16
2.4.10 Resistência à eritromicina.....	17
2.5 <i>Enterococcus</i> como reservatórios para a transferência horizontal de genes de resistência	17
2.6 Tipagem molecular por eletroforese em campos pulsados (PFGE)	18
3 OBJETIVOS	19
3.1 Objetivos Gerais	19
3.2 Objetivos Específicos	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 Isolamento de <i>Enterococcus</i> spp. em amostras de alimentos.....	20
4.1.1 Isolados clínicos	21
4.2 Identificação e teste de susceptibilidade de <i>Enterococcus</i> spp.....	21
4.3 Identificação das espécies de <i>Enterococcus</i>	22
4.4 Extração de DNA genômico bacteriano	22
4.5 Detecção de genes de virulência em <i>Enterococcus</i> spp.	23
4.6 Detecção de genes de resistência em <i>Enterococcus</i> spp.....	25
4.7 Purificação dos produtos de PCR para sequenciamento	27
4.8 Sequenciamento dos genes	27
4.9 Detecção fenotípica de fatores de virulência.....	27
4.9.1 Detecção da produção de gelatinase	27
4.9.2 Detecção da produção de hemolisina	28
4.10 Tipagem molecular por meio da técnica de PFGE	28
4.11 Análise dos resultados	29

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1 Isolamento e identificação de <i>Enterococcus</i> spp. a partir de alimentos	30
5.2 Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em <i>Enterococcus</i> spp. isolados de alimentos.....	32
5.3 Suscetibilidade de <i>Enterococcus</i> spp. a diferentes antimicrobianos	38
5.3.1 Resistência à tetraciclina e à tigeciclina	38
5.3.2 Resistência à eritromicina.....	39
5.3.3 Altos níveis de resistência à estreptomicina e à gentamicina.....	40
5.3.4 Resistência à fosfomicina	41
5.3.5 Resistência à quinupristina/dalfopristina.....	42
5.3.6 Resistência à penicilina e à ampicilina	42
5.3.7 Resistência à vancomicina.....	43
5.3.8 Resistência à norfloxacin, ciprofloxacina, levofloxacina e à moxifloxacina	44
5.3.9 Resistência ao cloranfenicol	45
5.3.10 Resistência à linezolida	45
5.4 Suscetibilidade aos antimicrobianos em <i>Enterococcus</i> spp. isolados de pacientes atendidos em um hospital terciário	45
5.5 Genes de resistência a antimicrobianos	47
5.5.1 Genes que conferem resistência à tetraciclina	47
5.5.2 Genes que conferem resistência à vancomicina	49
5.5.3 Genes que conferem alto nível de resistência à estreptomicina	49
5.5.4 Genes que conferem alto nível de resistência à gentamicina	49
5.5.5 Genes que conferem resistência à fosfomicina.....	50
5.6 Perfil de virulência entre <i>Enterococcus</i> spp. isolados de alimentos e de origem clínica .	50
5.6.1 Genes de virulência em isolados de alimentos e de origem clínica.....	50
5.7 Sequenciamento de genes	53
5.8 Identificação das espécies de <i>Enterococcus</i>	53
5.9 Distribuição dos genes de virulência em <i>Enterococcus faecalis</i> e <i>Enterococcus faecium</i> isolados de alimentos e de pacientes	54
5.10 Perfil de resistência aos antimicrobianos em <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> isolados de alimentos	57
5.11 Testes fenotípicos - produção de gelatinase e hemolisina.....	59
5.11.1 Detecção da produção de gelatinase.....	59
5.11.2 Detecção da produção de citolisina	60
5.12 Tipagem molecular	61
5.12.1 Relação genética entre <i>E. faecalis</i> isolados de amostras de alimentos e de amostras clínicas humanas.....	61
5.12.2 Relação genética entre <i>E. faecium</i> isolados de amostras de alimentos e de amostras clínicas humanas.....	65
6 CONCLUSÕES	69
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

1 INTRODUÇÃO

A resistência aos antimicrobianos é uma das maiores ameaças globais à saúde pública. Infecções causadas por bactérias multirresistentes são de difícil tratamento, devido à limitação das opções de antimicrobianos disponíveis, e resultam em maiores períodos de internação hospitalar, aumento das taxas de mortalidade e elevação dos custos de assistência à saúde (LAMMIE; HUGHES, 2016; WHO, 2015).

Em bactérias, a resistência aos antimicrobianos pode ocorrer naturalmente por meio de mutações espontâneas, porém o intenso uso de antimicrobianos em humanos e animais pode acelerar esse processo devido à pressão de seleção (WHO, 2015). Na cadeia produtora de alimentos, antimicrobianos são usados para profilaxia e tratamento de diversas síndromes infecciosas, ou como promotores de crescimento, sendo adicionados em doses subterapêuticas na alimentação dos animais, com o objetivo de inibir o crescimento de bactérias que, por produzirem substâncias tóxicas, prejudicam a absorção de nutrientes. Esta prática visa à uniformidade dos lotes, maior rendimento da produção, melhoria na saúde dos animais e queda na mortalidade. O resultado é a seleção de bactérias resistentes aos antimicrobianos no trato gastrointestinal (TGI) dos animais (MARSHALL; LEVY, 2011; TREMBLAY et al., 2011).

A pesquisa sobre a resistência aos antimicrobianos de bactérias isoladas na cadeia produtora de alimentos tem sido estimulada, devido à importância de se conhecer: *i*) a diversidade de espécies bacterianas resistentes, *ii*) os mecanismos de resistência apresentados por comensais e patógenos, *iii*) as formas de transferência de genes de resistência entre bactérias da microbiota do TGI humano e de animais. Estas informações são importantes para a avaliação do risco de disseminação de bactérias resistentes e genes de resistência através da cadeia alimentar (OIE, 2010; APUA, 2006; FAO/OMS, 2004; BARZA; GORBACH, 2002).

Para o Brasil, é importante a vigilância da resistência aos antimicrobianos em bactérias zoonóticas e comensais, em diferentes animais de produção e em alimentos derivados destes animais (FARIA et al., 2009; WHO, 2011; WHO, 2012). Esta necessidade é justificada por questões comerciais e de saúde pública, pois carnes apresentam características intrínsecas ideais para a multiplicação bacteriana, e são os principais alimentos responsáveis pela veiculação de patógenos ao homem (ICMSF, 2005). Além disso, o país é o maior exportador mundial de carne bovina e de aves e o quarto maior exportador de carne suína (MAPA, 2015), e apresenta um consumo doméstico de carnes que está entre os maiores do mundo e permanece em constante crescimento (MAPA, 2015). Com relação à produção de leite e

derivados, o Brasil está entre os seis maiores produtores de leite in natura e de queijos do mundo (ABIQ, 2015; ANUAL BRASILEIRO DA PECUÁRIA, 2014).

Durante o abate e processamento para a produção de carnes, bactérias como as do gênero *Enterococcus* podem contaminar a carcaça, e após transmissão via cadeia alimentar, causar infecções de difícil tratamento em humanos (ASLAM et al., 2012; LANDERS et al., 2012). Na cadeia produtora de leite, as glândulas mamárias, principalmente de animais com mastite, são fonte de bactérias resistentes (SHIPP; DICKSON, 2012), e a contaminação é uma reconhecida fonte de *Enterococcus* spp. para o leite e seus derivados (PESAVENTO et al., 2014).

No interior do TGI humano, os *Enterococcus* spp. adquiridos através da ingestão de alimentos, podem atuar como reservatórios de genes de resistência, que são transmitidos horizontalmente por meio de elementos genéticos móveis para outras bactérias da microbiota intestinal humana (PALMER et al., 2010; HUMMEL et al., 2007). Este é um importante mecanismo de disseminação da resistência entre bactérias da mesma espécie e também entre diferentes espécies (BENNET, 2008).

Nas duas últimas décadas, *Enterococcus* spp., principalmente *E. faecalis* e *E. faecium* tem ganhado importância como agentes de infecções nosocomiais que resultam em altas taxas de mortalidade (BILLINGTON et al., 2014; ARIAS; MURRAY, 2012). Considerando-se que estas bactérias são frequentemente encontradas no TGI de animais de produção e como contaminantes de alimentos (GIRAFFA, 2002), torna-se importante conhecer o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos e de virulência em *Enterococcus* spp. isolados de alimentos de origem animal, e comparar com os perfis de *Enterococcus* spp. de origem clínica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características gerais do gênero *Enterococcus*

Os *Enterococcus* são cocos Gram-positivos, da família Enterococaceae. Apresentam baixo conteúdo de G + C no DNA, que varia entre 37 a 45%, dependendo da espécie. São anaeróbios facultativos, que podem se apresentar na forma de cadeias curtas, aos pares ou como células únicas. Não produzem enzimas citocrômicas e, portanto, são catalase-negativos, salvo algumas linhagens que podem produzir uma pseudocatalase (GILMORE et al., 2014; FACKLAM; CAREY, 1985; SCHEIFLER, 1984). Apresentam capacidade de crescimento na presença da bile, hidrolisam a esculina e crescem em meio líquido contendo 6,5% de NaCl (FACKLAM et al., 1999).

Estão amplamente distribuídos na natureza, sendo componentes da microbiota intestinal de animais e humanos. São isolados a partir de plantas, solo, água e alimentos, provavelmente devido à disseminação de conteúdo fecal e à sua tolerância a condições ambientais adversas (VALENZUELA et al., 2008; MESSI et al., 2006; GIRAFFA, 2002; AARESTRUP et al., 2000).

O gênero consiste de 55 espécies (EUZEBY, 2016;). *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) e *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) são as principais isoladas de fezes de humanos, e *Enterococcus durans* (*E. durans*) e *Enterococcus avium* (*E. avium*) também são eventualmente detectadas nas fezes (TANNOCK; COOK, 2002; FINEGOLD et al., 1983). Layton e colaboradores (2010) quantificaram essas espécies nas fezes de humanos, e relataram a presença de *E. faecium* em 100% das amostras, *E. faecalis* em 78%, *Enterococcus gallinarum* (*E. gallinarum*) e *E. durans* em 33% e *E. avium* e *Enterococcus hirae* (*E. hirae*) em 11%. As espécies mais comumente encontradas no intestino de mamíferos são *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae* e *E. durans* (GILMORE et al., 2014).

2.2 Fatores de Virulência em *Enterococcus*

Até recentemente os *Enterococcus* eram considerados comensais não patogênicos, ocasionalmente associados a infecções do trato urinário e endocardite (ARIAS; MURRAY, 2012; AMYES, 2007). Entretanto, nos últimos anos, *E. faecalis* e *E. faecium* têm sido reconhecidos como importantes agentes de infecções de trato urinário, endocardite, feridas e sepse, tanto no ambiente hospitalar como na comunidade, e em pacientes hospitalizados são

responsáveis por altas taxas de mortalidade (ANDERSON et al., 2016; KAFIL; MOBAREZ, 2015; KLARE et al., 2015; SILVA et al., 2014). Outras espécies, incluindo *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. hirae* e *E. durans*, raramente causam infecções em humanos (ESHAGHI et al., 2015). Atualmente têm surgido alguns estudos com essas espécies, no Canadá foi relatado pela primeira vez o isolamento de *E. gallinarum* de uma infecção em ferida (ESHAGHI et al., 2015). Nos Estados Unidos foram detectados *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* em infecções de corrente sanguínea (BRITT; POTTER, 2016).

O papel de uma variedade de fatores de virulência encontrados em *Enterococcus*, que os habilitam a sobreviver no ambiente, colonizar tecidos e causar infecções tem sido identificado e descrito. Entre eles, destacam-se: substância de agregação (As), proteínas de superfícies (Esp), hialuronidase (Hyl), citolisinas (Cyl), gelatinase (GelE), adesina de colágeno (Ace) e antígeno A (EfaA) (BISWAS et al., 2016; STRATEVA et al., 2016; YILMAZ et al., 2016; KAFIL; MOBAREZ, 2015).

Os fatores de virulência são codificados por genes que são horizontalmente transferidos entre bactérias (JAHAN et al., 2015; GAZZOLA et al., 2012; HUMMEL et al., 2007), o que favorece sua disseminação por meio da cadeia alimentar (GIRAFFA, 2002). Cocconcelli e colaboradores (2003) descreveram a transferência, entre *E. faecalis*, de dois elementos genéticos móveis que carregam genes de virulência, durante os processos de fermentação de queijos e salames. De acordo com estes autores, plasmídeos carreadores de genes que codificam a produção da substância de agregação As, foram transferidos mesmo na ausência da pressão seletiva.

2.2.1 Substância de agregação (As)

A substância de agregação (As) é uma glicoproteína de superfície, multifuncional, que além de facilitar a conjugação e transferência horizontal de genes, auxilia na adesão à superfície de células eucarióticas. Os plasmídeos conjugativos pAD1, pCF10 e pAD1, que codificam as substâncias de agregação Asa1, Asc10 e Asp1 foram identificados em *E. faecalis*. A expressão dessas proteínas é induzida por feromônio sexual produzido por células receptoras, e favorece o contato eficiente entre o doador-receptor durante o processo de conjugação (HENDRICKX et al., 2009).

De acordo com Sussmuth e colaboradores (2000), a As aumenta a virulência de *E. faecalis* por funcionar como uma adesina no processo de interação com as células do hospedeiro, e também promover a internalização da bactéria e a evasão das células

fagocitárias. Foi demonstrado que a As está associada ao aumento de virulência e mortalidade em coelhos apresentando endocardite, e também confere adesão em células epiteliais renais e internalização em células intestinais humanas (CHUANG-SMITH et al., 2010). Schlievert e colaboradores (1998) e Wells e colaboradores (2000) também discutiram o papel da As de *E. faecalis* durante o desenvolvimento da endocardite e comprovaram o desempenho dessa proteína nesse processo de infecção.

No Brasil, o gene *as* já foi detectado em *E. faecalis* e *E. faecium* de origem clínica e de fontes alimentares (MEDEIROS et al., 2014; CORMELATO et al., 2013).

2.2.2 Proteína de superfície de *Enterococcus* (Esp)

A proteína de superfície de *Enterococcus* foi identificada inicialmente em uma cepa altamente virulenta de *E. faecalis*, resistente à gentamicina, isolada de um paciente com bacteremia. De acordo com os autores do estudo (SHANKAR et al., 1999), a presença de Esp em *E. faecalis* aumentou o processo de infecção ($p < 0,001$) quando comparado às cepas com ausência dessa proteína.

Esp é codificada pelo gene (*esp*) que pode ter sido adquirido de uma ilha de patogenicidade. A proteína é comumente encontrada em isolados clínicos, ancorada na parede celular, sendo importante na formação de biofilmes durante infecções do trato urinário e endocardite (HEIKENS et al., 2011; UPADHYAYA et al., 2011; SHANKAR et al., 2001). O gene *esp* tem sido detectado em cepas de *Enterococcus* isoladas de infecção do trato urinário (KAFIL; MOBAREZ, 2015; SOARES et al., 2014). Leendertse e colaboradores (2009) demonstraram que cepas que possuem o gene *esp* aderem mais em células de bexiga e rins (*in vitro*), quando comparadas com cepas deficientes. Heikens e colaboradores (2011) demonstraram que a proteína Esp está associada à endocardite em camundongos, isolando, a partir de células cardíacas dos animais, *E. faecium* carreadoras do gene *esp*. Em *Enterococcus* isolados de queijos e carnes, o gene *esp* também tem sido detectado (HAMMAD et al., 2015; JAHAN; HOLLEY, 2014).

2.2.3 Adesina de colágeno de *Enterococcus faecalis* (Ace)

A aderência da bactéria no tecido do hospedeiro é considerada uma etapa importante no processo de infecção. Ace é uma proteína que adere ao colágeno e a laminina, de forma específica, favorecendo esse processo (NALLAPAREDDY; MURRAY, 2008).

Singh e colaboradores (2010) demonstraram a importância de Ace no processo de endocardite. Eles revelaram que após a deleção do gene *ace*, houve uma diminuição na formação da endocardite, no entanto, não foram observadas variações no modelo de peritonite. Em outro estudo, Ace foi detectado em amostras de soro de 90% de pacientes com endocardite (NALLAPAREDDY et al., 2000).

Ace é importante também em infecção do trato urinário, pois segundo Nallapareddy e colaboradores (2011), ao deletar o gene *ace* foi observado uma atenuação no processo de infecção de trato urinário.

Em um estudo recente, foi observada a presença de *ace* em 38,4% dos *Enterococcus* de origem clínica, além disso, os pesquisadores concluíram que *ace* foi detectado em maior frequência em processos infecciosos invasivos (STRATEVA et al., 2016).

2.2.4 Antígeno A de *Enterococcus faecalis* (EfaA)

EfaA tem importância na formação de biofilmes (KAFIL et al., 2016), e foi descrito como o principal antígeno de superfície de *E. faecalis*, sendo identificado em soro de pacientes com endocardites causada por esta bactéria (LOWE et al., 1995).

Singh e colaboradores (1998) observaram a importância de EfaA na patogencidade de *Enterococcus* em modelo experimental de peritonite. Um estudo correlacionando o perfil de fatores de virulência e a produção de biofilmes em cepas de *Enterococcus* associadas à infecção do trato urinário foi realizado por Kafil e Mobarez (2015). Eles observaram que cepas que apresentavam os genes *efaA* e *asa1* produziram mais biofilmes que as demais. Esse mesmo grupo de pesquisa observou uma correlação entre a produção de biofilmes e a exposição aos antimicrobianos, e que a gentamicina pode induzir e sustentar esse processo, principalmente quando usada em altas concentrações (KAFIL et al., 2016).

O gene *efaA* tem sido detectado em *Enterococcus* de origem clínica e de alimentos (STRATEVA et al., 2016; YILMAZ et al., 2016). Valenzuela e colaboradores (2008) relataram presença de genes de virulência que codificam o antígeno A, adesina de colágeno e a proteína de superfície em *E. faecalis* e *E. faecium* isolados de produtos de origem animal.

2.2.5 Gelatinase (GelE)

A gelatinase é uma metaloprotease que hidrolisa a gelatina, colágeno, caseína, hemoglobina e peptídeos (PARK et al., 2008). A produção de gelatinase está associada à

formação de biofilmes por *Enterococcus* (UPADHYAYA et al., 2010; VERGIS et al., 2002). Um estudo comprovou que mutantes que perderam *gelE* produziram menos biofilmes que as linhagens selvagens (MOHAMED et al., 2004).

Estudos com modelo animal mostraram que a produção de gelatinase contribui na formação da endocardite (THURLOW et al., 2010) e peritonite (SINGH et al., 1998). Mutantes que perderam *gelE* tiveram a virulência atenuada em endocardite, peritonite, perda de aderência em raízes dentais e menos translocação através de células intestinais T84 (SINGH et al., 2005; ZENG et al., 2005; HUBBLE et al., 2003; SINGH et al., 1998).

O gene *gelE* tem sido frequentemente detectado em cepas de *Enterococcus* isolados de alimentos e de origem clínica (BISWAS et al., 2016; STRATEVA et al., 2016; YILMAZ et al., 2016).

2.2.6 Citolisina (Cyl)

A citolisina é uma proteína capaz de lisar hemácias de humanos, cavalos e coelhos. As cepas de *Enterococcus* que produzem citolisinas são mais virulentas em modelos animais e em infecções humanas (VAN TYNE et al., 2013).

Um operon que consiste de oito genes, localizado em plasmídeos induzíveis por feromônios e em ilhas de patogenicidade, codifica a citolisina (SHANKAR et al., 2002). Os genes estruturais *cylLL* e *cylLS* compõem as subunidades da proteína Cyl, o gene *cylM* é responsável pela modificação pós-traducional, o *cylB* e *cylA* pelo processo de secreção da proteína, o *cylL* pela imunidade da própria célula e os genes *cylR1* e *cylR2* são regulatórios (COBURN; GILMORE, 2003).

O sinergismo entre As e Cyl foi avaliada em um estudo conduzido por Haas e colaboradores (2002). Eles observaram uma mortalidade maior quando os animais eram inoculados com *E. faecalis* que expressam os dois fatores de virulência, e constataram que o efeito da citolisina foi anulado na ausência de As. Um estudo recente, que avaliou os fatores de virulência de *E. faecalis* isolados de infecção de corrente sanguínea, detectou um predomínio de adesinas e citolisinas (BISWAS et al., 2016).

Estudos têm revelado a presença de citolisina em *Enterococcus* de origem clínica (STRATEVA et al., 2016; KAFIL; MOBAREZ, 2015). Com relação aos alimentos, em um estudo realizado no Brasil, *Enterococcus* isolados de carnes e queijos apresentaram os genes de virulência *cyl*, e também *gelE*, *esp*, *as*, *ace*, *efaA*, além de atividade β -hemolítica e produção de gelatinase (GOMES et al., 2008).

2.2.7 Hialuronidase (Hyl)

O gene *hyl* codifica uma proteína homologa à hialuronidase presente em *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus pneumoniae*, que tem a função de despolimerizar o ácido hialurônico, auxiliando na disseminação do microorganismo nos tecidos do hospedeiro. Essa proteína tem sido classificada como potencial fator de virulência em isolados clínicos de *E. faecium* resistentes à vancomicina (RICE et al., 2003).

Geralmente o gene *hyl* está localizado em plasmídeo transconjugante. Um aumento na virulência de *E. faecium* que contém esse plasmídeo foi relatado em camundongos com peritonite (ARIAS et al., 2009). Outro estudo revelou que a presença do gene *hyl* aumentou a capacidade de *E. faecium* em colonizar o trato gastrointestinal (RICE et al., 2009). Em um estudo recente, Strateva e colaboradores (2016) encontraram o gene *hyl* tanto em *E. faecium* como *E. faecalis* isolados de infecção de corrente sanguínea, do trato urinário e de feridas.

2.3 *Enterococcus* como agentes de infecções nosocomiais

Durante as últimas décadas, bactérias do gênero *Enterococcus* têm sido reconhecidas como importantes agentes de infecções nosocomiais (ARIAS; MURRAY, 2012; HAMMERUM et al., 2010). As infecções por *Enterococcus* podem ser de origem endógena ou exógena, sendo as de origem endógena causadas por cepas oportunistas que adquiriram resistência aos antimicrobianos e podem translocar através da barreira mucosa e causar infecção sistêmica em pacientes imunocomprometidos (LEBRETON et al., 2014).

As infecções de origem exógena ocorrem principalmente em decorrência da transmissão cruzada de *Enterococcus* em ambientes hospitalares. O principal modo de transmissão é por meio das mãos de profissionais de saúde, podendo ocorrer inoculação direta durante o manuseio e introdução de cateter urinário ou intravenoso (HIGUITA; HUYCKE, 2014).

Estas bactérias apresentam capacidade de sobrevivência em ambientes hostis por períodos prolongados. De acordo com KRAMER e colaboradores (2006), *Enterococcus* podem permanecer em superfícies inanimadas por até 4 meses, que atuam como reservatório na ausência de uma eficiente descontaminação. Esta presença no ambiente favorece a transmissão entre os profissionais da saúde e pacientes, seja por meio das mãos ou por equipamentos e superfícies, resultando em infecções esporádicas ou surtos (SOOD et al., 2008).

Em hospitais nos Estados Unidos, *Enterococcus* é o segundo principal agente de infecções urinárias e de corrente sanguínea relacionadas ao uso de cateter, além das infecções de pele e de tecidos moles (ARIAS; MURRAY, 2012; HIDRON et al., 2008). Além disso, tem sido descritos como agentes de infecções nosocomiais em diversos países, tais como a Taiwan, Bulgária, Canadá, China, dentre outros (NIU et al., 2016; STRATEVA et al., 2016; 2015; BILLINGTON et al., 2014; WANG et al., 2013).

No Brasil, as espécies mais comumente detectadas são *E. faecalis* e *E. faecium*, responsáveis por aproximadamente 90% e 10% dos casos de infecções nosocomiais, respectivamente (ANVISA, 2007). Em um estudo realizado no Brasil em quatro hospitais que participam do programa de vigilância SENTRY (*Antimicrobial Surveillance Program*), observou-se que entre os *Enterococcus* identificados, 86% pertenciam à espécie *E. faecalis* e 14% *E. faecium* (GALES et al., 2009).

2.4 Principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos em *Enterococcus* de importância clínica

Entre as espécies de *Enterococcus* observa-se a ocorrência natural de resistência a várias classes de antimicrobianos (ORSI; CIORBA, 2013). Em *E. faecalis* e *E. faecium*, as espécies de maior importância clínica, observa-se resistência intrínseca às cefalosporinas, resistência a baixas concentrações de aminoglicosídeos, lincosamidas e monobactâmicos. *E. faecalis* é resistente às estreptograminas (ARIAS; MURRAY, 2012).

Além disso, estas espécies são capazes de adquirir facilmente genes que codificam elevado nível de resistência aos aminoglicosídeos, penicilinas, glicopeptídeos, tetraciclina e cloranfenicol (KACMAZ; AKSOY, 2005; SCHWARZ et al., 2001; MORRISON et al., 1997).

A resistência adquirida aos aminoglicosídeos, penicilinas (principalmente ampicilina) e ao glicopeptídeo vancomicina causa impacto negativo no tratamento de infecções por *Enterococcus* spp, uma vez que esses antimicrobianos são amplamente utilizados, e a vancomicina é o antimicrobiano mais indicado para tratamento de infecções por cepas multirresistentes (WILLEMS et al., 2011).

2.4.1 Resistência à vancomicina

A vancomicina é um glicopeptídeo, que interfere na síntese da parede celular por meio da ligação na porção terminal D-Ala-D-Ala de um pentapeptídeo encontrado em precursores de peptideoglicano (WU et al., 1995). *Enterococcus* resistentes à vancomicina produzem uma modificação nos precursores do peptideoglicano, de D-Ala-D-Ala para D-Ala-D-lactato e D-Ala-D-Ser, mediada pela aquisição de genes *van*, que é a principal causa de resistência à vancomicina em *Enterococcus* (GILMORE et al., 2014).

Até o presente, foram descritos os genes *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL* e *vanN*, de localização plasmidial, além de *vanC*, intrínseco em *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*. Os genes *vanA* e *vanB* são os mais comumente associados a resistência a glicopeptídeos em *E. faecalis* e *E. faecium* (GILMORE et al., 2014).

A resistência à vancomicina é o principal desafio para o tratamento de infecções por *Enterococcus*, pois este é o antimicrobiano mais utilizado na terapia contra infecções por cepas resistentes às outras classes de drogas, disseminadas em hospitais de todo o mundo. Infelizmente, as taxas de resistência à vancomicina entre cepas hospitalares de *Enterococcus* são alarmantes (GASTMEIER et al., 2014; WANG et al., 2013; ARIAS; MURRAY, 2012).

Em um estudo realizado no Brasil, a resistência à vancomicina foi observada com mais frequência entre *Enterococcus faecalis*, em contraste com o perfil observado nos Estados Unidos e Europa, onde a resistência à vancomicina é mais comum em *Enterococcus faecium* (GASTMEIER et al., 2014; ROSSI, 2011). No entanto, entre agosto de 2010 e setembro de 2011, Resende e colaboradores (2014) detectaram uma alteração nesse perfil, pois somente *E. faecium* resistentes à vancomicina foram identificadas em um hospital de Porto Alegre, e todas as cepas apresentaram o gene *vanA*. Na União Européia observou-se nos últimos anos um aumento no número de infecções causadas por *E. faecium* resistente à vancomicina (ECDC, 2014).

Além disso, *Enterococcus* resistentes à vancomicina (ERV) podem ser também resistentes à ampicilina, graças à associação, em elementos genéticos móveis, de diferentes genes adquiridos (CARIAS et al., 1998). No Brasil, Resende e colaboradores (2014) relataram que 100% das cepas de *E. faecium* resistentes à vancomicina incluídas em um estudo também apresentavam resistência à ampicilina (RESENDE et al., 2014). Essas drogas são utilizadas em sinergismo com estreptomicina ou gentamicina no tratamento de infecções provocadas por *Enterococcus* (ARIAS; MURRAY, 2012).

Acredita-se que uso de avoparcina (um glicopeptídeo análogo à vancomicina) como promotor de crescimento seja relacionado ao desenvolvimento e seleção de resistência à vancomicina em *Enterococcus* (HAMMERUM et al., 2010; WHO, 2007). Na Europa, o aparecimento de ERV em aves foi associado ao uso de rações suplementadas com avoparcina (BOGAARD et al., 1997; AARESTRUP et al., 1996; KRUSE; RORVIK, 1996; AARESTRUP, 1995; KLARE et al., 1995). Cepas de ERV foram isoladas de animais de produção tais como frangos, suínos e gado; de alimentos de origem animal, tais como carne de frango e bovina comercializadas na Turquia e na Itália (YILMAZ et al., 2016; PESAVENTO et al., 2014), e em queijos no Egito (HAMMAD et al., 2015).

A relação entre a colonização de animais de produção e de humanos por ERV foi sugerida por Bates e colaboradores (1993). Klare e colaboradores (1993) descreveram o isolamento de ERV geneticamente relacionados a partir de humanos e de carcaça de frangos. Esse fato foi observado em outro estudo (BATES et al., 1994), que descreveu a semelhança genética entre ERV isolados de humanos, ambiente, carnes e animais, e sugeriu que ERV presentes em animais poderiam ser transmitidos aos seres humanos por meio da cadeia alimentar. Em decorrência, o uso da avoparcina na cadeia produtora de alimentos foi banida na União Europeia em abril de 1997. Após um período relativamente curto, observou-se a diminuição da prevalência de ERV em animais (AARESTRUP et al., 2001), em carnes (DEL GROSSO et al., 2000) e em seres humanos (KLARE et al., 1999) em vários países europeus.

No Brasil, a avoparcina foi utilizada como promotor de crescimento durante 10 anos, tendo sido proibida a partir de 1998 (LEME et al., 2000). Não se sabe o impacto da utilização da avoparcina na seleção de ERV no Brasil, mas estas bactérias foram detectadas em amostras de carne de frango exportadas para o Japão (IKE et al., 1999), e posteriormente em carne suína, leite e derivados comercializados no país (FARD et al., 2011; RIBOLDI et al., 2009; GOMES et al., 2008). Durante um programa de monitoramento de resistência em *Enterococcus* isolados de carne de frango, foram detectadas 4 cepas de *E. faecalis* e 2 cepas de *E. faecium* resistentes à vancomicina. Nessas cepas, o gene *vanA* foi identificado (SACRAMENTO et al., 2016).

2.4.2 Resistência a altos níveis de aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos atuam inibindo a síntese de proteínas por se ligarem na subunidade 30S do ribossomo bacteriano (DAVIES, 2006). *Enterococcus* são intrinsecamente resistentes a baixos níveis de aminoglicosídeos, que é atribuída à baixa absorção do

antimicrobiano (CHOW, 2000) e a resistência a altos níveis de aminoglicosídeos é conferida por enzimas que alteram a estrutura do antimicrobiano, impedindo sua ligação ao sítio alvo.

A resistência a altos níveis de aminoglicosídeos dificulta a terapia antimicrobiana, pois são utilizados em sinergia com beta-lactâmicos. Neste contexto, a resistência adquirida à estreptomicina e à gentamicina é preocupante, considerando que estes são os aminoglicosídeos recomendados (ARIAS; MURRAY, 2012).

A resistência a altos níveis de estreptomicina é causada por mutação ribossomal ou pela síntese de enzimas modificadoras tipo nucleotidiotransferases ANT(6) e ANT(3''), que utilizam o ATP (Adenosina trifosfato) para adenilar o grupo hidroxil do antimicrobiano. A resistência a altos níveis de gentamicina é mediada pelas enzimas 2''-fosfotransferase - APH(2''), 6'-acetiltransferase - AAC(6') ou pela enzima bifuncional AAC(6')-APH(2''), que possui atividade de acetilase e fosforilase, que também promovem resistência aos demais aminoglicosídeos, exceto estreptomicina (HEGSTAD et al., 2010; DEL CAMPO et al., 2000).

O isolamento de *Enterococcus* resistentes à estreptomicina e à gentamicina, de amostras de carne de frango e leite foi descrito no Brasil (SACRAMENTO et al., 2016; RIBOLDI et al., 2009; FRACALANZZA et al., 2007).

2.4.3 Resistência às estreptograminas

A quinopristina-dalfopristina é uma combinação de antimicrobianos do grupo das estreptograminas, a quinupristina (estreptogramina B) e a dalfopristina (estreptogramina A) que age em sinergia inibindo a síntese de proteínas por interferir em diferentes alvos do RNA 23S na subunidade 50S do ribossomo bacteriano (HERSHBERGER et al., 2005). Estudos têm revelado que somente a utilização da quinupristina-dalfopristina contra infecções causadas por *E. faecium* tem sido ineficiente, entretanto em associação com outras drogas os resultados são satisfatórios (ERLANDSON et al., 2008). De acordo com Mave e colaboradores (2009) a combinação de quinupristina-dalfopristina com doxiciclina e rifanpicina durante o tratamento de uma endocardite causada por *E. faecium* resistente à vancomicina foi eficiente. Resultado similar foi verificado com o uso da combinação da quinupristina-dalfopristina com ampicilina no tratamento de endocardite também causado por *E. faecium* (BETHEA et al., 2004).

Entretanto, tem sido observada resistência a quinopristina-dalfopristina tanto em isolados clínicos quanto de animais de produção e carnes (RESENDE et al., 2014; RISTORI et al., 2012; RIBOLDI et al., 2009). Acredita-se que o uso de virginiamicina, uma mistura de estreptograminas dos grupos A e S, usada como promotor de crescimento possa ter

contribuído para a seleção de cepas resistentes à quinopristina-dalfopristina em *Enterococcus* isolados de animais de produção (MAPA, 2015).

Geralmente, a resistência à quinopristina-dalfopristina é mediada pela combinação de inativação enzimática, presença de bombas de efluxo e modificação do alvo, mas a produção de acetiltransferases que inativam a dalfopristina tem ganhado importância. Estas enzimas são codificadas pelos genes *vatD* e *vatE*, localizados em transposons, e que costumam estar associados aos genes *erm*, que codificam as eritromicinas metilases responsáveis pela resistência à quinopristina (KEHOE et al., 2003; BAMAS-JACQUES et al., 1999). Os genes *vatE* e *erm* foram detectados em *E. faecium* isolados de suínos e frangos na Korea (HWANG et al., 2010).

2.4.4 Resistência às tetraciclinas

A tetraciclina é um antimicrobiano bacteriostático, que se liga na porção 30S do ribossomo, inibindo a síntese de proteínas (SPEER et al., 1992). Devido ao seu baixo custo, disponibilidade para tratamento oral e atividade tanto sobre bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas, as tetraciclinas foram muito utilizadas em medicina humana; porém, após o aumento das taxas de resistência entre diversos grupos de patógenos (GUARDDON et al., 2011; SPEER et al., 1992), seu uso foi reduzido. Com a introdução de novas versões semi-sintéticas, como a tigeciclina, essa classe de antimicrobianos voltou a receber especial atenção (THAKER et al., 2010). A Tigeciclina foi lançada no mercado em 2005 pela *Wyeth Pharmaceuticals* para o tratamento de infecções de pele e intra-abdominais graves. A respeito da utilidade clínica deste antibiótico, o mesmo deverá ganhar novos usos, pois apresenta amplo espectro de ação, poucos efeitos colaterais e é ativo contra importantes linhagens bacterianas resistentes a vários antibióticos, incluindo *E. faecalis* e *E. faecium* (PEREIRA-MAIA et al., 2010). A tigeciclina também é utilizada em combinação com daptomicina para tratar endocardite causada por ERV (JENKINS, 2007).

Em medicina veterinária, segundo OIE (2015), as tetraciclinas são classificadas como antimicrobianos muito importantes, sendo empregadas no tratamento de diversas infecções bacterianas em várias espécies de animais, incluindo bovinos, suínos e aves, além disso, é uma das poucas opções de tratamento economicamente viáveis disponíveis no mercado (WOO, 2011; THAKER et al., 2010; KOO;).

Em *Enterococcus* spp., a resistência à tetraciclina é conferida por genes que codificam proteínas responsáveis pelo efluxo da droga (*tetK* e *tetL*) ou por proteínas de proteção

ribossomal (*tetM*, *tetO* e *tetS*) (CHOPRA; ROBERTS, 2001; WILCKS, 2005). No Brasil e em diversos outros países a resistência à tetraciclina em *Enterococcus* isolados de alimentos de origem animal, tais como carnes e queijos, tem sido descrita (HAMMAD et al., 2014; PESAVENTO et al., 2014; KLIBI et al., 2013; RIBOLDI et al., 2009; GOMES et al., 2008).

2.4.5 Resistência à fosfomicina

A fosfomicina impede a formação da parede celular bacteriana por inibir a síntese do ácido N-acetilmurâmico, que é o precursor dos peptidoglicanos (MICHALOPOULOS et al., 2011). É aprovada pela FDA (*Food and Drug Administration*) para o tratamento de infecções do trato urinário causadas por *Enterococcus* sensíveis à vancomicina, exceto para *E. faecium*. Em alguns indivíduos com infecções urinárias não complicadas, os antimicrobianos que se concentram na urina, como a fosfomicina, pode ser útil, além disso, ela mantém boa atividade *in vitro* contra os *Enterococcus*, sendo assim, é considerada para o tratamento de infecções do trato urinário não complicadas causadas por *Enterococcus* (ARIAS; MURRAY, 2012).

Vários mecanismos de resistência à fosfomicina têm sido descritos, porém a produção de uma tiol-S-transferase dependente de metal divalente, FosB, é o principal mecanismo em bactérias Gram-positivas (ROBERTS et al., 2013). Em ERV, a coexistência dos genes *fosB* e *vanA* no transposon Tn1546 já foi detectada, gerando resistência tanto à vancomicina quanto à fosfomicina (QU et al., 2012).

2.4.6 Resistência às quinolonas

As quinolonas são antimicrobianos que se ligam às enzimas DNA girase e topoisomerase IV, inibindo sua atividade essencial para a replicação do DNA e impedindo, assim, o crescimento bacteriano (POIREL et al., 2012). Esta classe de antimicrobianos constitui uma importante opção terapêutica (FÁBREGA et al., 2008; HOPKINS et al., 2005), sendo considerados como “Criticamente Importantes” tanto para a medicina humana quanto para a veterinária pela Organização Mundial de Saúde e pela Organização Mundial de Sanidade Animal (OIE, 2015; WHO, 2011).

O extenso uso de fluoroquinolonas tem levado ao rápido desenvolvimento de resistência em diversas espécies bacterianas, sendo ela determinada, predominantemente, por mutações nos genes cromossômicos que codificam a DNA girase e a topoisomerase IV (HOPKINS et al., 2005). Entretanto, a resistência codificada por genes plasmidiais tem

ganhado importância. Entre eles, destacam-se os peptídeos da família Qnr, que atuam através da inibição alostérica da quinolona, impedindo a ligação da droga à topoisomerase IV e à DNA girase por competirem pelo mesmo sítio específico (ROBICSEK et al., 2006). Este mecanismo de resistência é mais comumente encontrado entre patógenos da família Enterobacteriaceae, porém, a produção de uma proteína semelhante a QnrA já foi descrita em *Enterococcus faecalis* (ARSÈNE; LECLERCQ, 2007).

No Brasil, *E. faecalis* e *E. faecium* isolados de queijo, apresentaram resistência à ciprofloxacina e à norfloxacina (FURLANETO-MAIA et al., 2014). Resistência à ciprofloxacina também foi detectada em *Enterococcus* spp. isolados de carne, frango, e queijo (TALEBI et al., 2015). De acordo com Guerrero-Ramos et al. (2016), 92,75% dos *Enterococcus* spp. isolados de animais selvagens apresentaram resistência à ciprofloxacina.

2.4.7 Resistência ao cloranfenicol

O cloranfenicol atua inibindo a síntese de proteínas por se ligar na porção 50S do ribossomo bacteriano. Na maioria dos *Enterococcus* a resistência ao cloranfenicol é mediada pelo gene *cat*, que codifica uma acetiltransferase que altera a estrutura do antimicrobiano impedindo sua ligação no ribossomo (SCHLUNZEN et al., 2001). O cloranfenicol é uma opção de tratamento para infecções causadas por ERV, principalmente em *E. faecium* (KRISTICH et al., 2014). Um estudo avaliou a resposta clínica do cloranfenicol no tratamento de uma bacteremia causada por ERV em 51 pacientes, foi verificada erradicação microbiológica e cura clínica de 79% e 61%, respectivamente (LAVERDE-GOMES et al., 2011). No entanto, uma das principais preocupações relativas à utilização do cloranfenicol é a sua toxicidade inerente na medula óssea, sendo assim, a sua utilização é indicada em casos especiais, como em falhas de outras terapias ou combinações de antimicrobianos (GILMORE et al., 2014).

2.4.8 Resistência aos Beta-lactâmicos

Essa classe de antimicrobianos contém em comum no centro de suas estruturas, o anel beta-lactâmico, que confere atividade antimicrobiana. Elas atuam inibindo a síntese da parede celular ao se ligarem nas PBPs (*penicillin-binding proteins*) que catalisam a ligação cruzada da cadeia de peptidoglicano durante a síntese de maturação. Uma vez que são modificadas pelos beta-lactâmicos, as PBPs são inativadas.

Os *Enterococcus* são intrinsecamente resistentes à maioria dos beta-lactâmicos, incluindo as cefalosporinas mais recentes, como um resultado de produção de PBP de baixa afinidade, PBP5. Modificações na PBP5 são associadas com um aumento da resistência aos beta-lactâmicos, como as ampicilinas. O gene que codifica a PBP5 encontrado em uma cepa de *E. faecium* de origem clínica, difere em 5% de um gene de cepa susceptível à ampicilina encontrada na comunidade (GARNIER et al., 2000). A resistência à ampicilina em isolados clínicos de *Enterococcus* spp. é tipicamente conseguida pela super produção ou mutação na PBP (OYAMADA et al., 2006).

Penicilina (ou ampicilina), isoladamente ou com um aminoglicosídeo foi utilizada para tratamento de infecções por *Enterococcus* por mais de meio século (ARIAS; MURRAY, 2012).

2.4.9 Resistencia à linezolida

A linezolida é um antimicrobiano sintético pertencente à classe conhecida como oxazolidinonas. É usada no tratamento de infecções por Gram-positivos, incluindo bacteremias e infecções do trato urinário causadas por ERV, é ativo contra *E. faecalis* e *E. faecium* (HIGUITA; HUYNCKE, 2014). É um antimicrobiano bacteriostático e seu mecanismo de ação envolve a inibição do complexo inicial da síntese proteica por se ligar na porção 30S do ribossomo. Devido a esse mecanismo único, não foi descrito resistência cruzada com outros agentes disponíveis.

Resistência à linezolida em *Enterococcus* spp. tem sido descrita. Em um hospital na Irlanda foi detectado um surto de *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina e à linezolida em 15 pacientes, o PFGE confirmou a presença de um único clone entre esses pacientes (O'DRISCOLL et al., 2015).

As características epidemiológicas e moleculares de oito *E. faecalis* resistentes à linezolida de um hospital de ensino na China foram investigada. As modificações no local alvo e gene *cfr* associados à resistência linezolida não foram encontrados. Resultados da investigação epidemiológica indicaram que a resistência à linezolida possivelmente ocorreu em várias ocasiões independentes e muitas vezes não estava relacionada com a administração do antimicrobiano (LI et al., 2015).

No Brasil, cinco estirpes de *E. faecalis* e uma estirpe de *E. faecium* exibindo alto nível de resistência a ambos vancomicina (MIC, 256 mg / litro) e linezolida (MIC, 8-64mg / litro) foram isolados a partir de culturas de sangue e de urina em diferentes pacientes hospitalizados (ALMEIDA et al., 2014).

2.4.10 Resistência à eritromicina

A eritromicina pertence à classe dos macrolídeos e atua inibindo a síntese proteica ao se ligar na subunidade 50S do ribossomo. A forma mais comum de resistência à eritromicina é a produção de uma enzima que metila uma adenina específica no rRNA 23S da subunidade 50S ribossomal, o que reduz a afinidade de ligação entre o ribossomo e o antimicrobiano. Essa enzima é tipicamente codificada pelo gene *ermB* (KRISTICH et al., 2014).

Cepas de *Enterococcus* resistentes à eritromicina têm sido detectadas em alimentos de origem animal como carnes e queijos (YILMAZ et al., 2016; HAMMAD et al., 2015; JAMET et al., 2012; ZOU et al., 2011), e em isolados clínicos (CORREIA et al., 2014; WANG et al., 2013).

2.5 *Enterococcus* como reservatórios para a transferência horizontal de genes de resistência

Uma variedade de genes de resistência estão localizados em elementos genéticos móveis, tais como plasmídeos e transposons. Tais genes estão sujeitos a transmissão horizontal, tanto entre cepas da mesma espécie, como entre diferentes espécies de *Enterococcus* e diferentes espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (MANSON et al., 2010; HUMMEL et al., 2007). Assim, os *Enterococcus* são importantes reservatórios de genes de resistência, com grande habilidade para a mobilização (HEGSTAD et al., 2010; PALMER et al., 2010).

Muitos dos plasmídeos conjugativos responsáveis pelos processos de mobilização gênica em *Enterococcus* respondem a estímulos de feromônios (MANSON et al., 2010; PALMER et al., 2010). Cepas carreadoras de tais plasmídeos, como por exemplo, alguns ERV, apresentam grande capacidade para a transmissão de altos níveis de resistência aos glicopeptídeos (FRENCH, 2010). Além disso, a presença destes plasmídeos em *E. faecalis* e *E. faecium* carreando genes de resistência à tetraciclina e gentamicina, e o gene que codifica citolisinas foi descrita (TANIMOTO; IKE, 2008; HIRT et al., 2005; FRANCA et al., 2001).

Durante um processo de fermentação de salsicha, Gazzola et al. (2012) verificaram altas taxas de transferência de plasmídeos contendo genes de resistência à tetraciclina e a eritromicina entre *Enterococcus faecalis* a outros gêneros bacterianos. Estes autores concluíram que *Enterococcus* presentes em alimentos de origem animal podem desempenhar um papel importante na disseminação de genes de resistência aos antimicrobianos.

2.6 Tipagem molecular por eletroforese em campos pulsados (PFGE)

Diversas técnicas baseadas em análise do genoma têm sido utilizadas para tipagem e análise da similaridade genética entre bactérias patogênicas (ASADIAN et al., 2016; SACRAMENTO et al., 2016; KLIBI et al., 2013). Esta abordagem é empregada para a investigação de fontes de infecção e contaminação, e das rotas de disseminação e transmissão cruzada de patógenos em hospitais, clínicas e indústrias de alimentos (RANJBAR et al., 2014).

A técnica de PFGE (*Pulsed-field Gel Electrophoresis*) é considerada o padrão ouro para tipagem de bactérias e tem sido uma ferramenta poderosa para avaliar a relação genética entre cepas, é comumente usada em surtos tanto com isolados humanas e de animais (STEPAN et al., 2011).

A técnica de PFGE se baseia na presença de sítios de restrição existentes no DNA bacteriano, enzimas de restrição reconhecem esses sítios e cortam o DNA em fragmentos grandes, esses fragmentos são separados em gel de agarose por campos pulsantes (MASLOW et al., 1993). A alteração de uma única base no sítio de restrição da enzima ou variação genética que altera o comprimento do fragmento de DNA, normalmente causados por mutações pontuais, deleções, inserções e perda ou aquisição de plasmídeos podem explicar pequenas diferenças nos perfis dentro de um subtipo ou entre cepas relacionadas epidemiologicamente (RANJBAR et al., 2014).

Diversas pesquisas têm empregado o PFGE para estudar a diversidade genética em cepas de *Enterococcus* de origem clínica e de alimentos (JURKOVIC et al., 2007; WENG et al., 2013; SACRAMENTO et al., 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

- Identificar em *Enterococcus* spp. isolados de carnes (suína, bovina, frango), de Queijo Minas Frescal e de pacientes internados em um hospital terciário, o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, e a diversidade de genes de resistência e virulência, e determinar a relação genética entre os isolados.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a diversidade de espécies de *Enterococcus* em amostras de carne suína, bovina, frango, e em Queijo Minas Frescal comercializadas em São José do Rio Preto, SP;
- Determinar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *Enterococcus* spp.;
- Investigar os *Enterococcus* spp. isolados de alimentos e de pacientes a presença de genes de resistência à vancomicina (*van*), aminoglicosídeos (*aph(2'')*-Ia/*aac(6'')*-Ie; *ant6-Ia*), tetraciclina (*tet*) e fosfomicina (*fos*);
- Investigar entre os *Enterococcus* spp. isolados de alimentos e de pacientes a presença dos principais genes de virulência (*as*, *ace*, *gelE*, *efaA*, *esp*, *cylA* e *hyl*);
- Investigar entre os *Enterococcus* spp. que apresentam os genes *gelE* e *cylA* a produção de gelatinase e de hemolisina por testes bioquímicos;
- Determinar a similaridade genética entre os *Enterococcus* spp. de origem clínica e de alimentos pela técnica eletroforese em campos pulsados (PFGE).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolamento de *Enterococcus* spp. em amostras de alimentos

Foram analisadas 46 amostras de alimentos, sendo 5 de Queijo Minas Frescal, 16 de carne bovina, 12 de carne suína, 13 de carne de frango. As amostras foram adquiridas no varejo, em diversos pontos de venda no município de São José do Rio Preto, SP. Após a aquisição, foram imediatamente transportadas em caixas térmicas, a temperatura entre 4 e 10 °C, para o Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), e submetidas aos procedimentos para o isolamento de *Enterococcus* spp. de acordo com Domig e colaboradores (2003), com algumas modificações.

Porções de 25 gramas do alimento foram homogeneizadas com 225 mL de água peptonada 0,1% (Oxoid - Hampshire, Inglaterra) e incubadas por 16h/37 °C. A partir desta suspensão, 100 µL foram plaqueados no ágar Bile-esculina (Oxoid - Hampshire, Inglaterra) e incubados por 24h/37 °C. Critérios fenotípicos (tamanho, forma e cor) foram utilizados para seleção presuntiva de colônias com características típicas de *Enterococcus*, que foram semeadas por esgotamento em ágar BHI (“Brain Heart Infusion”, Oxoid - Hampshire, Inglaterra), e as placas incubadas por 24h/37 °C.

Em seguida, essas colônias foram submetidas ao teste de produção de catalase e de PYR, que determina a atividade da enzima pyrrolidonyl-aminopeptidase, produzida pelo *Enterococcus*. As colônias catalase negativas e PYR positivas foram submetidas à coloração de Gram, e aquelas que se apresentaram como cocos Gram-positivos foram semeadas em ágar cromogênico CPS (Biomérieux, France), que contém substratos para detecção de atividade enzimática específica. O gênero *Enterococcus* apresenta-se em colônias na cor azul turquesa nesse ágar.

As colônias típicas foram coletadas e submetidas a PCR para a identificação, com base na detecção do gene *tuf* que codifica o fator de alongamento (EF-Tu). Em *Enterococcus* spp. observa-se uma região conservada desse gene, que é distinta das outras bactérias, tornando possível a identificação utilizando os primers *Ent* 1 e *Ent* 2 de acordo com protocolo desenvolvido por Ke e colaboradores (1999). Os primers utilizados na reação estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Primers usados para detectar o gene *tuf* do gênero *Enterococcus* spp.

Gene	Primer	Sequências (5'-3')	pb*	Referência
<i>tuf</i>	<i>Ent 1</i>	TACTGACAAACCATTCATGATG	112	Ke et al. (1999)
	<i>Ent 2</i>	AACTTCGTCACCAACGCGAAC		

* pb: tamanho do produto em pares de base

Os isolados foram armazenados em coleção de cultura em freezer a -80 °C no Laboratório de Microbiologia da FAMERP. Para tal, uma colônia isolada foi cultivada em caldo BHI a 37 °C por 16-18 horas. Após este tempo, 0,8 mL da cultura foi transferido para criotubos estéreis contendo 0,2 mL de glicerol 50% estéril, a fim de se obter uma concentração final de 10% de glicerol, ideal para a preservação de culturas microbianas por períodos prolongados (MADIGAN et al., 2004). Para cada isolado, o armazenamento foi realizado em duplicata.

4.1.1 Isolados clínicos

Foram selecionadas para o estudo 24 cepas de *E. faecalis* e 22 de *E. faecium*, isolados de pacientes admitidos no Hospital de Base de São José do Rio Preto - SP (HB), entre abril de 2012 a fevereiro de 2013. Estes isolados foram obtidos de uroculturas e hemoculturas realizadas pelo setor de Microbiologia do Laboratório Central do HB (LC/HB), de acordo com seus procedimentos de rotina para isolamento e identificação das espécies.

Os isolados clínicos foram incluídos no estudo com a finalidade de se comparar o perfil de resistência aos antimicrobianos e a presença de fatores de virulência.

4.2 Identificação e teste de susceptibilidade de *Enterococcus* spp.

Em *Enterococcus* isolados de alimentos, os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA) foram realizados pelo método de disco difusão em ágar *Müller-Hinton*, e a interpretação dos resultados foi conduzida de acordo com as recomendações do CLSI (2013; 2012).

Foram testados os seguintes antimicrobianos: penicilina (10 U), ampicilina (10 µg), vancomicina (30 µg), teicoplanina (30 µg), tetraciclina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), levofloxacina (5 µg), norfloxacina (10 µg), fosfomicina (200 µg), cloranfenicol (30 µg), quinupristina-dalfopristina (15 µg), linezolida (30 µg), estreptomicina (300 µg) e gentamicina (120 µg).

Além do teste de disco difusão em ágar *Müller-Hinton*, foi realizado o TSA em 56 isolados de alimentos por microdiluição em caldo automatizada no equipamento *Vitek®2 Compact System (Biomerieux, France)* durante a rotina do laboratório central do HB. Foram testados os seguintes antimicrobianos: penicilina, ampicilina, alto nível de gentamicina, alto nível de estreptomicina, moxifloxacina, norfloxacina, ciprofloxacina, eritromicina, linezolida, teicoplanina, vancomicina e tigeciclina.

A TSA dos isolados clínicos foi realizado por microdiluição em caldo automatizada no equipamento *Vitek®2 Compact System (Biomerieux, France)*, utilizando o cartão de antibiograma (AST-612) de acordo com procedimentos de rotina para diagnóstico laboratorial do LC/HB. Os antimicrobianos testados para *Enterococcus* foram: ampicilina, penicilina, ciprofloxacina, estreptomicina, gentamicina, daptomicina, linezolida, teicoplanina e vancomicina. A interpretação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos foi conduzida de acordo com as recomendações estabelecidas nos documentos M100-S22 (CLSI, 2012) e M100-S23 (CLSI 2013).

4.3 Identificação das espécies de *Enterococcus*

O sistema de identificação automatizado *Vitek®2 Compact System (Biomerieux, France)* foi usado para a identificação das espécies de *Enterococcus* (isolados clínicos e de alimentos), utilizando o cartão de identificação de Gram-positivos (GP-Vitek®2, Biomerieux®, França) de acordo com as recomendações do fabricante. Os testes foram realizados pela equipe do Laboratório de Microbiologia do Laboratório Central do HB.

4.4 Extração de DNA genômico bacteriano

Os isolados armazenados a -80 °C foram reativadas através de cultivo em caldo TSB por 16 a 24 horas a 37 °C em agitação. Em seguida, uma alíquota de 1,5 mL da suspensão bacteriana foi centrifugada a 15.000xg por 10 minutos e o sobrenadante descartado, essa massa celular obtida (*pellet*) foi utilizada para a extração do DNA genômico bacteriano. O “*pellet*” foi homogeneizado em 200 µL de água Milli-Q e submetido à nova centrifugação a 15.000 g por 10 minutos, em seguida, após o descarte do sobrenadante, o “*pellet*” foi suspenso em 40 µL de água Milli-Q e incubado a 100 °C por 10 minutos.

Após a fase de lise e liberação do DNA, a mistura foi submetida a choque térmico em gelo por 2 minutos e centrifugada a 15.000 g por 10 segundos a 4 °C. O sobrenadante,

contendo o DNA, foi acondicionado em outro tubo de polipropileno de 1,5 mL, previamente identificado, onde foram adicionados 500 µl de etanol absoluto a -20 °C (*Merck Chemicals*) e incubado em gelo por 20 minutos. Após a incubação, a amostra foi centrifugada a 16.000g por 10 minutos, o sobrenadante descartado e 300 µl de etanol 70% (-20 °C) adicionados à amostra, em seguida, as etapas de homogeneização e centrifugação foram repetidas. O sobrenadante foi descartado e, após a secagem, o DNA foi ressuspensionado com 100 µL de tampão TE e 2 µL de RNase (2 µg/mL) (Kit comercial Invitrogen®) e a amostra de DNA foi incubada por 30 minutos a 37 °C em termobloco Thermomixer Comfort (Eppendorf). O DNA foi quantificado em espectrofotômetro Biophotometer (Eppendorf) armazenado em freezer -20 °C para posterior utilização.

4.5 Detecção de genes de virulência em *Enterococcus* spp.

A presença de genes de virulência *esp*, *as*, *ace*, *efaA*, *gelE*, *cylA* e *hyl* foi investigada por PCR.

Para a detecção dos genes *as*, *ace*, *efaA* e *gelE*, a reação foi conduzida de acordo com protocolo de Mannu e colaboradores (2003). Para a detecção dos genes *cylA* e *hyl* foi utilizado protocolo desenvolvido por Vankerckhoven e colaboradores (2004) e para o gene *esp*, o protocolo de Shankar et al. (1999). Na Tabela 2 está descrita a sequência dos *primers* e a temperatura de anelamento para cada gene de virulência. As reações de PCR foram conduzidas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, CA, USA). Os produtos da amplificação foram analisados em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio (Invitrogen, 0,8 µL/100 mL) e visualizado sob luz ultra violeta. O gel foi fotografado utilizando o aparelho LPix Ex (Loccus Biothechnology).

Tabela 2 - Primers e temperatura de anelamento usados para detectar genes de virulência em *Enterococcus* spp.

Gene	Fator de virulência	Primer	Sequências (5'-3')	Pb	TA	Referências
<i>as</i>	Substância de agregação	AS 1	CCAGTAATCAGTCCAGAAACAACC	406	54	Mannu et al. (2003)
		AS 2	TAGCTTTTTTCATTCTTGTGTTTGTT			
<i>ace</i>	Adesina de colágeno em <i>E. faecalis</i>	ACE 1	AAAGTAGAATTAGATCCACAC	320	56	Mannu et al. (2003)
		ACE 2	TCTATCACATTCGGTTGCG			
<i>gelE</i>	Gelatinase	gel E1	AGTTCATGTCTATTTTCTTCAC	402	56	Mannu et al. (2003)
		gel E2	CTTCATTATTTACACGTTTG			
<i>efaA</i>	Antígeno A <i>E. faecalis</i>	efaA1	CGTGAGAAAGAAATGGAGGA	499	56	Mannu et al. (2003)
		efaA2	CTACTAACACGTCACGAATG			
<i>esp</i>	Proteínas de superfície	Esp 46	TTACCAAGATGGTTCTGTAGGCAC	913	58	Shankar et al. (1999)
		Esp 47	CCAAGTATACTTAGCATCTTTTGG			
<i>cylA</i>	Citolisina	Cyl I	ACTCGGGGATTGATAGGC	688	56	Vankerckhoven et al. (2004)
		Cyl Iib	GCTGCTAAAGCTGCGCTT			
<i>hyl</i>	Hialuronidase	Hyl n1	ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG	276	56	Vankerckhoven et al. (2004)
		Hyl n2	GACTGACGTCCAAGTTTCCAA			

pb - tamanho do produto em pares de base; TA - temperatura de anelamento em °C; *as*: substância de agregação; *ace*: adesina de colágeno; *gelE*: gelatinase; *cyl*: citolisina; *efaA*: antígeno A; *esp*: proteína de superfície de *Enterococcus*; *hyl*: hialuronidase.

4.6 Detecção de genes de resistência em *Enterococcus* spp.

A técnica de PCR foi utilizada para detecção de genes de resistência aos antimicrobianos. Na Tabela 3 estão listados os genes que foram investigados e os *primers* utilizados.

Para os genes *tet* foram utilizados os protocolos de Ng e colaboradores (2001) e Aarestrup e colaboradores (2000). Para a detecção dos genes *van*, a reação foi conduzida de acordo com protocolo de Dutka-Malen e colaboradores (1995).

Para o gene *fosB* foi utilizado o protocolo de acordo com Arca e colaboradores (1997).

O genes *aac6-aph2* e *ant(6)-Ia* de acordo com os protocolos de Rouch e colaboradores (1987) e Klibi e colaboradores (2013), respectivamente.

As reações de PCR foram conduzidas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, CA, USA). Os produtos da amplificação foram analisados em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio (Invitrogen, 0,8 µL/100 mL) e visualizado sob luz ultravioleta. O gel foi fotografado utilizando o aparelho LPix Ex (Loccus Biothechnology).

Tabela 3 - Primers e temperatura de anelamento usados para detectar genes de resistência em *Enterococcus* spp.

Antibiótico	Gene	Primer	Sequências (5'-3')	pb	TA	Referências
VAN	<i>vanA</i>	F	GGGAAAACGACAATTGC	732	47	Dutka-Malen et al. (1995)
		Rp	GTACAATGCGGCCGTTA			
VAN	<i>vanB</i>	F	ATGGGAAGCCGATAGTC	635	47	Dutka-Malen et al. (1995)
		Rp	GATTTCGTTCTCGACC			
VAN	<i>vanC1</i>	F	GGTATCAAGGAAACCTC	822	47	Dutka-Malen et al. (1995)
		Rp	CTTCCGCCATCATAGCT			
VAN	<i>vanC2</i>	F	CTCCTACGATTCTCTTG	439	47	Dutka-Malen et al. (1995)
		Rp	CGAGCAAGACCTTTAAG			
TET	<i>tetA</i>	F	GCTACATCCTGCTTGCCTTC	210	55	Ng et al. (2001)
		Rp	CATAGATCGCCGTGAAGAGG			
TET	<i>tetB</i>	F	TTGGTTAGGGGCAAGTTTTG	659	55	Ng et al. (2001)
		Rp	GTAATGGGCCAATAACACCG			
TET	<i>tetC</i>	F	CTTGAGAGCCTTCAACCCAG	418	55	Ng et al. (2001)
		Rp	ATGGTCGTCATCTACCTGCC			
TET	<i>tetK</i>	F	TTAGGTGAAGGGTTAGGTCC	718	52	Aarestrup et al. (2000)
		Rp	GCAAACCTCATTCCAGAAGCA			
TET	<i>tetL</i>	F	CATTTGGTCTTATTGGATCG	488	47	Aarestrup et al. (2000)
		Rp	ATTACACTTCCGATTTCGG			
TET	<i>tetM</i>	F	GTAAATAGTGTTCTTGGAG	657	47	Aarestrup et al. (2000)
		Rp	CTAAGATATGGCTCTAACAA			
TET	<i>tetO</i>	F	GATGGCATAACAGGCACAGAC	614	52	Aarestrup et al. (2000)
		Rp	CAATATCACCAGAGCAGGCT			
TET	<i>tetS</i>	F	TGGAACGCCAGAGAGGTATT	660	58	Aarestrup et al. (2000)
		Rp	ACATAGACAAGCCGTTGACC			
FOS	<i>fosB</i>	F	ATATGATCAAAGGAATAAATC	429	40	Arca et al. (1997)
		Rp	CATATGAAAATTCATATGAGG			
GEN	<i>aac6-aph2</i>	F	CCAAGAGCAATAAGGGCATA	220	52	Rouch et al. (1987)
		Rp	CACTATCATAACCACTACCG			
EST	<i>ant(6)Ia</i>	F	ACTGGCTTAATCAATTTGGG	597	58	Klibi et al. (2013)
		Rp	GCCTTTCCGCCACCTCACCG			

pb - pares de base; TA - temperatura de anelamento em °C; F – *forward primer*; Rp *reverse primer*; FOS - fosfomicina; EST - estreptomicina; GEN - gentamicina; TET - tetraciclina; VAN - vancomicina.

4.7 Purificação dos produtos de PCR para sequenciamento

Os produtos obtidos das reações de PCR positivas para os genes investigados foram purificados com etanol, de acordo com protocolo adaptado de Sambrook e Russel (2001). Os “*amplicons*” foram inicialmente transferidos para tubos de 1,5 ml onde foi realizada a purificação. A estes tubos foram adicionados 3 µL de acetato de sódio 3 M seguido de 150 µL de etanol 100%. As reações foram incubados em freezer -80 °C por 20 minutos para que o DNA fosse precipitado, em seguida foram centrifugados a 16.100 g por 20 minutos a 4 °C e o sobrenadante descartado. Ao DNA precipitado foram adicionados 100µL de etanol a 70% (*Merck Chemicals*) e, em seguida, este foi centrifugado por 10 minutos a 16.000 g, à 4 °C. O DNA foi ressuspendido em 20 µl de água ultra-pura (*Invitrogen*).

4.8 Sequenciamento dos genes

O sequenciamento dos genes detectados foi realizado com o kit *Big Dye Terminator* v3.1 (*Applied Biosystems, USA*), segundo recomendações do fabricante e teve como finalidade confirmar se os “*amplicons*” obtidos na PCR correspondiam aos genes investigados. Os *primers* utilizados no seqüenciamento foram os mesmos utilizados na reação de PCR. A reação de PCR para sequenciamento foi realizada com 2,0 µL de “*Big Dye Terminator*”, 4,0 µL de solução tamponante (5X), 1,0 µL de *primer* específico (3,2 µM), 1,0 µL de DNA purificado com concentração aproximada de 200 ng/mL e água q.s.p. 20 µL. As condições de reação foram de 25 ciclos de desnaturação a 96 °C por 30 segundos, anelamento à 50 °C por 15 segundos, extensão à 60 °C por 4 minutos.

O sequenciamento foi realizado no aparelho 3130 *Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems Foster City, CA*) e as sequências comparadas às existentes no *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).

4.9 Detecção fenotípica de fatores de virulência

4.9.1 Detecção da produção de gelatinase

A produção de gelatinase foi determinada em placas contendo ágar *Müeller-Hinton* suplementado com 3% de gelatina bacteriológica e o reagente de Frazier como revelador (WHALEY et al., 1982). Os isolados que apresentaram o gene *gelE* foram semeadas no ágar e

incubados a 37 °C por 24h. A seguir um mL do reagente de Frazier foi distribuído em cima do inóculo. A presença de um halo transparente é observada ao redor dos inóculos que degradam a gelatina.

4.9.2 Detecção da produção de hemolisina

A produção da hemolisina foi detectada em placas contendo ágar BHI suplementado com 5% de papa de hemácias humanas. A presença de zonas claras ao redor das colônias indica a produção da hemolisina (EATON; GASSON, 2001).

4.10 Tipagem molecular por meio da técnica de PFGE

A tipagem molecular de 92 isolados de *Enterococcus* (48 isolados de alimentos e 44 isolados clínica) foi realizada utilizando a técnica de PFGE, de acordo com o protocolo descrito pelo CDC (2002).

As amostras foram estriadas em ágar BHI (*Oxoid*) e incubadas a 37 °C por 24h. Colônias isoladas de cada amostra foram adicionadas em tubos contendo tampão Tris EDTA (TE) e padronizadas a uma densidade óptica (DO) de 0,6 em espectrofotômetro (*Biophotometer eppendorf*), em comprimento de onda de 600nm. Em tubos de 1,5 mL foram adicionados 400 µL dessa suspensão e 20 µL de lisozima (*Sigma-Aldrich*) (20mg/mL em TE), esses tubos foram incubados em banho-maria a 55 °C por 45 minutos.

Após o período de incubação, foi adicionado nas soluções 400 µL de agarose *low melting* (*Bio-Rad*) preparada em TE na concentração de 1%. Essa suspensão foi colocada em moldes para *plug* e solidificada à temperatura ambiente por aproximadamente 15 minutos.

Depois de removidos, os *plugs* foram colocados em tubos contendo 5 mL de tampão de lise (50 mM de Tris; 50 mM de EDTA; sarcosil 1%) e 25 µL de proteinase K (*Sigma-Aldrich*) (20 mg/mL) e incubados a 54 °C por 2 horas sob agitação em shaker (*New Brunswick*). Após a incubação os *plugs* foram lavados por duas vezes com 10 mL de água da osmose reversa por 15 minutos em temperatura ambiente sob agitação, em agitador (*Nova Ética*). Em seguida, foram realizadas mais três lavagens utilizando tampão TE sob as mesmas condições de tempo e temperatura.

Os *plugs* foram cortados em tamanhos apropriados de acordo com o pente e o aparelho de PFGE e colocados em tubos contendo mix para digestão do DNA bacteriano (175 µL de

água ultra-pura; 20 µL de tampão de restrição (10X); 2 µL de soro albumina bovina (BSA) e 3 µL de enzima de restrição *SmaI*). Em seguida a solução foi incubada a 25 °C por 16 horas.

Foi montado o molde do gel e os *plugs* foram distribuídos no pente juntamente com o marcador de peso molecular (*ProMega-Markers Lambda Ladders*). Em seguida foi preparado e distribuído no molde o gel de agarose (Bio-Rad) a 1% em tampão TBE (Tris/Borato/EDTA) 0,5 X. Os fragmentos de restrição foram separados por eletroforese em campo pulsado utilizando o equipamento CHEF DR II (*Bio-Rad*) e os seguintes parâmetros de corrida: voltagem: 6V/cm, pulso inicial de 3,5 segundos e final de 23,5 segundos e tempo de corrida de 18 horas.

O gel foi corado com brometo de edítio (*Invitrogen* 0,8 µL/100 mL) e o resultado foi visualizado e fotografado com o aparelho LPix Ex (*Loccus Biothechnology*). Os perfis eletroforéticos foram analisados utilizando o programa Bionumerics (Applied Maths, Bélgica). A similaridade genética dos isolados foi determinada pelo índice de similaridade de Dice e o dendrograma construído segundo o método UPGMA (do inglês *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*), cepas com similaridade genética superior a 90% foram considerados do mesmo *cluster*.

4.11 Análise dos resultados

Os dados de virulência foram comparados entre os *Enterococcus* spp. isolados de alimentos e de origem clínica utilizando o teste de Fisher com nível de significância de 5%. Os dados foram analisados no programa estatístico *Statistical Analysis Software - SAS, version 9.0*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento e identificação de *Enterococcus* spp. a partir de alimentos

Após a análise microbiológica de 5 amostras de queijo Minas Frescal, 16 de carne bovina, 12 de carne suína e 13 de carne de frango, foram isoladas 151 colônias bacterianas, que se apresentaram como cocos Gram-positivos, catalase negativos, com teste PYR positivo e coloração azul turquesa no ágar CPS. Destas, 102 (45 isoladas de queijo, 31 de carne bovina, 12 de carne suína e 14 de frango) apresentaram o gene *tuf* (Figura 1), sendo assim identificadas como *Enterococcus* spp. (Tabela 4).

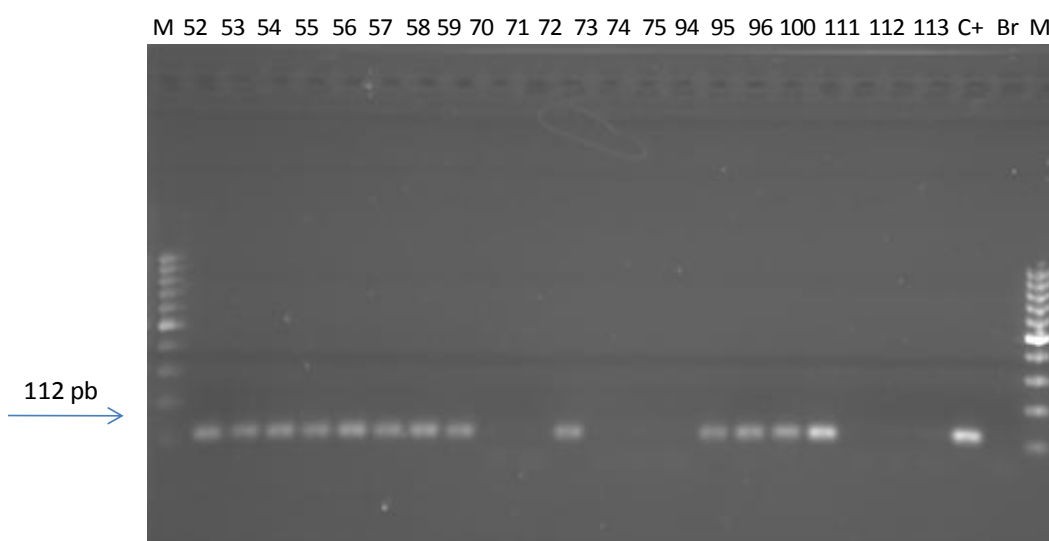


Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose mostrando o produto de amplificação do gene *tuf* para a identificação do gênero *Enterococcus*. Amostras 52-59, 72, 94-100: *Enterococcus* spp.; 70, 71, 73, 74, 75, 111, 113: amostras negativas; 112: *Lactococcus garvieae*; C+: *E. faecalis* ATCC 29212; Br: branco; M: marcador de 100pb.

Tabela 4 - *Enterococcus* spp. isolados de alimentos de origem animal

Alimento	Amostra	Nº de Isolados	Local de coleta
Queijo	1	29	A
	2	9	D
	3	4	D
	4	-	F
	5	3	F
Carne suína	1	-	E
	2	-	B
	3	4	D
	4	2	B
	5	-	D
	6	-	B
	7	5	D
	8	-	B
	9	1	H
	10	-	J
	11	-	F
	12	-	F
Carne bovina	1	-	B
	2	-	A
	3	-	B
	4	-	A
	5	2	D
	6	-	B
	7	6	A
	8	-	D
	9	7	B
	10	8	D
	11	-	G
	12	4	A
	13	1	H
	14	-	J
	15	1	J
	16	2	F
Carne de frango	1	-	A
	2	1	B
	3	-	A
	4	-	A
	5	1	F
	6	4	D
	7	1	D
	8	2	D
	9	-	B
	10	2	D
	11	1	G
	12	1	H
	13	1	J

A: estabelecimento comercial 1; B: estabelecimento comercial 2; C: estabelecimento comercial 3; D: estabelecimento comercial 4; E: estabelecimento comercial 5; F: estabelecimento comercial 6; G: estabelecimento comercial 7; H: estabelecimento comercial 8; J: estabelecimento comercial 9.

Enterococcus spp. são componentes da microbiota natural intestinal da maioria dos animais. Falhas nas boas práticas de produção de alimentos de origem animal podem resultar em contaminação do produto final, explicando assim sua presença em carnes, leite e derivados. Com relação às carnes, a contaminação das carcaças ocorre durante o abate e evisceração (LAMMIE et al., 2016; HAMMERUM et al., 2010; GIRAFFA, 2002). A ocorrência em queijos é esperada, considerando que *Enterococcus* spp. pertence ao grupo das bactérias ácido-láticas, portanto é comum a sua presença em leite e derivados (LEBRETON et al., 2014). *Enterococcus* spp. resiste a altas temperaturas aplicadas em diversas etapas da produção, a concentrações elevadas de sal e uma ampla faixa de pH. Além disso, falhas nas boas práticas de higiene durante a ordenha e processamento do leite, e a contaminação de equipamentos, água ou manipuladores favorecem sua permanência em toda a cadeia produtiva (FERNANDES et al., 2015).

Enterococcus spp. foi encontrado em 100% das carcaças de frango analisadas durante estudo realizado em oito regiões brasileiras (RISTORI et al., 2012). Na Itália, foi descrita a presença de *Enterococcus* spp. em carnes de frango, suína e bovina (PESAVENTO et al., 2014). Na Espanha, *Enterococcus* spp. foram encontrados em carnes obtidas de animais selvagens (GUERRERO-RAMOS et al., 2016). No Canadá, houve isolamento de *Enterococcus* spp. em carnes processadas e fermentadas (JAHAN et al., 2013). No Japão, *Enterococcus* spp. foram encontrados em carne de frango (HIDANO et al., 2015).

Enterococcus spp. foram isolados da linha de produção do queijo tipo Minas Artesanal no estado de Minas Gerais, especificamente em amostras de matéria-prima e no produto final (CASTRO, 2016). No Nordeste, *E. faecium* foi encontrado em queijo coalho artesanal (SANTOS et al., 2015). Em Porto Alegre, *Enterococcus* spp. foram isolados de queijo Minas Frescal (PIENIZ et al., 2015). Na Itália houve isolamento de *Enterococcus* spp. ao longo da cadeia produtiva de três tipos de queijos tradicionais (GAGLIO et al., 2016).

5.2 Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em *Enterococcus* spp. isolados de alimentos

Todos os 102 *Enterococcus* spp. isolados de alimentos foram submetidos ao teste de suscetibilidade aos antimicrobianos. Observou-se resistência a diferentes classes de antimicrobianos, sendo que 39% (40/102) apresentaram resistência à tetraciclina, 17,5% (18/102) à estreptomicina, 13% (13/102) à norfloxacin, 10% (10/102) ao cloranfenicol, 8% (8/102) à ciprofloxacina, 8% (8/102) à fosfomicina, 6% (6/102) à levofloxacina, 4% (4/102) à

linezolida, 4% (4/102) à penicilina, 3% (3/102) à ampicilina, 2% (2/102) à gentamicina. Além disso, 29,5% (30/102) dos isolados apresentaram resistência intermediária à ciprofloxacina, 23,5% (24/102) à norfloxacina, 16,5% (17/102) à levofloxacina, 8% (8/102) à fosfomicina, 7% (7/102) à linezolida, 4% (4/102) à vancomicina, 4% (4/102) à tetraciclina e 1% (1/102) ao cloranfenicol. Todos os isolados de alimentos apresentaram sensibilidade à teicoplanina (Figura 2).

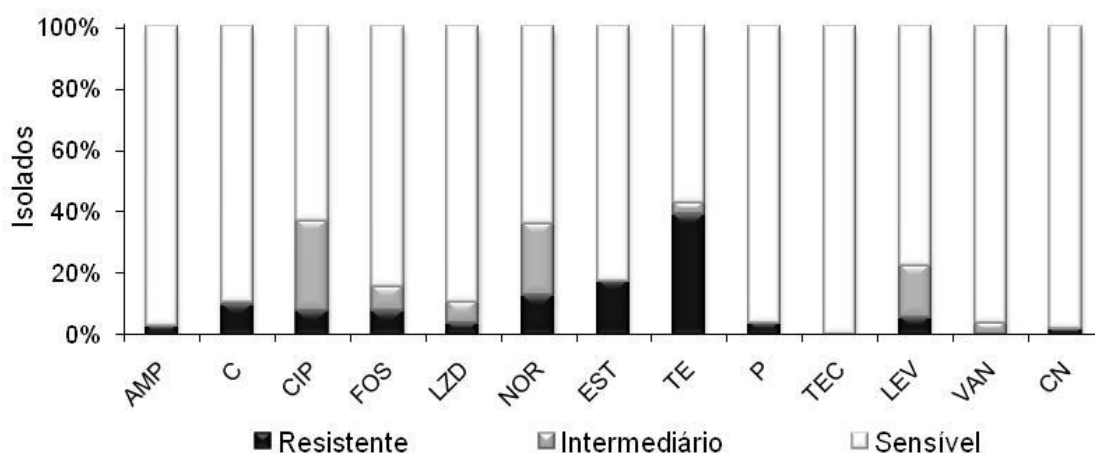


Figura 2 - Porcentagem de resistência a antimicrobianos em *Enterococcus* spp. isolados de carnes e queijos. AMP: Ampicilina; C: Cloranfenicol; CIP: Ciprofloxacina; FOS: Fosfomicina; LZD: Linezolida; NOR: Norfloxacina; EST: Estreptomicina; TE: Tetraciclina; P: Penicilina; TEC: Teicoplanina; LEV: Levofloxacina; VAN: Vancomicina; CN: Gentamicina.

A Figura 3 mostra o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos apresentados pelos 31 isolados de carne bovina, sendo que 45% (14/31) apresentaram resistência à tetraciclina, 26% (8/31) ao cloranfenicol e à estreptomicina, 17,5% (6/31) à norfloxacina, 13% (4/31) à fosfomicina, 6,5% (2/31) à ciprofloxacina e à penicilina e 3% (1/31) à ampicilina. Além disso, 39% (12/31) dos isolados apresentaram resistência intermediária à ciprofloxacina, 35,5% à norfloxacina (11/31), 22,5% (7/31) à levofloxacina, 13% (4/31) à fosfomicina, 6,5% (2/31) à vancomicina e 3% (1/31) à tetraciclina. Não foi observada resistência à teicoplanina, gentamicina e à linezolida.

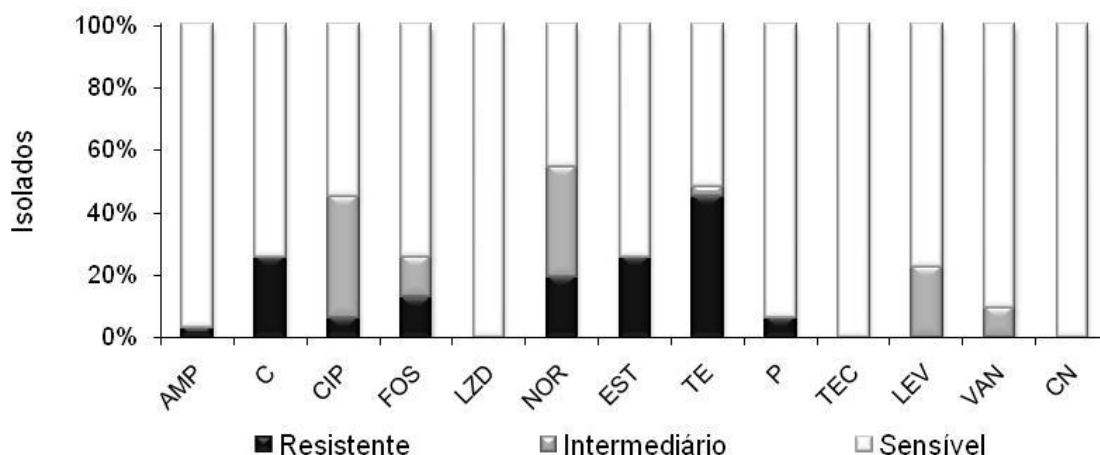


Figura 3 - Porcentagem de resistência a antimicrobianos em *Enterococcus* spp. isolados de carne bovina. AMP: Ampicilina; C: Cloranfenicol; CIP: Ciprofloxacina; FOS: Fosfomicina; LZD: Linezolida; NOR: Norfloxacina; EST: Estreptomicina; TE: Tetraciclina; P: Penicilina; TEC: Teicoplanina; LEV: Levofloxacina; VAN: Vancomicina; CN: Gentamicina.

Além disso, 17 *Enterococcus* spp. isolados de carne bovina, foram testados frente a moxifloxacina, a eritromicina e a tigeciclina. A resistência à eritromicina foi observada em 41% (7/17) e à moxifloxacina em 6% (1/17) dos isolados. Além disso, 17,5% (3/17) apresentaram resistência intermediária à eritromicina e 6% (1/17) à moxifloxacina. Não foi observada resistência à tigeciclina.

A Figura 4 mostra o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos apresentados pelos 12 *Enterococcus* spp. isolados de carne suína. A resistência à tetraciclina foi observada em 92% (11/12) dos isolados. Resistência à ciprofloxacina, à fosfomicina e à estreptomicina foi observada em 8% (1/12) dos isolados. A resistência intermediária à norfloxacina foi observada em 33% (4/12), à ciprofloxacina em 25% (3/12), à levofloxacina em 17% (2/12) e à fosfomicina em 8% (1/12). Todos os isolados de carne suína foram sensíveis à ampicilina, cloranfenicol, linezolida, penicilina, teicoplanina, vancomicina e à gentamicina.

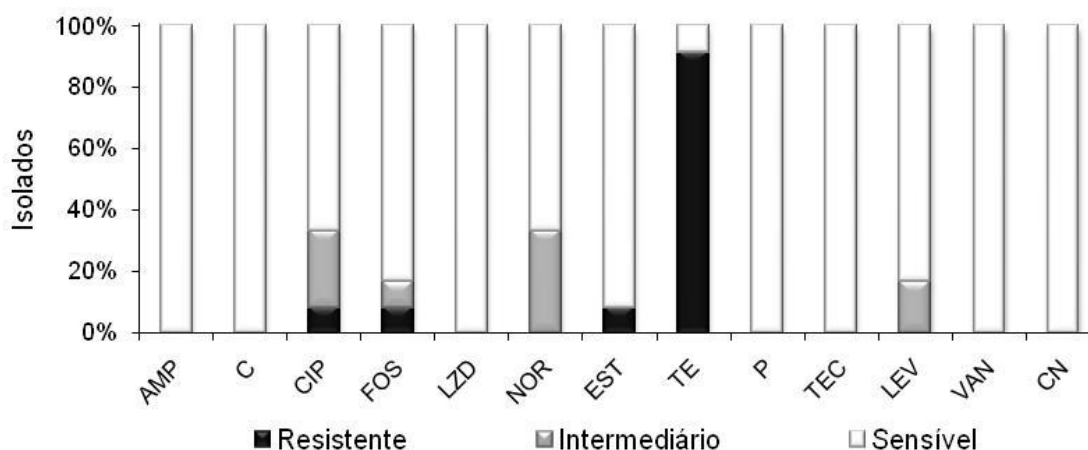


Figura 4 - Porcentagem de resistência a antimicrobianos em *Enterococcus* spp. isolados de carne suína. AMP: Ampicilina; C: Cloranfenicol; CIP: Ciprofloxacina; FOS: Fosfomicina; LZD: Linezolida; NOR: Norfloxacin; EST: Estreptomicina; TE: Tetraciclina; P: Penicilina; TEC: Teicoplanina; LEV: Levofloxacina; VAN: Vancomicina; CN: Gentamicina.

Além disso, 5 *Enterococcus* spp. isolados de carne suína, foram testados frente a moxifloxacina, a eritromicina e a tigeciclina. A resistência intermediária à eritromicina foi observada em 20% (1/5) dos isolados. Não foi observada resistência à tigeciclina e à moxifloxacina.

A Figura 5 mostra o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos apresentados pelos 14 *Enterococcus* spp. isolados de carne de frango. A resistência à tetraciclina foi observada em 64% (9/14) desses isolados, e em 21,5% (3/14) observou-se resistência à ciprofloxacina, norfloxacin, e à estreptomicina, em 14% (2/14) à ampicilina, penicilina, levofloxacina, e cloranfenicol, em 7% (1/14) à gentamicina e à linezolida. Resistência intermediária também foi verificada, sendo 21,5% (3/14) à fosfomicina, 14% (2/14) à tetraciclina e à ciprofloxacina, 7% (1/14) à linezolida, norfloxacin, levofloxacina e à vancomicina. Todos os *Enterococcus* spp. isolados de carne de frango apresentaram sensibilidade à teicoplanina.

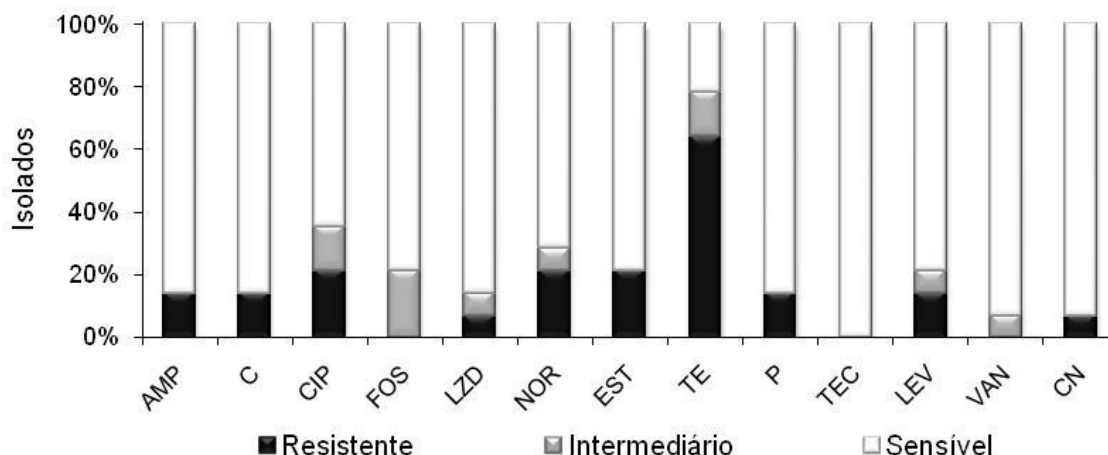


Figura 5 - Porcentagem de resistência a antimicrobianos em *Enterococcus* spp. isolados de carne de frango. AMP: Ampicilina; C: Cloranfenicol; CIP: Ciprofloxacina; FOS: Fosfomicina; LZD: Linezolida; NOR: Norfloxacina; EST: Estreptomicina; TE: Tetraciclina; P: Penicilina; TEC: Teicoplanina; LEV: Levofloxacina; VAN: Vancomicina; CN: Gentamicina.

Além disso, 9 *Enterococcus* spp. isolados de carne frango, foram testados frente a moxifloxacina, a eritromicina e a tigeciclina. A resistência à eritromicina foi observada em 67% (6/9) e à moxifloxacina em 11% (1/9) dos isolados. Além disso, 11% (1/9) apresentaram resistência intermediária à moxifloxacina. Não foi observada resistência à tigeciclina.

A Figura 6 mostra o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos apresentados pelos 45 isolados de queijo Minas Frescal. Foi observado que 13,5% (6/45) desses *Enterococcus* spp. apresentaram resistência à tetraciclina e à estreptomicina, 9% (4/45) à norfloxacina e à levofloxacina, 7% (3/45) à linezolida e à fosfomicina, 4,5% (2/45) à ciprofloxacina e 2% (1/45) à gentamicina. Esses isolados apresentaram resistência intermediária, sendo 29% (13/45) à ciprofloxacina, 18% (8/45) à norfloxacina e à levofloxacina, 13,5% (6/45) à linezolida e 2% (1/45) à vancomicina, tetraciclina e ao cloranfenicol. Todos os *Enterococcus* spp. isolados de queijo Minas Frescal apresentaram sensibilidade à ampicilina, penicilina e à teicoplanina.

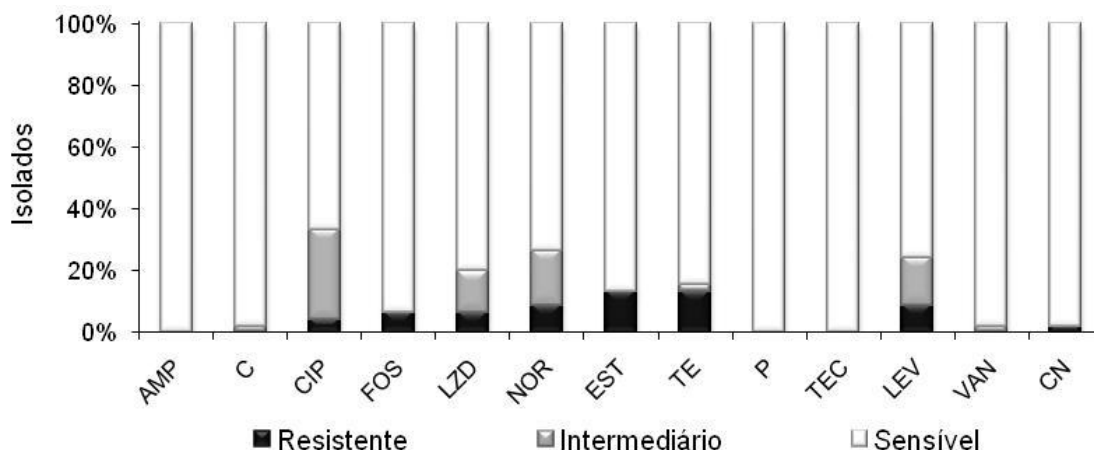


Figura 6 - Porcentagem de resistência a antimicrobianos em *Enterococcus* spp. isolados de queijo Minas Frescal. AMP: Ampicilina; C: Cloranfenicol; CIP: Ciprofloxacina; FOS: Fosfomicina; LZD: Linezolida; NOR: Norfloxacin; EST: Estreptomicina; TE: Tetraciclina; P: Penicilina; TEC: Teicoplanina; LEV: Levofloxacina; VAN: Vancomicina; CN: Gentamicina.

Além disso, 25 *Enterococcus* spp. isolados de queijo, foram testados frente a moxifloxacina, a eritromicina e à tigeciclina. A resistência à eritromicina foi observada em 20% (5/25). Além disso, 52% (13/25) apresentaram resistência intermediária à eritromicina e 8,5% (2/25) à moxifloxacina. Não foi observada resistência à tigeciclina.

O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos apresentado pelos *Enterococcus* spp. estudados é similar aos descritos por outros autores no Brasil e em diversos países. Abouelnaga e colaboradores (2016) detectaram resistência à ciprofloxacina, eritromicina, cloranfenicol, penicilina e à tetraciclina em *Enterococcus* spp. isolados de carnes frescas e fermentadas e em queijos. Campos e colaboradores (2013) observaram altas taxas de resistência à tetraciclina e à ciprofloxacina em *E. faecalis*, *E. faecium* e *Enterococcus* spp. isolados de carcaças de frangos. De acordo com Ristori e colaboradores (2012), diversas espécies de *Enterococcus* isolados de carcaças de frango no estado de São Paulo apresentaram resistência a pelo menos um dos nove antimicrobianos testados, altas taxas de resistência foram observadas para tetraciclina (89,2%), quinupristina-dalfopristina (91,4%), ciprofloxacina (65%), cloranfenicol (55,4%) e à linezolida (6,5%).

Um estudo realizado com *E. faecalis* e *E. faecium* isolados de queijos no Sul do Brasil, encontrou resistência à tetraciclina, norfloxacin, cloranfenicol e à vancomicina (FURLANETO-MAIA et al., 2014). *Enterococcus* isolados de carnes cruas e de leite e derivados no estado do Rio Grande do Sul apresentaram resistência à tetraciclina (42%), à

gentamicina (35%), à estreptomicina (28%), à ampicilina (11%) e à vancomicina (3,7%) (RIBOLDI et al., 2009). Em Minas Gerais, amostras de leite e ricota também apresentaram *Enterococcus* spp. resistentes a antimicrobianos, sendo 14% resistentes à tetraciclina, 9,3% à eritromicina, 1,9% à estreptomicina e 0,9% ao cloranfenicol (FERNANDES et al., 2015).

Em diversos países, como na Itália, Marrocos, Japão e Turquia, *Enterococcus* também tem sido isolados de alimentos de origem animal e apresentando resistência a vários antimicrobianos (HAMMAD et al., 2014; KOLUMAN et al., 2009; VALENZUELA et al., 2008; MESSI et al., 2006). Na China, Zou e colaboradores (2011) detectaram em *E. faecalis* isolados de suínos resistência à eritromicina (66,67%) e à ciprofloxacina (64,10%). Nos Estados Unidos, Kilonzo-Nthenge e colaboradores (2014) detectaram resistência à estreptomicina, eritromicina e à penicilina em *Enterococcus* spp. isolados de frangos provenientes de produção convencional e orgânica. Na Espanha, *Enterococcus* spp. isolados de carnes apresentaram resistência à eritromicina (89,1%), tetraciclina (67,3%), ciprofloxacina (92,7%) e à quinupristina-dalfopristina (81,8%) (GUERRERO-RAMOS et al., 2016).

5.3 Suscetibilidade de *Enterococcus* spp. a diferentes antimicrobianos

Neste tópico, a suscetibilidade a diferentes antimicrobianos será discutida separadamente e relacionada ao tipo de alimento de onde cada *Enterococcus* spp. foi isolado.

5.3.1 Resistência à tetraciclina e à tigeciclina

A resistência à tetraciclina foi encontrada em 39% (40/102) dos *Enterococcus* spp. estudados, sendo 45% (14/31) de carne bovina, 91,5% (11/12) de carne suína, 64% (9/14) de carne de frango e 13,5% (6/45) em queijo Minas Frescal. Não foi detectada resistência à tigeciclina entre os 56 isolados de alimentos testados frente a este antimicrobiano.

Como discutido anteriormente, Ristori e colaboradores (2012), encontraram altas taxas de resistência à tetraciclina em *Enterococcus* spp. isolados de carcaças de frango no Brasil. Em um estudo realizado na Nigéria, Ayeni e colaboradores (2016) relataram que 81,67% dos *Enterococcus* spp. isolados de fezes de frango apresentaram resistência à tetraciclina. Segundo esses autores, esse antimicrobiano é amplamente utilizado devido ao seu amplo espectro de ação e baixo custo. Na Itália, 65,2% dos *Enterococcus* spp. isolados de frango também apresentaram resistência à tetraciclina (BERTELLONI et al., 2015). Pesavento e

colaboradores (2014) isolaram *Enterococcus* spp. resistentes à tetraciclina de carnes bovina, suína e de frango. Korotkevich (2016) observou que 40% dos *Enterococcus* spp. isolados de carne bovina e frango também apresentaram resistência à tetraciclina.

A tetraciclina foi usada no Brasil como promotor de crescimento até 1998 em criações de bovinos, suínos, aves e peixes, ano em que a prática foi proibida (BOELTER, 1998). Entretanto, ainda é utilizado para tratamento de infecções em animais de produção, o que pode contribuir para a ocorrência de altos índices de resistência (OLIVEIRA et al., 2005). Esta realidade consiste em um desafio considerando-se que as tetraciclinas são antimicrobianos classificados como criticamente importantes para a medicina veterinária (OIE, 2015), sendo essenciais para o tratamento de infecções específicas para as quais não existem alternativas terapêuticas eficientes.

Além disso, considerando que os genes que conferem resistência à tetraciclina estão localizados em plasmídeos e em transposons, a facilidade de troca genética observada entre espécies de *Enterococcus* e a pressão seletiva exercida pelo uso da tetraciclina na produção animal, pode-se deduzir que esses são os motivos das altas taxas de resistência à tetraciclina em *Enterococcus* isolados de alimentos de origem animal (OIE, 2015; KOO; WOO, 2011; ROBERST, 2005).

Entre as poucas fontes de informação existentes sobre a quantidade de antimicrobianos comercializados para uso em animais de produção no Brasil, um estudo voltado para a cadeia leiteira no Sul do país identificou que a tetraciclina é utilizada por 36% dos produtores entrevistados (KORB et al., 2011). Moraes e colaboradores (2010) avaliaram a presença de resíduos de antimicrobianos em 57 amostras de leite pasteurizado, e encontraram tetraciclinas em 25 (44%). Nos Estados Unidos, um levantamento sobre a quantidade de antimicrobianos destinados à produção animal mostrou que a tetraciclina representou o maior volume de vendas no mercado interno em 2014. Nesse levantamento foi constatado que houve um aumento no consumo de 25% a partir de 2009 até 2014 (FDA, 2015).

5.3.2 Resistência à eritromicina

A resistência à eritromicina foi encontrada em 32% (18/56) dos *Enterococcus* spp. isolados de alimentos, sendo 67% (6/9) de carne de frango, 41% (7/17) de carne bovina e 20% (5/25) de queijo. Além disso, foi observada a resistência intermediária em 52% (13/25) dos isolados de queijo.

No Brasil, *Enterococcus* spp. resistentes a eritromicina foram isolados de carne de frango, leite e ricota (FERNANDES et al., 2015; RISTORI et al., 2012; RIBOLDI et al., 2009). Em outros países, foram isolados de alimentos de origem animal, como carne de boi, de frango e de porco (KLIBI et al., 2013; ASLAM et al., 2012).

A resistência a eritromicina em *Enterococcus* spp. é codificada principalmente pelo gene *ermB*, que confere resistência à macrolídeos e resistência cruzada a lincosamidas e estreptograminas B (DEL GROSSO et al., 2007). A resistência observada nos isolados estudados está provavelmente relacionada com a utilização dessa classe de antimicrobianos na produção animal (ZOU et al., 2011). O uso da eritromicina em nutrição animal foi proibido no Brasil em 2012, no entanto, ainda é utilizada para o tratamento de infecções (MAPA, 2012). Além disso, o uso da tilosina, um macrolídeo aprovado como promotor de crescimento no Brasil (MAPA, 2015), pode selecionar cepas resistentes a eritromicina. De fato, Zou e colaboradores (2011) discutiram a resistência à eritromicina como resultado do uso indiscriminado de macrolídeos, especialmente de tilosina, como promotor de crescimento e para tratamento de doenças na produção animal. De acordo com estes autores, a resistência à eritromicina de *E. faecalis* isolados de suínos esta associada com a presença do gene *ermB*. Em um estudo que avaliou o efeito do uso da tilosina em granjas de suínos, observou-se que a maior taxa de resistência à eritromicina ocorreu na granja que fazia uso de tilosina como promotor de crescimento. O gene *ermB*, responsável pela resistência à eritromicina foi detectado em 95% dos 662 *Enterococcus* spp. estudados (JACKSON et al., 2004).

Huys e colaboradores (2004) pesquisando genes de resistência em diferentes espécies de *Enterococcus* isoladas queijos, encontraram o gene *ermB* em um transposon conjugativo contendo também genes que conferem resistência à tetraciclina, promovendo uma co-resistência a esses antimicrobianos.

5.3.3 Altos níveis de resistência à estreptomicina e à gentamicina

Enterococcus spp. apresentando alto nível de resistência à estreptomicina foram encontrados nesse estudo, correspondendo a 17,5% (18/102) dos isolados. Destes, 26% (8/31) foram isolados de carne bovina, 21,5% (3/14) de carne de frango, 13,5% (6/45) de queijo e 8,5% (1/12) de carne suína. Com relação à gentamicina, apenas 2% (1/45) dos isolados de queijo Minas Frescal e 7% (1/14) de carne de frango apresentaram resistência.

A aquisição de altos níveis de resistência aos aminoglicosídeos em *Enterococcus* spp. impossibilita o uso de terapia combinada, baseada no sinergismo com antimicrobianos que

agem na parede celular, tais como a penicilina, ampicilina ou a vancomicina (ARIAS E MURRAY, 2012).

Em um estudo realizado no Paraná sobre a comercialização de medicamentos veterinários para uso em frangos de corte, verificou-se que os aminoglicosídeos estão entre os antimicrobianos mais utilizados para profilaxia de infecções na fase de desenvolvimento final da produção (SESA, 2005). Pesquisas no Brasil já relataram resistência aos aminoglicosídeos em bactérias isoladas de frangos, como relatado por Ristori e colaboradores (2012) que encontraram alto nível de resistência à gentamicina e à estreptomicina em 28,6% dos *Enterococcus* isolados de carcaças. Camargo e colaboradores (2014) também detectaram resistência à gentamicina em *E. faecalis* isolados de frango. Campos e colaboradores (2013) associaram o alto nível de resistência à eritromicina em *Enterococcus* isolados de carcaças de frango a ampla utilização dessa classe de antimicrobiano em criação animal.

Em outros alimentos de origem animal, *Enterococcus* apresentando altos níveis de resistência à gentamicina e à estreptomicina também já foram descritos. Em *Enterococcus* isolados de carnes de animais selvagens foi observado que 9,1% apresentaram resistência à gentamicina e à estreptomicina (GUERRERO-RAMOS et al., 2016). Em carne bovina foram encontrados *Enterococcus* resistentes à gentamicina, sendo 32,3% *E. faecium*, 32% *E. faecalis* e 45,4% *E. durans*. Este estudo também relatou resistência em 11% dos *E. faecalis* isolados de carne suína (PESAVENTO et al., 2014).

5.3.4 Resistência à fosfomicina

Nesse estudo 8% (8/102) dos isolados apresentaram resistência à fosfomicina, sendo 12% (4/31) de carne bovina, 8,5% (1/12) de carne suína, e 6,5% (3/45) de queijo. Resistência intermediária foi detectada em 21,5% (3/14), 12% (4/31) e 8,5% (1/12) em isolados de carne de frango, bovina e suína, respectivamente. A resistência à fosfomicina também foi detectada em *E. faecalis*, *E. faecium* e em *E. durans* isoladas de carnes de animais selvagens (GUERRERO-RAMOS et al., 2016).

A fosfomicina é aprovada pela FDA para o tratamento de infecções do trato urinário causadas por *Enterococcus* sensíveis à vancomicina, exceto para *E. faecium* (ARIAS; MURRAY, 2012). Em medicina veterinária é usada no tratamento de diversas infecções causadas por *Escherichia coli* (GUTIERREZ et al., 2010). Segundo Pérez et al. (2014), a fosfomicina é utilizada também contra diversos processos infecciosos em suínos e infecções causadas por *Salmonella* e *Escherichia coli* em frangos de corte. Uma pesquisa realizada no

Sul do Brasil verificou que a fosfomicina é um dos medicamentos veterinários utilizados com a função de prevenção na fase final da produção de frango de corte (PAMvet - PR, 2005).

5.3.5 Resistência à quinupristina-dalfopristina

A combinação quinupristina-dalfopristina é utilizada no tratamento de diversas infecções causadas por patógenos Gram-positivos multi-resistentes, incluindo, *E. faecium* resistente à vancomicina (SAHGAL et al., 1995). *E. faecalis* apresenta resistência intrínseca a esse antimicrobiano (ALLINGTON; RIVEY, 2002). Nesse estudo a resistência à quinupristina-dalfopristina foi avaliada em 21 isolados (11 *E. faecium* e 10 *E. durans*) e foi detectada em 14% (3/21). A resistência intermediária foi observada em 24% (5/21) dos isolados, todos provenientes de amostras de queijo.

Peters e colaboradores (2003) também detectaram resistência à quinupristina-dalfopristina em *E. faecium* isolados de queijos e carnes. Por outro lado, no estudo conduzido por Talebi e colaboradores (2015), não foi observado resistência à quinupristina-dalfopristina em *Enterococcus* spp. isolados de queijo.

Sabe-se que a resistência à quinupristina-dalfopristina em *Enterococcus* spp. pode resultar do uso da virginiamicina na produção animal, pois esta prática seleciona cepas resistentes à virginiamicina e com resistência cruzada à quinupristina-dalfopristina (WERNER et al., 1998). Esse fato pode explicar as taxas de resistência observadas nesse estudo, uma vez que no Brasil, o uso da virginiamicina é permitido como aditivo nas rações para a produção de bovinos, suínos e frangos (MAPA, 2015).

5.3.6 Resistência à penicilina e à ampicilina

A ampicilina e a penicilina são uma opção para o tratamento de infecções por *Enterococcus* spp., sendo usadas isoladamente ou em associação com os aminoglicosídeos (MALANI et al., 2002). A resistência à ampicilina foi observada em 3% (3/102) dos isolados, sendo 14% (2/14) de carne de frango e 3,2% (1/31) de carne bovina. A resistência à penicilina foi detectada em 4% (4/102) dos isolados, sendo 6,5% (2/31) em carne bovina e 14% (2/14) em carne de frango.

Apesar da resistência à ampicilina e à penicilina ter sido baixa nesse estudo, no Sul do Brasil foi realizado um levantamento dos principais fármacos utilizados no rebanho leiteiro, e verificou-se que as penicilinas estão entre os antimicrobianos com o maior número de citações

pelos entrevistados, sendo utilizada por 24% dos produtores (KORB et al., 2011). Campos e colaboradores (2013) detectaram uma taxa maior (10,71%) de resistência à ampicilina em *Enterococcus* spp. isolados de carcaças de frango em Brasília.

Foi verificado nos Estados Unidos por Kilonzo-Nthenge e colaboradores (2015), que 14,1% e 88,5% dos *Enterococcus* spp. apresentaram resistência à penicilina em carne de frango orgânico e convencional, respectivamente. Nesse país, as penicilinas representam 9% do total das vendas de antimicrobianos destinados à produção animal (FDA, 2015).

5.3.7 Resistência à vancomicina

Com relação à vancomicina, foi observada resistência intermediária em 4% (4/102) dos isolados de alimentos, sendo 6,5% (2/31) de carne bovina, 7% (1/14) de carne de frango, e 2% (1/45) de queijo. Em outros estudos conduzidos no Brasil a resistência à vancomicina em *Enterococcus* spp. isolados de carcaças de frango, de leite, ricota e de suabes de cloaca de frangos não foi detectada (FERNANDES et al., 2015; XAVIER et al., 2008), ou foi encontrada em baixas porcentagens em *Enterococcus* isolados de carne de frango e em queijo tipo colonial (RISTORI et al., 2012; RIBOLDI et al., 2009). Em Portugal, ERV foi detectado em poeira proveniente de instalações de granjas de suínos, após análises genéticas dessas cepas, os autores concluíram que a poeira pode ser um veículo de transmissão cruzada de ERV entre animais e humanos (BRAGA et al., 2013).

A resistência à vancomicina em *Enterococcus* isolados de alimentos de origem animal está associada ao uso da avoparcina como aditivo alimentar. A avoparcina é um análogo da vancomicina, e acredita-se que seu uso induza à resistência cruzada à vancomicina em *Enterococcus* spp. (AARESTRUP et al., 2001). No Brasil, o uso da avoparcina foi permitido por 10 anos, e em 1998 foi banida (MAPA, 1998). No ano seguinte, foi publicado um estudo realizado no Japão, que relatou a presença de *Enterococcus* resistente à vancomicina em carcaças de frango importadas do Brasil (IKE et al., 1999).

A detecção de *Enterococcus* spp. resistente à vancomicina em alimentos é preocupante, pois após o aumento de infecções causadas por espécies multiresistentes, a vancomicina se tornou uma das últimas possibilidades indicadas para o tratamento dessas cepas (MARSHALL E LEVY, 2011). Além disso, um estudo comprovou a propagação de um clone de *E. faecium* resistente à vancomicina entre animais e humanos (HAMMERUM et al., 2000).

5.3.8 Resistência à norfloxacin, ciprofloxacina, levofloxacina e à moxifloxacina

As fluoroquinolonas podem ser usadas para o tratamento de infecções do trato urinário por *E. faecalis*. A atividade antimicrobiana da ciprofloxacina é descrita como moderada, e a moxifloxacina e gatifloxacina apresentam melhor atividade (CERCENADO, 2011). Entretanto, a resistência tem sido relatada em diversos países (YASUFUKU et al., 2011).

Neste estudo, a resistência à ciprofloxacina foi detectada em 8% (8/102) dos isolados, sendo 6,5% (2/31) em carne bovina, 8,5% (1/12) em carne suína, 21,5% (3/14) em carne de frango e 4,5% (2/45) de queijo. Resistência intermediária também foi detectada em 29,5% (30/102) dos isolados, sendo 38% (12/31) em carne bovina, 25% (3/12) em carne suína, 14% (2/14) em carne de frango e 28% (13/45) em queijo.

A resistência à norfloxacin foi observada em 12% (13/102) dos isolados, sendo 19% (6/31) de carne bovina, 21,5% (3/14) de carne frango e 9% (4/45) de queijo. Resistência intermediária foi detectada em 23,5% (24/102), sendo 35,5% (11/31) de carne bovina, 33% (4/12) de carne suína, 7% (1/14) de carne de frango e 18% (8/45) de queijo.

Resistência à moxifloxacina foi detectada em 3,5% (2/56), sendo 6% (1/17) em carne bovina, 11% (1/9) em carne de frango. Resistência intermediária foi detectada em 7,5% (4/56) dos isolados, sendo 6% (1/17) em carne bovina, 11% (1/9) em carne de frango e 8,5% (2/25) em queijo.

Resistência à levofloxacina foi detectada em 6% (6/102) dos isolados, sendo 14% (2/14) em carne de frango e 8% (4/45) em queijo. Resistência intermediária foi detectada em 16,5% (17/102) dos isolados, sendo 22,5% em carne bovina (7/31), 16,5% carne suína (2/12), 15,5% (7/45) em queijo e 8% (1/12) em carne de frango.

A resistência as quinolonas também tem sido descrita em outros estudos com *Enterococcus* isolados de alimentos de origem animal no Brasil e em outros países (YILMAZ et al., 2016; GUERRERO-RAMOS et al., 2016; CAMPOS et al., 2013). Esse fato pode ser decorrente do uso da enrofloxacin na cadeia produtiva de alimentos de origem animal, uma vez que a enrofloxacin foi a primeira fluoroquinolona introduzida e aprovada na medicina veterinária para uso em animais de pequeno porte (PAPICH; RIVIERE, 2001). O emprego da enrofloxacin apresenta rápida ação bactericida contra uma variedade de agentes patogênicos e vem sendo utilizada em espécies domésticas, exóticas e silvestres, principalmente na avicultura industrial. Sua administração é bem tolerada, tanto por via oral, como subcutânea e intramuscular (MARTINEZ et al., 2006).

5.3.9 Resistência ao cloranfenicol

A resistência ao cloranfenicol foi detectada em 10% dos isolados (10/102), sendo 26% (8/31) em carne bovina e 14% (2/14) em carne de frango. A resistência intermediária foi detectada em 1 (1/45) isolado de queijo. No Brasil a utilização do cloranfenicol como promotor de crescimento foi proibida em 1998. Em 2003 foi proibido o seu uso na produção animal (MAPA, 2003; 1998). No entanto, *Enterococcus* isolados de alimentos de origem animal resistentes ao cloranfenicol são isolados no Brasil, como mostra o estudo de Campos e colaboradores (2013), que encontraram resistência ao cloranfenicol em 28,57% dos *Enterococcus* isolados de carcaças de frangos. No estudo conduzido por Fernandes e colaboradores (2015), apenas uma cepa de *E. faecium* apresentou resistência ao cloranfenicol.

5.3.10 Resistência à linezolida

A resistência à linezolida foi detectada em 4% dos isolados (4/102), sendo 7% (1/14) em carne de frango e 6,5% (3/45) em queijo. Resistência intermediária foi detectada em 7% (7/102) dos isolados, sendo 7% (1/14) em carne de frango e 13% (6/45) em queijo. A linezolida pertence à classe das oxazolidinonas, e constitui uma das opções para o tratamento de infecções causadas por cocos Gram-positivos multirresistentes, incluindo os ERV (BIMINGHAM et al., 2003). No entanto, casos de resistência em isolados de alimentos já foram relatados tanto no Brasil como em outros países (PESAVENTO et al., 2014; RISTORI et al., 2012). Foi observado no Egito, que cepas de *E. faecalis* provenientes de queijo fresco apresentaram resistência à linezolida (HAMMAD et al., 2015).

5.4 Suscetibilidade aos antimicrobianos em *Enterococcus* spp. isolados de pacientes atendidos em um hospital terciário

Os isolados clínicos foram incluídos no estudo com a finalidade de se comparar seu fenótipo e genótipo de resistência aos antimicrobianos, e o perfil de genes de virulência com os *Enterococcus* spp isolados de alimentos. Sendo assim, foram selecionados 46 *Enterococcus* spp. isolados de pacientes internados, com o seguinte perfil de resistência aos antimicrobianos: 67,5% (31/46) resistentes à ciprofloxacina, 56,5% (26/46) à penicilina, 43,5% (20/46) à ampicilina, 37% (17/46) à estreptomicina, 24% (11/46) à vancomicina e à teicoplanina e 11% (5/46) à gentamicina (Figura 7).

Estas taxas foram mais altas que as observadas nos *Enterococcus* spp. isolados de alimentos, uma vez que a resistência à ciprofloxacina foi de 7,8% (8/102), à penicilina de 3,9% (4/102), à ampicilina de 2,9% (3/102) e à estreptomicina de 17,6% (18/102).

No Brasil, a penicilina, ampicilina, estreptomicina, e gentamicina são produtos com licença vigente para uso na medicina veterinária (MAPA, 2014), porém nesse estudo as taxas de resistência em *Enterococcus* spp. isolados de carnes e queijos são inferiores quando comparadas as taxas de resistência dos isolados clínicos. Este resultado pode ser explicado pela intensa pressão seletiva exercida pelo uso destes antimicrobianos para o tratamento de diversos processos infecciosos no ambiente hospitalar (KRISTICH et al., 2014).

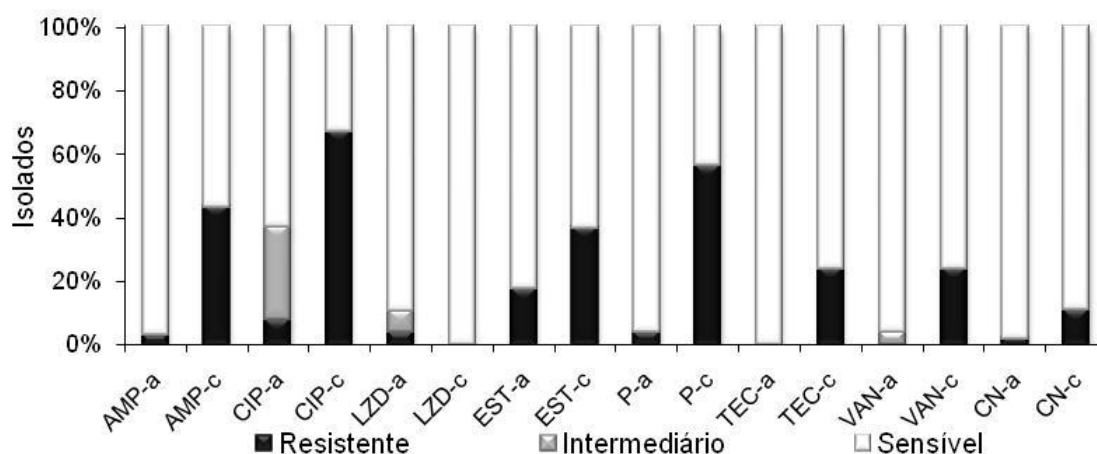


Figura 7 - Comparativo da resistência a antimicrobianos em *Enterococcus* spp. isolados de alimentos (a) e clínicos (c). AMP: Ampicilina; CIP: Ciprofloxacina; LZD: Linezolida; EST: Estreptomicina; P: Penicilina; TEC: Teicoplanina; VAN: Vancomicina; CN: Gentamicina.

Em outros estudos no Brasil, *Enterococcus* spp. isolados de urina, infecção de corrente sanguínea, de fluido traqueal e suabe retal de pacientes de um hospital universitário apresentaram resistência à vancomicina e à gentamicina (FURLANETO-MAIA et al., 2014). Soares e colaboradores (2014) relataram em *Enterococcus* spp. de origem clínica, principalmente associados a infecção urinária e de corrente sanguínea, resistência à ampicilina, ciprofloxacina, gentamicina e à vancomicina.

No estudo realizado por Wang e colaboradores (2015) também foram detectadas altas taxas de resistência à ampicilina, ciprofloxacina, gentamicina e vancomicina em *E. faecium* e *E. faecalis* isolados de pacientes com infecção urinária. Em outro estudo com cepas de *Enterococcus* também provenientes de pacientes com infecção urinária foi detectada

resistência aos antimicrobianos do grupo das penicilinas, ciprofloxacina, gentamicina e estreptomicina (GOEL et al., 2016).

O perfil de resistência apresentado pelos *Enterococcus* de origem clínica desse estudo são preocupantes, pois esses antimicrobianos são indicados para tratamento de diversas infecções causadas por cepas de *Enterococcus*, seja isolados ou em sinergia com outras moléculas, chamando a atenção para o uso racional de antimicrobianos.

5.5 Genes de resistência a antimicrobianos

5.5.1 Genes que conferem resistência à tetraciclina

Neste estudo, entre os *Enterococcus* spp. isolados de alimentos resistentes à tetraciclina foram detectados os seguintes genes: *tetM* (45%, 19/42), *tetL* (40,5%, 17/42), *tetK* (19%, 8/42) e *tetC* (14%, 6/42) (Figura 8).

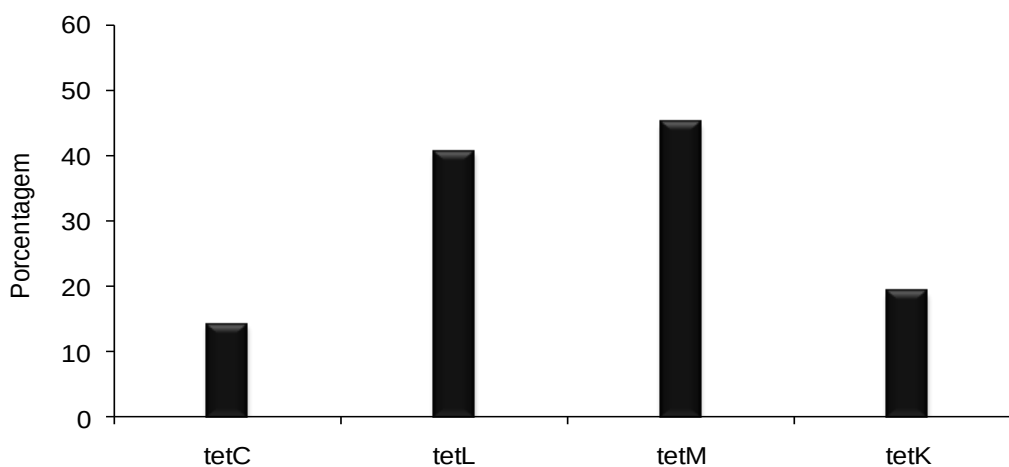


Figura 8 - Porcentagem de genes de resistência à tetraciclina em *Enterococcus* spp. isolados de alimentos.

YILMAZ e colaboradores (2016) observaram a prevalência dos genes *tetM* e *tetL* em *Enterococcus* spp. resistentes à tetraciclina isolados de carne bovina e de frango. Ishihara e colaboradores (2013) observaram a ocorrência dos genes *tetM* e *tetL* em *E. faecium* e *E. faecalis* isolados de queijos e de leite. Em um estudo realizado no Egito, os genes *tetM*, *tetL* e *tetK* foram detectados em *Enterococcus* spp. isolados de queijos frescos (HAMMAD et al., 2015). Na Austrália, todos os *Enterococcus* resistentes à tetraciclina isolados de suínos apresentaram os genes *tetM* e *tetL* (FARD et al., 2011).

No presente estudo *tetM* e *tetL* foram detectados na maioria dos isolados resistentes à tetraciclina. O gene *tetM* está localizado normalmente no cromossomo bacteriano, mas é encontrado também em um transposon conjugativo similar ao Tn916, facilitando sua disseminação (FLETCHER et al., 1989). Esse fato foi observado em um estudo realizado com *Enterococcus* spp. provenientes da cadeia produtiva de carne suína que apresentavam o gene *tetM*. Ensaio de conjugação mostraram que 50% dessas cepas foram capazes de transferir esse gene a cepas receptoras de *E. faecalis* e *Listeria innocua*, que também eram provenientes da linha de produção de alimentos (RIZZOTTI et al., 2009).

A presença do gene *tetC* entre os isolados de alimentos (Figura 9), é um resultado muito interessante, considerando que até o momento não há relatos desse gene em bactérias Gram-positivas.

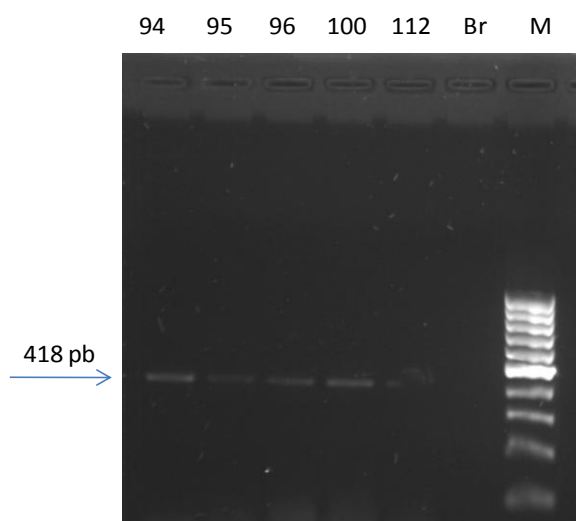


Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose mostrando o produto de amplificação do gene *tet C*. Amostra 94: *Enterococcus* spp.; Amostra 95: *E. faecalis*; Amostra 96: *Enterococcus* spp.; Amostra 100: *Enterococcus* spp.; Amostra 112: *Lactococcus garvieae*; Br: branco; M: marcador de 100pb.

5.5.2 Genes que conferem resistência à vancomicina

Os quatro isolados de alimentos que apresentaram resistência intermediária à vancomicina foram submetidos à PCR para detecção dos genes *vanA*, *vanB*, *vanC1* e *vanC2*. Estes genes não foram detectados.

Em outros estudos realizados no país, variantes de *van* foram detectados em *Enterococcus* isolados de alimentos. *E. faecalis* e *E. faecium* isolados de queijos no Sul do país apresentaram *vanA* (FURLANETO-MAIA et al., 2014). O gene *vanA* também foi encontrado em *E. faecalis* e *E. faecium* provenientes de carne de frango adquirida em supermercados de quatro estados localizados no Sudeste e Sul do Brasil (SACRAMENTO et al., 2016). Guerrero-Ramos e colaboradores (2016) detectaram *vanA* em *Enterococcus* isolados de carnes. Yilmaz e colaboradores (2016) também detectaram *vanA* em *Enterococcus* isolados de carne de frango.

5.5.3 Genes que conferem alto nível de resistência à estreptomicina

Nesse estudo, alto nível de resistência à estreptomicina foi detectada em *Enterococcus* spp. isolados de carnes bovina, suína, frango e queijo. O gene *ant6-Ia* foi detectado em 94,5% (17/18) dos isolados resistentes. No Brasil, esse gene foi encontrado em *Enterococcus* isolados de carcaças de frango por CAMPOS e colaboradores (2013). Hidano e colaboradores (2015) também detectaram *ant6-Ia* em *Enterococcus* spp. isolados de carne de frango no Japão.

Dezoito isolados de origem clínica, resistentes estreptomicina, apresentaram o gene *ant6-Ia* (12 *E. faecalis* e 5 *E. faecium*). Resultado semelhante foi observado por Niu e colaboradores (2016), que detectaram o gene *ant6-Ia* em *Enterococcus* spp. de origem clínica.

5.5.4 Genes que conferem alto nível de resistência à gentamicina

Um isolado de carne de frango e um de queijo apresentaram alto nível de resistência à gentamicina. O gene *acc(6')-Ie/aph(2'')-Ia* que codifica uma enzima bifuncional que confere resistência aos aminoglicosídeos, exceto à estreptomicina (ARIAS; MURRAY, 2012) foi detectado na cepa isolada de carne de frango.

O gene *acc(6')-Ie/aph(2'')-Ia* também foi detectado em cepas de *Enterococcus* spp. isoladas de carnes de animais selvagens (GUERRERO-RAMOS et al., 2016). Hidano e

colaboradores (2015) também detectaram o gene *acc(6')-Ie/aph(2'')-Ia* em *Enterococcus* spp. isolados de carne de frango.

Quatro cepas de *E. faecalis* e uma cepa de *E. faecium* de origem clínica, também apresentaram alto nível de resistência à gentamicina, o gene *acc(6')-Ie/aph(2'')-Ia* foi detectado em 4 dessas cepas. Outros estudos com *Enterococcus* spp. de origem clínica também tem detectado o gene *acc(6')-Ie/aph(2'')-Ia* (NIU et al., 2016; LI et al., 2015).

5.5.5 Genes que conferem resistência à fosfomicina

O gene que confere resistência à fosfomicina em bactérias Gram-positivas é o *fosB* (CHEN et al., 2014; QU et al., 2014). Os *Enterococcus* spp. de origem alimentar que apresentaram resistência à fosfomicina foram submetidos à PCR para detecção do gene *fosB*, no entanto, esse gene não foi detectado.

Todas as cepas clínicas também foram submetidas à PCR para detecção do gene *fosB*, porém, o gene também não foi detectado. Nessas cepas não foram realizados os testes de disco difusão, no entanto, realizou-se a PCR com o intuito de pesquisar a presença desse gene, uma vez que a fosfomicina pode ser utilizado para o tratamento de infecção do trato urinário e apresenta boa atividade contra os *Enterococcus* (HEINTZ et al., 2010).

5.6 Perfil de virulência entre *Enterococcus* spp. isolados de alimentos e de origem clínica

5.6.1 Genes de virulência em isolados de alimentos e de origem clínica

Entre os 102 *Enterococcus* spp. isolados de alimentos, 48% apresentaram o gene *efaA*; 42% *gelE*; 37,5% *ace*; 15% *as*; 13% *esp* e 11% *cyl*. Entre os 46 isolados clínicos 61% apresentaram o gene *ace*; 56,5% *efaA*, 43,5% *gelE*; 11% *cyl*; 11% *esp*, e 6,5% *as*. O gene *hyl* não foi detectado entre os isolados clínicos e de alimentos (Figura 10).

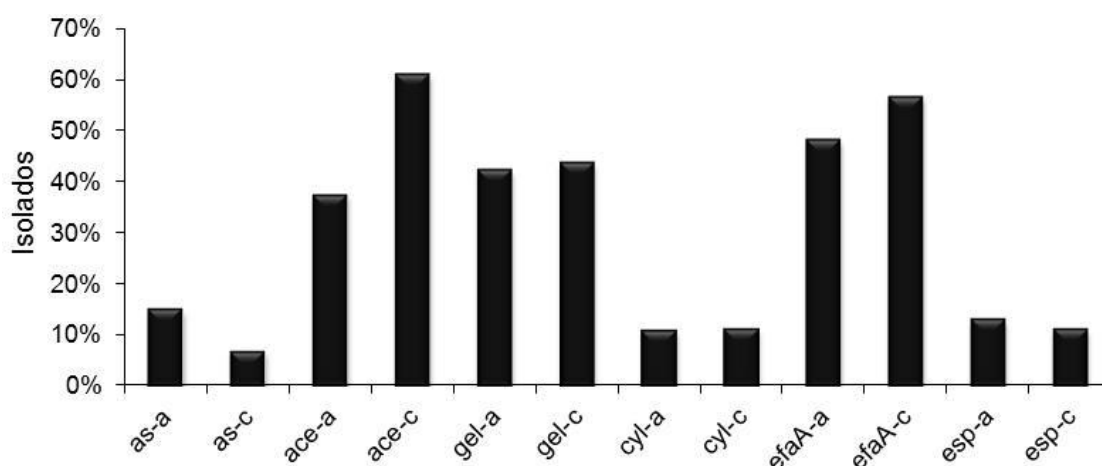


Figura10 - Porcentagem de genes de virulência em *Enterococcus* spp. isolados de alimentos (a) e clínicos (c). *as*: substância de agregação; *ace*: adesina de colágeno; *gelE*: gelatinase; *cyl*: citolisina; *efaA*: antígeno A; *esp*: proteína de superfície de *Enterococcus*.

A frequência da ocorrência dos genes *as*, *gelE*, *cylA*, *efaA*, *esp* e *hyl* é significativamente igual entre os isolados clínicos e de alimentos, de acordo com o teste de Fisher ($p > 0,05$) (Tabela 5). Apenas a frequência da ocorrência do gene *ace* entre os isolados clínicos é significativamente maior ($p < 0,01$).

Tabela 5 - Distribuição de fatores de virulência em *Enterococcus* spp. de origem clínica e de alimentos

Amostra	Resultado	<i>as</i>	<i>ace</i>	<i>gelE</i>	<i>cylA</i>	<i>efaA</i>	<i>esp</i>	<i>hyl</i>
Alimentos	+	15	38	43	11	49	13	0
	-	87	64	59	91	53	89	102
Clínicos	+	3	28	20	5	26	5	0
	-	43	18	26	41	20	41	46
<i>p-value</i> *		0,0858	0,0041	0,1406	0,2235	0,0900	0,2076	1,0000

* Resultado segundo teste de Fisher. *as*: substância de agregação; *ace*: adesina de colágeno; *gelE*: gelatinase; *cylA*: citolisina; *efaA*: antígeno A; *esp*: proteína de superfície de *Enterococcus*.

No Brasil, *Enterococcus* isolados de carnes, leite e queijos apresentando os genes de virulência, *as*, *ace*, *esp*, *gelE* e *cylA*, foram descritos por Medeiros e colaboradores (2014). Os genes *as*, *ace*, *esp*, *gelE*, *efaA* e *cylA* foram encontrados em *Enterococcus* spp. isolados de carnes, leite e queijos por Gomes e colaboradores (2008).

Na Itália, os genes *as*, *gelE*, *esp*, *efaA*, *ace* foram detectados em *Enterococcus* spp. isolados de diferentes tipos de carnes, queijos e leite (ABOUELNAGA et al., 2016). No

Canadá, Jahan e Holley (2014) também detectaram os genes *as*, *cylA*, *ace*, *efaA*, *esp* e *gelE* em *Enterococcus* spp. isolados de carnes cruas e fermentadas.

Foi interessante observar que vários genes de virulência foram encontrados tanto em *Enterococcus* spp. isolados de pacientes quanto de alimentos. Isso sugere que os *Enterococcus* spp. isolados de alimentos podem ser virulentos, diferindo do perfil encontrado na Europa, em que *E. faecium* isolados de pacientes com infecções apresentavam maior diversidade de fatores de virulência e resistência aos antimicrobianos que os isolados de queijos e de fezes de animais (MANNU et al., 2003).

Os fatores de virulência aumentam a habilidade de *Enterococcus* spp. em promover a colonização e infecção (ARIAS; MURRAY, 2012). A gelatinase, cujo gene codificante (*gelE*) foi encontrado neste estudo em 43,5% e 42% dos *Enterococcus* spp. clínicos e de alimentos, respectivamente, é uma protease que hidrolisa o colágeno, a hemoglobina e outros peptídeos. Estudos em modelo animal têm demonstrado sua contribuição durante o processo de endocardite por *E. faecalis* (THURLOW et al., 2010).

A proteína Esp, que está associada à formação de biofilmes por *E. faecalis* (TOLEDO-ARANA et al., 2001) é normalmente detectada com maior frequência em isolados clínicos que comensais (UPADHYAYA et al., 2010). Nesse estudo, o gene *esp* foi detectado com a mesma frequência entre os isolados de alimentos e clínicos. É importante ressaltar que essa proteína promove o aumento da colonização e persistência de *E. faecalis* na bexiga urinária durante infecções experimentais do trato urinário (SHANKAR et al., 2001).

O gene *as*, que codifica a substância de agregação As, relacionada à promoção do contato eficiente entre os *Enterococcus* durante a conjugação também foi detectado com a mesma frequência entre os isolados de alimentos e clínicos. A substância de agregação As favorece a adesão de *E. faecalis* às células do tubo neural renal e a internalização de *E. faecalis* em células intestinais humanas (CHUANG-SMITH et al., 2010).

O gene *cylA*, que codifica a citolisina, uma proteína extracelular que lisa hemácias humanas, tem relação direta com a virulência dos *Enterococcus* spp. (SINGH et al., 1998), foi detectado na mesma porcentagem entre os isolados clínicos e de alimentos. Um estudo semelhante realizado no Sul do Brasil verificou diferenças na distribuição dos fatores de virulência em *E. faecalis* isolado a partir de amostras clínicas e de alimentos, o gene *cyl* foi detectado em 54,4% nas cepas clínicas e em 7,2% nas cepas de alimentos (MEDEIROS et al., 2014).

Somente o gene *ace* foi mais prevalentes entre os isolados clínicos. Medeiros e colaboradores (2014) encontraram esse gene com frequência semelhante entre *Enterococcus*

de origem clínica e de alimentos. O gene *ace* codifica a proteína adesina de colágeno de *E. faecalis*, envolvida com a adesão. Esta proteína tem um papel importante no processo da endocardite (SINGH et al., 2010). Outra adesina de *E. faecalis* é codificada pelo gene *efaA*, esse antígeno A também contribui em processos infecciosos como o da endocardite (KAYAOGU; ORSTAVIK, 2004). Nesse estudo, *efaA* foi detectada em 48% e 56,5% nos isolados de alimentos e clínicos, respectivamente.

O gene *hyl*, que codifica a hialuronidase, uma proteína capaz de degradar o ácido hialurônico, não foi detectado. Esse resultado está de acordo com outros estudos que também não detectaram esse gene entre *Enterococcus* isolados de alimentos de origem animal (HAMMAD et al., 2014; GOMES et al., 2008). Um estudo que analisou 119 *Enterococcus* isolados de carnes, o gene *hyl* foi detectado, porém, em apenas um isolado de *E. faecium* (KLIBI et al., 2014).

Entre os 46 isolados clínicos, o *hyl* também não foi detectado. Entretanto, de acordo com Laverde-Gomes e colaboradores (2011), este gene se localiza em um grande plasmídeo, amplamente distribuído entre isolados clínicos de *E. faecium*. Em um estudo prévio, realizado no estado de São Paulo com 23 *E. faecium*, todos apresentaram esse gene (PALLAZO et al., 2011).

5.7 Sequenciamento de genes

Os *amplicons* dos genes *as* (34), *gelE* (12), *esp* (52), *cyl* (33), *efaA* (12), *ace* (12), *tetK* (239), *tetL* (196), *tetM* (23), *tetC* (94; 95; 96; 239; 242), *acc(6')-Ie/aph(2'')-Ia* (230), *ant6-Ia* (22; 226; IC15), foram sequenciados e as sequências comparadas às existentes no *GenBank* para confirmação desses genes. Essas amostras foram usadas como controle positivo durante as reações de PCR.

5.8 Identificação das espécies de *Enterococcus*

Nesse estudo 62 *Enterococcus* spp. isoladas de carnes bovina, suína e frango e de queijo Minas Frescal foram identificados ao nível de espécie. A seleção dos isolados a serem submetidos aos testes para a identificação foi realizada com base no perfil de resistência aos antimicrobianos e de virulência.

Ao todo, 37 isolados foram identificadas como *E. faecalis*, 14 como *E. faecium* e 11 como *E. durans*. Os *E. faecalis* são originados de amostras de queijo (16), de carne bovina

(9), de carne de frango (7) e de carne suína (5). Com relação a *E. faecium*, foram isolados de queijo (10), de carne bovina (3), de carne de frango (1). Todos os *E. durans* foram isolados de queijo.

A maior frequência de *E. faecalis* em alimentos foi descrita em outros estudos realizados no Brasil. Em carcaças de frango foi verificada maior prevalência de *E. faecalis* (42%) em comparação com *E. faecium* (2%) (CAMPOS et al., 2013). Riboldi e colaboradores (2009) relataram a presença de 48,21% de *E. faecalis*, 41% de *E. faecium* e 10,7% de *Enterococcus* spp. em diversos alimentos na região Sul do Brasil. Em 535 amostras de carne de frango adquiridas em 5 regiões brasileiras, predominou *E. faecalis* (61,4%), sendo *E. faecium* presente em 2,2% das amostras (SACRAMENTO et al., 2016). Na França, *E. faecalis* também foi mais prevalente entre isolados de queijo (81%), seguidos de *E. faecium* (13%) e *E. durans* (6%) (JAMET et al., 2012). Um estudo realizado no Canadá revelou que entre isolados de carne de frango, suína e bovina, *E. faecalis* também foi predominante (ASLAM et al., 2012). Em amostras de carne frescas, leite e queijos, *E. faecalis* também foi prevalente, seguido pelas espécies de *E. faecium* e *E. casseliflavus* (ABOUELNAGA et al., 2016).

Por outro lado, Furlaneto-Maia e colaboradores (2014), detectaram maior prevalência de *E. faecium* (58,33%), seguido de *E. faecalis* (27,77%) entre isolados de queijo. *E. faecium* (30,8%) também foi prevalente entre isolados de queijo, seguido de *E. faecalis* (10,8%) no Egito (HAMMAD et al., 2015). Entre isolados de carnes (55) também foi verificado maior prevalência de *E. faecium* (45), em comparação com *E. faecalis* (7) e *E. durans* (3) (GUERRERO-RAMOS et al., 2016).

5.9 Distribuição dos genes de virulência em *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* isolados de alimentos e de pacientes

Entre os isolados de alimentos, foi observada a presença genes que codificam fatores de virulência em 84% (31/37) das cepas de *E. faecalis*. Em 5 cepas foram identificados pelo menos 2 fatores, em 11 cepas 3 fatores, em 6 cepas 4 fatores e em 8 cepas 5 fatores (Tabela 6).

Tabela 6 - Ocorrência de fatores de virulência em *E. faecalis* isolados de carnes e queijos

Isolado	Origem	Genes de virulência
12	Queijo 1	<i>as, ace, esp, efaA, gelE</i>
18	Queijo 1	<i>as, ace, esp, efaA, gelE</i>
20	Queijo 1	<i>as, ace, esp, efaA, gelE</i>
22	Queijo 1	<i>ace, cylA, efaA, gelE</i>
23	Queijo 1	<i>ace, cylA, efaA, gelE</i>
24	Queijo 1	<i>ace, cylA, efaA, gelE</i>
25	Queijo 1	<i>ace, cylA, efaA, gelE</i>
33	Queijo 1	<i>as, ace, cylA, efaA, gelE</i>
52	Queijo 2	<i>as, ace, esp, efaA, gelE</i>
53	Queijo 2	<i>as, ace, esp, efaA, gelE</i>
54	Queijo 2	<i>as, ace, esp, efaA, gelE</i>
55	Queijo 2	<i>ace, esp, efaA, gelE</i>
56	Queijo 2	<i>ace, esp, efaA</i>
57	Queijo 2	<i>esp, efaA, gelE</i>
58	Queijo 2	<i>esp, efaA, gelE</i>
59	Queijo 2	<i>as, ace, esp, efaA, gelE</i>
72	Frango 1	<i>efaA, gelE</i>
95	Suína 1	<i>ace, efaA</i>
96	Suína 1	<i>ace, efaA</i>
160	Bovina 2	<i>as, ace, efaA, gelE</i>
164	Bovina 2	<i>ace, cylA, esp, efaA, gelE</i>
195	Frango 2	<i>ace, efaA, gelE</i>
196	Frango 2	<i>ace, efaA, gelE</i>
197	Frango 2	<i>ace, efaA, gelE</i>
221	Frango 5	<i>efaA, gelE</i>
222	Bovina 6	<i>ace, efaA, gelE</i>
224	Bovina 6	<i>ace, efaA, gelE</i>
239	Frango 7	<i>efaA, gelE</i>
265	Frango 17	<i>ace, efaA, gelE</i>
270	Suína 10	<i>efaA</i>
281	Bovina 15	<i>ace, efaA, gelE</i>

as: substância de agregação; *ace*: adesina de colágeno; *gelE*: gelatinase; *cylA*: citolisina; *efaA*: antígeno A; *esp*: proteína de superfície de *Enterococcus*.

Com relação aos *E. faecalis* de origem clínica, 100% (24/24) apresentaram genes de virulência. Em uma cepa foram identificados pelo menos 2 fatores, em 17 cepas 3 fatores, em 5 cepas 4 fatores e em 1 cepa 5 fatores (Tabela 7).

Tabela 7 - Ocorrência de fatores de virulência em *E. faecalis* isolados de urina e sangue

Isolado	Origem	Genes de virulência
IC 2	Urina	<i>as, ace, efaA, gelE</i>
IC 3	Urina	<i>cylA, efaA</i>
IC 5	Urina	<i>ace, efaA, gelE</i>
IC 15	Urina	<i>ace, efaA, gelE</i>
IC 19	Urina	<i>ace, cylA, efaA, gelE</i>
IC 21	Urina	<i>ace, efaA, gelE</i>
IC 22	Urina	<i>ace, efaA, gelE</i>
IC 26	Sangue	<i>ace, efaA, gelE</i>
IC 33	Urina	<i>ace, efaA, gelE</i>
IC 37	Urina	<i>ace, efaA, gelE</i>
IC 40	Urina	<i>as, ace, efaA</i>
IC 43	Urina	<i>ace, efaA, gelE</i>
IC 45	Urina	<i>ace, efaA, gelE</i>
IC 46	Urina	<i>ace, efaA, gelE</i>
IC 47	Urina	<i>ace, cyl, efaA, esp, gelE</i>
IC 48	Urina	<i>ace, efaA, esp</i>
IC 52	Urina	<i>ace, efaA, esp, gelE</i>
IC 53	Urina	<i>ace, efaA, esp, gelE</i>
IC 55	Urina	<i>ace, efaA, esp</i>
IC 58	Urina	<i>ace, efaA, gelE</i>
IC 65	Urina	<i>as, ace, cyl, efaA</i>
IC 67	Urina	<i>ace, efaA, gelE</i>
IC 68	Urina	<i>ace, efaA, gelE</i>
IC 70	Urina	<i>ace, efaA, gelE</i>

IC: isolado clínico; *as*: substância de agregação; *ace*: adesina de colágeno; *gelE*: gelatinase; *cylA*: citolisina; *efaA*: antígeno A; *esp*: proteína de superfície de *Enterococcus*.

De acordo com o teste de Fisher (Tabela 8), a distribuição dos genes *as*, *gelE*, *cylA*, *esp* e *hyl* são significativamente iguais ($p>0,05$) entre as cepas de alimentos e clínicas. Por outro lado, os genes *ace* ($p<0,01$) e *efaA* ($p<0,05$) foram mais prevalentes em cepas clínicas.

A distribuição de fatores de virulência em *E. faecalis* isolados a partir de amostras clínicas e de alimentos também foi comparada no Sul do Brasil. Nesse estudo observou-se que as isolados clínicos apresentaram mais fatores de virulência quando comparados com os isolados de alimentos, sendo os genes *as*, *esp* e *cyl* mais prevalentes nas cepas clínicas e o *ace* e *gelE* foram semelhantes (MEDEIROS et al., 2014).

Tabela 8 - Distribuição de fatores de virulência em *E. faecalis* de origem clínica e de alimentos

Amostra	Resultado	<i>as</i>	<i>ace</i>	<i>gelE</i>	<i>cylA</i>	<i>efaA</i>	<i>esp</i>	<i>hyl</i>
Alimentos	+	9	25	27	5	31	11	0
	-	28	12	10	32	6	26	37
Clínicos	+	3	23	19	4	24	5	0
	-	21	1	5	20	0	19	24
<i>p-value</i> *		0,1445	0,0068	0,2099	0,2671	0,0419	0,1792	1,0000

* Resultado segundo teste de Fisher. *as*: substância de agregação; *ace*: adesina de colágeno; *gelE*: gelatinase; *cylA*: citolisina; *efaA*: antígeno A; *esp*: proteína de superfície de *Enterococcus*; *hyl*: hialuronidade.

Com relação a *E. faecium*, observou-se uma menor ocorrência de genes de virulência, quando comparadas com as de *E. faecalis*. Entre os isolados de alimentos, somente a cepa 38 apresentou os genes *gelE* e *cylA*. Entre os isolados clínicos, 27% (6/22) apresentaram genes de virulência, sendo que 4 cepas apresentaram um gene e 2 cepas três genes.

De acordo com Vankerckhoven e colaboradores (2004), *E. faecalis* são considerados mais virulentos e com maior capacidade de adquirir fatores de virulência do que *E. faecium*. A maior prevalência de genes de virulência em *E. faecalis* explica a maior frequência de infecções nosocomiais causadas por esta espécie, quando comparado ao *E. faecium*. No Brasil *E. faecalis* são responsáveis por 80-90% das infecções nosocomiais, enquanto *E. faecium* é associado a 10-20% (ANVISA, 2007). Com relação aos alimentos, GUERRERO-RAMOS e colaboradores (2016) encontraram fatores de virulência em 71,4% em *E. faecalis* e 20% em *E. faecium* isolados de carnes. Aslam e colaboradores (2012) também encontraram fatores de virulência em maior frequência em *E. faecalis* isolados de carnes de porco, boi e frango.

A presença de cepas virulentas em alimentos pode ser considerada como risco à saúde dos consumidores, pois esses fatores de virulência potencializam os processos infecciosos causados por *Enterococcus* spp. (SOARES et al., 2014; SHARIFI et al., 2013). É importante ressaltar que os *E. faecalis* podem atuar como reservatório de genes de virulência e ser transmitidos aos seres humanos por meio do consumo de carne mal cozida ou por contaminação cruzada (JAHAN et al., 2015).

5.10 Perfil de resistência aos antimicrobianos em *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* isolados de alimentos

Entre as 37 cepas de *E. faecalis* foi observado que 27 (73%) apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano (Tabela 9). Dez (37%) apresentaram resistência a um

antimicrobiano. Cinco (18,5%) a dois antimicrobianos, oito (29,5%) a 3 antimicrobianos, dois (7,5%) a 4 antimicrobianos e dois (7,5%) a cinco antimicrobianos. Doze cepas são multirresistentes, pois apresentam resistência a três ou mais antimicrobianos de classes diferentes (MAGIORAKOS et al., 2011).

Tabela 9 - Ocorrência de resistência aos antimicrobianos em 37 *E. faecalis* isolados de carnes e queijos

Isolado	Origem	Antimicrobianos
20	Queijo 1	NOR
22	Queijo 1	EST, TE, ERI
23	Queijo 1	EST, TE, ERI
24	Queijo 1	EST, TE, ERI
25	Queijo 1	EST, TE, ERI
33	Queijo 1	EST, TE
53	Queijo 2	LEV
58	Queijo 2	CN, LEV
59	Queijo 2	TE
72	Frango 1	C, TE, LEV
95	Suína 1	TE
96	Suína 1	TE
132	Suína 2	TE
160	Bovina 2	P
187	Suína 3	FOS, EST, TE
195	Frango 2	CIP, NOR, TE, ERI
196	Frango 2	TE, ERI
197	Frango 2	EST, TE, ERI
215	Bovina 3	CIP, FOS, TE
221	Frango 5	TE, ERI
222	Bovina 6	C, NOR, EST, TE, ERI
224	Bovina 6	C, FOS, EST, TE, ERI
239	Frango 7	C, EST, TE, ERI
242	Bovina 12	FOS, TE
255	Bovina 13	TE
265	Frango 17	LZD
281	Bovina 15	FOS

C: Cloranfenicol; CIP: Ciprofloxacina; FOS: Fosfomicina; LZD: Linezolida; NOR: Norfloxacin; EST: Estreptomicina; TE: Tetraciclina; P: Penicilina; LEV: Levofloxacina; CN: Gentamicina; ERI: Eritromicina.

Como pode ser observado na Tabela 10, os *E. faecium* apresentaram menos resistência à antimicrobianos quando comparados aos *E. faecalis*. Entre as 14 cepas de *E. faecium* foi observado que 7 (50%) apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano (Tabela 9). Cinco cepas apresentaram resistência a um antimicrobiano, uma cepa a dois antimicrobianos e uma cepa isolada de carne bovina apresentou resistência a 4 antimicrobianos, sendo considerada como multirresistente.

A ocorrência de *E. faecium* e *E. faecalis* multirresistentes em alimentos é preocupante, pois podem ser transmitidas ao homem e posteriormente causar infecções de difícil tratamento (BORTOLAIA et al., 2016). Esse fato foi constatado por um estudo realizado por Poulsen e colaboradores (2012), eles compararam cepas de *E. faecalis* isolados de pacientes com infecção de urina com *E. faecalis* isolados de aves que tinham contato com esses pacientes, foi observado clones idênticos pela técnica de MLST ou cepas relacionadas pelo PFGE. Além disso, eles verificaram similar padrão de resistência aos antimicrobianos e genes de virulência, indicando um potencial zoonótico dessas cepas.

Tabela 10 - Ocorrência de resistência aos antimicrobianos em 14 *E. faecium* isolados de carnes e queijos

Isolado	Origem	Antimicrobianos
13	Queijo 1	
16	Queijo 1	
17	Queijo 1	
27	Queijo 1	
38	Queijo 1	LZD
39	Queijo 1	
51	Queijo 2	Q/D, LEV
120	Queijo 3	
121	Queijo 3	
122	Queijo 3	Q/D
207	Frango 4	TE
211	Bovina 3	CIP, NOR, MOX, ERI
212	Bovina 3	NOR
213	Bovina 3	P

CIP: Ciprofloxacina; LZD: Linezolida; NOR: Norfloxacin; TE: Tetraciclina; P: Penicilina; LEV: Levofloxacina; Q/D: Quinupristina-Dalfopristina; ERI: Eritromicina; MOX: Moxifloxacina.

5.11 Testes fenotípicos - produção de gelatinase e hemolisina

5.11.1 Detecção da produção de gelatinase

O teste fenotípico para a confirmação da expressão de *gelE* foi realizado em todos os 22 isolados provenientes de alimentos e 20 de origem clínica que apresentaram o gene. As amostras que apresentaram zonas claras ao redor dos inóculos foram consideradas positivas para a produção da gelatinase (Figura 11).

O fenótipo positivo foi observado em 63,5% (14/22) dos isolados de alimentos e 55% (11/20) dos isolados de origem clínica. Resultado semelhante foi apresentado por Medeiros e

colaboradores (2014), que observaram que a expressão da gelatinase não correlacionou com a presença do gene *gelE* em 54,5% e 13,9% das cepas clínicas e de alimentos, respectivamente. Fernandes et al. (2015) também não observaram associação entre a produção de gelatinase e a presença do gene *gelE* em cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* isolados de uma linha de produção de ricota, sendo que nesse estudo apenas 9,3% (10/107) dos isolados foram capazes de hidrolisar a gelatina. A presença do gene *gelE* e a falta de atividade da gelatinase em *Enterococcus* spp. têm sido associados com a manipulação das cepas em laboratório, que acarreta na ausência da expressão do gene ou baixo nível de expressão, mutação genética e ou ausência de subunidades necessárias para a atividade do gene *gelE* (LOPES et al., 2006; HAN et al., 2011).

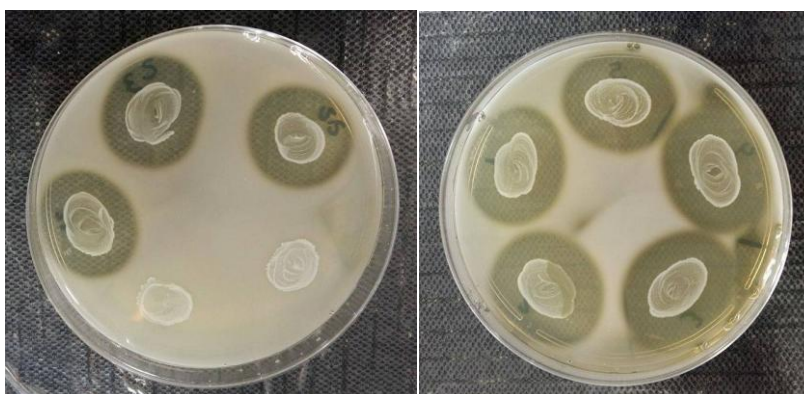


Figura 11 - Ágar Mueller-Hinton suplementado com 3% de gelatina, demonstrando resultado positivo (presença de zonas claras) e negativo (ausência de zonas claras).

5.11.2 Detecção da produção de citolisina

Os isolados que apresentaram o gene *cylA* (11 de alimentos e 9 de origem clínica), foram submetidos ao teste para verificação da atividade de citolisina. Resultado positivo foi observado em 45,5% (5/11) e em 44,5% (4/9) dos isolados de alimentos e clínicos, respectivamente. Sendo assim, não houve associação entre a presença do gene com a atividade da citolisina em todos os isolados. Resultados semelhantes têm sido observados em outros estudos. Medeiros e colaboradores (2014) também não detectaram essa associação entre a presença do gene e a atividade da enzima em cepas de *Enterococcus* de origem alimentar e clínica. Entre cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* isolados de uma linha de produção de ricota e que apresentaram o gene *cyl*, também não foi observado a atividade da citolisina (FERNANDES et al., 2015). Essa falta de associação entre o fenótipo/genótipo pode ser

decorrente da perda do operon *cyl* ou devido à falta de expressão dos genes *cyl* no momento do teste (GASPAR et al, 2009;. UPADHYAYA et al., 2009).

5.12 Tipagem molecular

Neste estudo, a tipagem molecular de *E. faecalis* e *E. faecium* por PFGE foi aplicada para determinar a relação genética entre cepas isolados de amostras de alimentos e de amostras clínicas humanas.

5.12.1 Relação genética entre *E. faecalis* isolados de amostras de alimentos e de amostras clínicas humanas

A Figura 12 mostra o dendrograma gerado após a comparação dos perfis de restrição de 49 *E. faecalis*, sendo 26 isolados de alimentos e 23 de espécimes clínicos. Observa-se a formação de 5 *clusters* compostos por cepas com similaridade $\geq 90\%$. Os *clusters* 1, 2 e 5 são formados somente por cepas com 100% de similaridade nos perfis de PFGE, provenientes da mesma amostra de alimento (queijo 2, carne bovina 6 e carne suína 1, respectivamente). O *cluster* 3 é formado por duas cepas idênticas e uma cepa com 93.3% de similaridade, todas isoladas da amostra de queijo 1. O *cluster* 4 contém duas cepas isoladas de urina, que apresentaram 90% de similaridade. Entretanto, a maioria das cepas (37), apresentaram similaridade $< 90\%$ e foram alocadas isoladamente.

A identidade no perfil de PFGE das cepas dos *clusters* 1, 2 e 5 indica o isolamento de cepas do mesmo clone. Entretanto, foi interessante observar variações na diversidade de genes de resistência e virulência, além de diferentes fenótipos de suscetibilidade aos antimicrobianos (Tabela 11). Com relação ao *cluster* 1, a cepa 55 é sensível aos antimicrobianos testados, a 58 apresenta resistência à gentamicina e à levofloxacina, e a 59 resistência à tetraciclina. Com relação aos genes de virulência, a cepa 58 é carreadora de *gelE*, *efaA* e *esp*, a 55 de *ace*, *gelE*, *efaA* e *esp*, a 59 de *as*, *ace*, *gelE*, *efaA* e *esp*. Somente na cepa 59 foi detectado um gene de resistência a tetraciclina, o *tetK*. O *cluster* 2 é formado pelas cepas 222 e 224, com perfil de PFGE idêntico e isoladas da amostra carne bovina 6. A cepa 222 é resistente ao cloranfenicol, norfloxacina, estreptomicina, tetraciclina e eritromicina, a cepa 224 apresenta perfil semelhante, exceto pela sensibilidade a norfloxacina. A cepa 222 apresenta 3 genes de resistência, *ant* (6)-Ia, o *tetL* e o *tetM*, no entanto, na 224 não foram detectados genes de resistência. Ambas apresentam os mesmos genes de virulência, *ace*, *gelE*

e *efaA*. Apenas as cepas do *cluster* 5 (95 e 96) apresentam resistência à tetraciclina, os mesmos genes de resistência (*tetC*, *tetK*, *tetL* e *tetM*) e os mesmos genes de virulência (*ace* e o *efaA*). O *cluster* 3 é formado por duas cepas idênticas, 22 e 24, e a cepa 23, com 93.3% de similaridade. As três cepas apresentam resistência à estreptomicina, tetraciclina e eritromicina e possuem 4 genes de virulência (*as*, *ace*, *gelE* e *efaA*). Com relação aos genes de resistência, a cepa 22 apresenta *tetK* e *tetM*, a 23 apresenta o *ant* (6)-Ia e o *tetM* e a 24 o *tetK*, *tetM* e o *ant* (6)-Ia.

Com relação às cepas de origem clínica, apenas IC46 e IC45, com 90% de similaridade, isoladas de urina, foram incluídas em um mesmo *cluster* (*cluster* 4). Entretanto, apesar de apresentarem os mesmos genes de virulência (*ace*, *efaA* e *gelE*), IC45 é resistente à estreptomicina e penicilina e apresenta o gene *ant* (6)-Ia, enquanto IC46 não apresentou resistência aos antimicrobianos testados nem genes de resistência. As demais cepas foram alocadas isoladamente.

Os resultados mostram que não há relação genética entre a maioria das cepas de *E. faecalis* isolados de diferentes alimentos. Além disso, as cepas isoladas de alimentos são geneticamente distintas das associadas a processos infecciosos no homem. Estes dados, apesar de obtidos após o estudo de um número reduzido de cepas, são diferentes dos apresentados por diversos estudos, que identificam reservatórios animais como fonte de infecções por *Enterococcus* em seres humanos (JARVIS; MARTONE, 1992; DONABEDIAN et al., 2003; LARSEN et al., 2010; FREITAS et al., 2011). Um estudo com isolados de 4 países europeus e nos Estados Unidos demonstrou que *E. faecalis* isolados de porcos em Portugal apresentaram perfil de PFGE idênticos aos de cepas multiresistentes isoladas em hospitais na Espanha, Itália e Portugal (FREITAS et al., 2011). Na Dinamarca, *E. faecalis* com alto nível de resistência a gentamicina, com perfis idênticos de PFGE foram isolados de porcos e de humanos com endocardite (LARSEN et al., 2010). Perfis de PFGE idênticos e estreitamente relacionados foram demonstrados pelos isolados de humanos e de carne de porco e carne de frango nos Estados Unidos (DONABEDIAN et al., 2003).

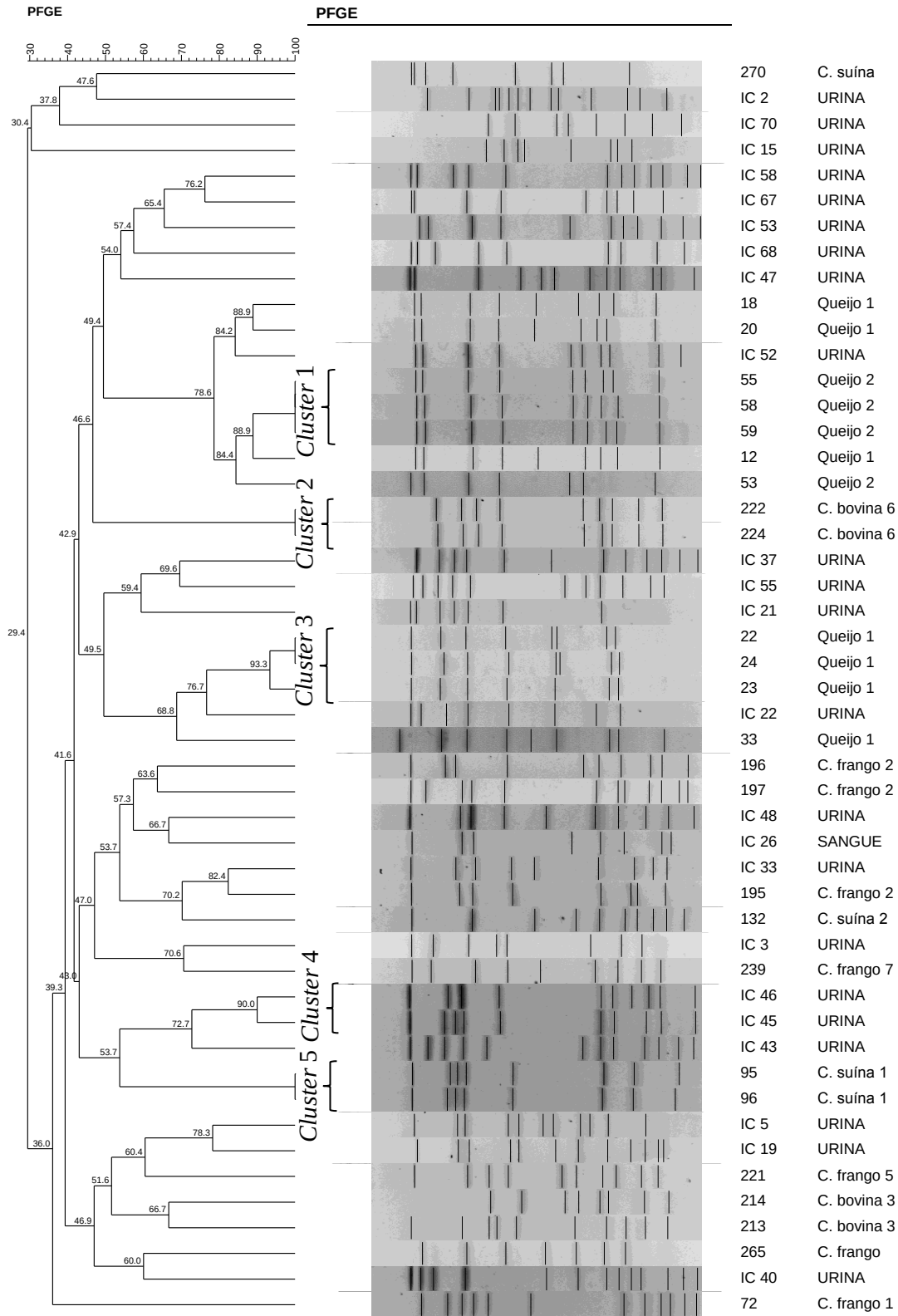


Figura 12 - Dendrograma baseado em UPGMA, gerado a partir dos perfis de restrição de DNA de *E. faecalis* isolados de alimentos e amostras clínicas, obtidos por eletroforese em campo pulsado (PFGE).

Tabela 11 - Ocorrência de fenótipos de resistência e genes de resistência e de virulência em *E. faecalis*

Isolado	Origem	Fenótipos de resistência	Genes de resistência	Genes de virulência
270	Suíno 10			<i>efaA</i>
IC 2	Urina	CIP, EST, CN, P	<i>ant (6) - Ia</i>	<i>as, ace, efaA, gelE</i>
IC 70	Urina	CIP, EST, CN, P	<i>ant (6) - Ia aph(2'')Ia/aac(6')-Ie</i>	<i>ace, efaA, gelE</i>
IC 15	Urina	CIP, EST, CN	<i>ant (6)- Ia,aph(2'')Ia/aac(6')-Ie</i>	<i>ace, efaA, gelE</i>
IC 58	Urina	CIP		<i>ace, efaA, gelE</i>
IC 67	Urina	CIP, EST, CN, P	<i>ant (6)- Ia, aph(2'')Ia/aac(6')-Ie</i>	<i>ace, efaA, gelE</i>
IC 53	Urina			<i>ace, efaA, esp, gelE</i>
IC 68	Urina	CIP, EST	<i>ant (6) - Ia</i>	<i>ace, efaA, gelE</i>
IC 47	Urina	CIP, EST	<i>ant (6) - Ia</i>	<i>ace, cyl, efaA, esp, gelE</i>
18	Queijo 1			<i>as ace gelE efaA esp</i>
20	Queijo 1	NOR		<i>as ace gelE efaA esp</i>
IC 52	Urina			<i>ace, efaA, esp, gelE</i>
55	Queijo 2			<i>ace, gelE, efaA, esp</i>
58	Queijo 2	CN 120, LEV		<i>gelE, efaA, esp</i>
59	Queijo 2	TE	<i>tetK</i>	<i>as, ace, gelE, efaA, esp</i>
12	Queijo 1	EST, TE	<i>tetK</i>	<i>as, ace, gelE, efaA, esp</i>
53	Queijo 2			<i>as, ace, gelE, efaA, esp</i>
222	Bovina 6	C, NOR, EST, TE ERI	<i>ant (6)-Ia, tet L, tetM</i>	<i>ace, gelE, efaA</i>
224	Bovina 6	C, EST, TE, ERI		<i>ace, gelE, efaA</i>
IC 37	Urina	EST	<i>ant (6) - Ia</i>	<i>ace, efaA, gelE</i>
IC 55	Urina			<i>ace, efaA, esp</i>
IC 21	Urina	EST	<i>ant (6) - Ia</i>	<i>ace, efaA, gelE</i>
22	Queijo 1	EST, TE, ERI	<i>tetK, tetM</i>	<i>ace, gelE, cylA, efaA</i>
24	Queijo 1	EST, TE, ERI	<i>ant (6)-Ia, tetK, tetM</i>	<i>ace, gelE, cylA, efaA</i>
23	Queijo 1	EST, TE, ERI	<i>ant (6)-Ia, tetM</i>	<i>ace, gelE, cylA, efaA</i>
IC 22	Urina	EST	<i>ant (6) - Ia</i>	<i>ace, efaA, gelE</i>
33	Queijo 1	EST, TE		<i>as, ace, gelE, cylA, efaA</i>
196	Frango 2	TE, ERI	<i>tetL</i>	<i>ace, gelE, efaA</i>
197	Frango 2	EST, TE	<i>ant (6)-Ia, tetM</i>	<i>ace, gelE, efaA</i>
IC 48	Urina	CIP		<i>ace, efaA, esp</i>
IC 26	Sangue			<i>ace, efaA, gelE</i>
IC 33	Urina			<i>ace, efaA, gelE</i>
195	Frango 2	CIP, NOR, TE, ERY	<i>tetL</i>	<i>ace, gelE, efaA</i>
132	Suína 2	TE		
IC 3	Urina			<i>cylA, efaA</i>
239	Frango 7	C, EST, TE, ERI	<i>tetL, tetM</i>	<i>gelE, efaA</i>
IC 46	Urina			<i>ace, efaA, gelE</i>
IC 45	Urina	EST, P	<i>ant (6) - Ia</i>	<i>ace, efaA, gelE</i>
IC 43	Urina	EST		<i>ace, efaA, gelE</i>
95	Suína 1	TE	<i>tetC, tetK, tetL, tetM</i>	<i>ace, efaA</i>
96	Suína 1	TE	<i>tetC, tetK, tetL, tetM</i>	<i>ace, efaA</i>
IC 5	Urina	CIP, P, TEC, VAN		<i>ace, efaA, gelE</i>
IC 19	Urina	CIP, EST, P	<i>ant (6) - Ia</i>	<i>ace, cylA, efaA, gelE</i>
221	Frango 5	TE, ERI	<i>tetL</i>	<i>gelE, efaA</i>
214	Bovina 3			
213	Bovina 3	P		
265	Frango 13	LZD		<i>ace, gelE, efaA</i>
IC 40	Urina			<i>as, ace, efaA</i>
72	Frango 1	C, TE, LEV	<i>tetK, tetL, tetM</i>	<i>gelE, efaA</i>

IC: Isolado clínico; CIP: Ciprofloxacina; EST: Estreptomicina; LZD: Linezolida; NOR: Norfloxacina; TE: Tetraciclina; P: Penicilina; LEV: Levofloxacina; Q/D: Quinupristina-Dalfopristina; ERI: Eritromicina; MOX: Moxifloxacina; TEC: Teicoplanina; VAN: Vancomicina; *as*: Substância de agregação; *ace*: Adesina de colágeno; *gelE*: Gelatinase; *cylA*: Citolisina; *efaA*: Antígeno A; *esp*: Proteína de superfície de *Enterococcus*.

5.12.2 Relação genética entre *E. faecium* isolados de amostras de alimentos e de amostras clínicas humanas

A Figura 13 mostra o dendrograma gerado a partir dos perfis de restrição de *E. faecium* isolados de alimentos e amostras clínicas. Entre as 11 cepas isoladas de alimentos, 2 formaram o *cluster* 1 (121 e 122; isoladas da amostra de queijo 3) e 3 formaram o *cluster* 2 (17, 13 e 16; isoladas da amostra de queijo 1).

Entre as 21 cepas de origem clínica, 3 (IC56, IC64 e IC49) formaram o *cluster* 3 e 2 (IC30 e IC7) formaram o *cluster* 4. As demais cepas foram alocadas isoladamente. Dentro de cada um destes *clusters* a porcentagem de similaridade genética variou entre 94,1% (*cluster* 4) a 93,3% - 90,4% (*cluster* 3), e a cepa IC64 apresentou diferenças no fenótipo de resistência e genes de resistência e virulência não encontrados em IC56 e IC49 (Tabela 12).

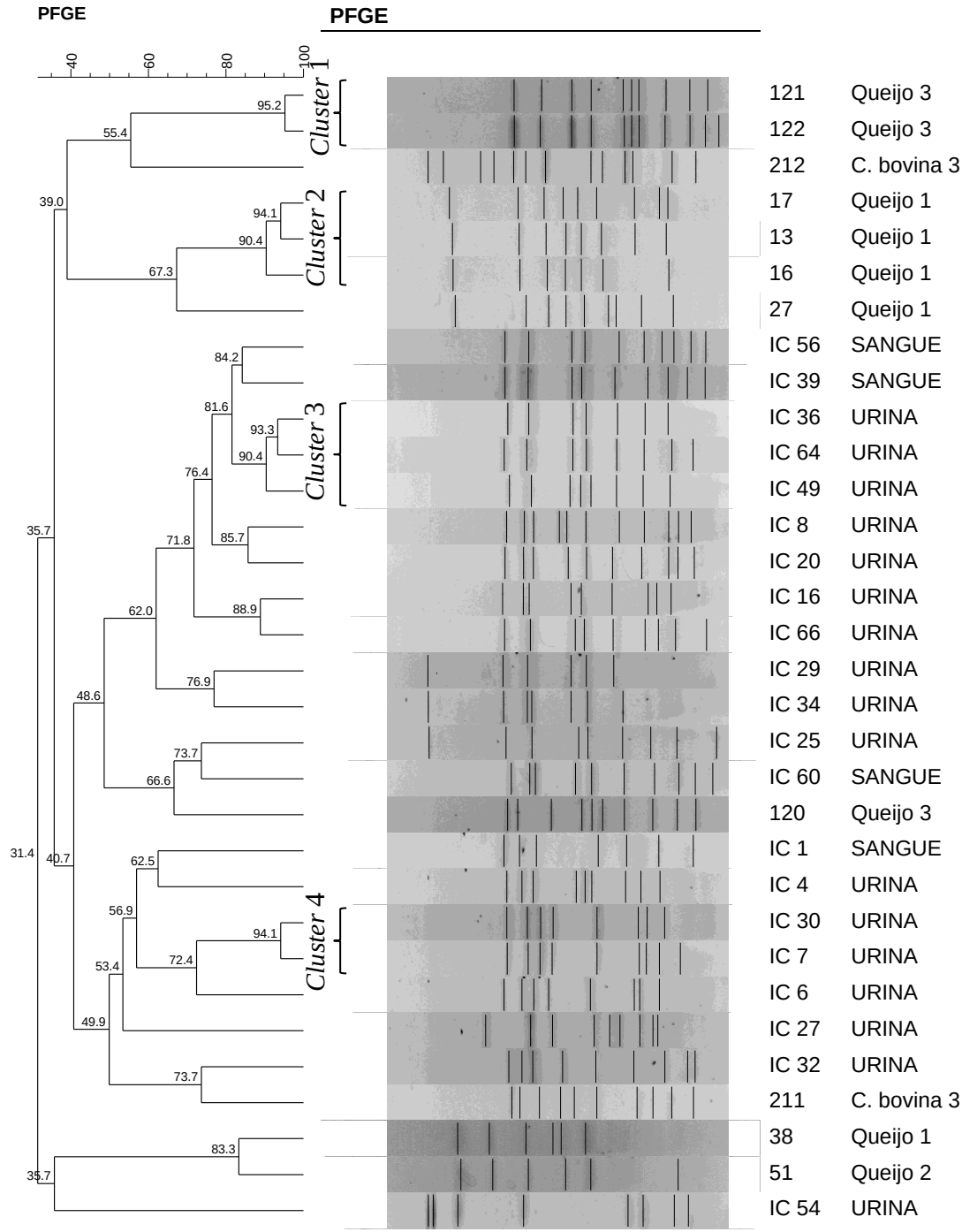


Figura 13 - Dendrograma baseado em UPGMA, gerado a partir dos perfis de restrição de DNA de *E. faecium* isolados de alimentos obtidos por eletroforese em campo pulsado (PFGE).

Tabela 12 - Ocorrência de fenótipos de resistência e genes de resistência e de virulência em *E. faecium*

Isolado	Origem	Fenótipos de resistência	Genes de resistência	Genes de virulência
121	Queijo 3			
122	Queijo 3	Q/D		
212	Bovina 3	NOR		
17	Queijo 1			
13	Queijo 1			
16	Queijo 1			
27	Queijo 1			
IC 56	Sangue	AMP, CIP, P, TEC, VAN		
IC 39	Sangue	AMP, CIP, P, TEC, VAN		
IC 36	Urina	AMP, CIP, EST, P, TEC, VAN	<i>ant (6) - Ia</i>	
IC 64	Urina	AMP, CIP, EST, P	<i>ant (6) - Ia</i>	<i>ace</i>
IC 49	Urina	AMP, CIP, P		
IC 8	Urina	AMP, CIP, P		
IC 20	Urina	AMP, CIP, P		
IC 16	Urina	AMP, CIP, P, TEC, VAN		
IC 66	Urina	AMP, CIP, P, TEC, VAN		<i>ace, cylA, efaA</i>
IC 29	Urina	AMP, CIP, P, TEC, VAN		
IC 34	Urina	AMP, CIP, DAP, EST, P, TEC, VAN	<i>ant (6)- Ia</i>	
IC 25	Urina	AMP, CIP, P, TEC, VAN		
IC 60	Sangue	AMP, CIP, EST, P, TEC, VAN		<i>ace</i>
120	Queijo 3			
IC 1	Sangue	AMP, CIP, EST, P, TEC, VAN	<i>ant (6)- Ia</i>	
IC 4	Urina	AMP, CIP, CN, P	<i>aph(2'')Ia/aac(6')-Ie</i>	
IC 30	Urina	AMP, CIP, P		
IC 7	Urina	AMP, CIP, P		
IC 6	Urina	AMP, CIP, P		
IC 27	Urina			
IC 32	Urina	AMP, CIP, P	<i>ant (6)- Ia</i>	
211	Bovina 3	CIP, NOR, MOX, ERI		
38	Queijo 1	LZD		<i>gelE, cylA</i>
51	Queijo 2	Q/D, LEV		
IC 54	Urina			<i>ace, efaA, esp</i>

IC: Isolado clínico; CIP: Ciprofloxacina; EST: Estreptomicina; LZD: Linezolida; NOR: Norfloxacin; TE: Tetraciclina; P: Penicilina; LEV: Levofloxacina; Q/D: Quinupristina-Dalfopristina; ERI: Eritromicina; MOX: Moxifloxacina; TEC: Teicoplanina; VAN: Vancomicina; *as*: Substância de agregação; *ace*: Adesina de colágeno; *gelE*: Gelatinase; *cylA*: Citolisina; *efaA*: Antígeno A; *esp*: Proteína de superfície de *Enterococcus*.

Foram encontradas, em uma mesma amostra de alimento, diferentes cepas de *E. faecium* e *E. faecalis*. As cepas de *E. faecium* 27 e 38, provenientes do queijo 1, apresentam apenas 35.7% de similaridade, sendo que a cepa 38 apresenta resistência à linezolida e os genes de virulência *gelE* e *cylA*, enquanto na cepa 27 não foram detectados resistência a antimicrobianos testados e genes de virulência e resistência. Além disso, 5 diferentes cepas de *E. faecalis* foram isolados a partir da amostra de queijo 1. A presença de cepas geneticamente distintas em uma mesma amostra de queijo pode ser explicada pelo fato de alguns laticínios utilizam leite de diversos produtores, como relatado por Fernandes e colaboradores (2015).

Com relação à diversidade genética das cepas de origem clínica, sabe-se que *Enterococcus* spp. associados a infecções podem ter origem na própria microbiota, ou serem transmitidos entre pacientes, principalmente por meio das mãos dos profissionais da saúde (HIGUITA; HUYCKE, 2014). Assim, o isolamento de cepas geneticamente diferentes pode refletir a diversidade de clones de *E. faecalis* e *E. faecium* compondo a microbiota de pacientes e circulando no ambiente hospitalar. Somily e colaboradores (2016) também detectaram diferentes clones de *E. faecium* isolados de infecção de corrente sanguínea e de urina. Palazzo e colaboradores (2011) revelaram que os surtos ERV no Brasil são causadas por cepas que não compartilham uma história evolutiva comum.

Por outro lado, de acordo com Rezende e colaboradores (2014), foi detectado no Sul do Brasil, um surto causado por cepas de *E. faecium* pertencentes a um mesmo clone. Gozalan e colaboradores (2015) também observaram uma similaridade genética entre as cepas de *E. faecium* isolados de pacientes, indicando uma disseminação desse clone no hospital.

As cepas de *Enterococcus* spp. isoladas de alimentos nesse estudo podem ser transmitidas aos seres humanos via cadeia alimentar e colonizar o trato gastro intestinal. Além disso, podem servir de reservatório de genes de resistência e de virulência para as bactérias comensais. Diante de um quadro de queda da imunidade, essas bactérias podem translocar a barreira intestinal e causar infecções de diversos tipos, como mencionado acima. Sendo assim, sugerimos uma maior vigilância sobre as boas práticas de fabricação em toda a cadeia de produção desses alimentos a fim de evitar a contaminação e transmissão de *Enterococcus* spp. multirresistentes.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- Carnes de frango, bovina, suína e queijo Minas Frescal comercializadas em São José do Rio Preto - SP apresentam contaminação por *Enterococcus* spp. resistentes à diversas classes de antimicrobianos (tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos, quinolonas, estreptograminas, fenicóis e beta-lactâmicos).
- *Enterococcus* spp. que apresentam resistências às diversas classes de antimicrobianos (aminoglicosídeos, quinolonas, glicopeptídeos e beta-lactâmicos) estão presentes em amostras clínicas de um Hospital Terciário em São José do Rio Preto - SP.
- *Enterococcus* spp. apresentando características de multirresistência aos antimicrobianos estão presentes em alimentos e amostras clínicas.
- *Enterococcus* spp. de amostras clínicas apresentam maiores taxas de resistência aos antimicrobianos quando comparados aos isolados de alimentos.
- Os genes *tetK*, *tetL*, *tetM* e *tetC* são os principais determinantes de resistência à tetraciclina nos *Enterococcus* spp. isolados de carnes e queijos.
- A produção de AMEs, especificamente fosfotransferases e acetiltransferases, codificada pelo gene *aac(6')-Ie/aph(2'')-Ia* e pela nucleotidiotransferase codificada pelo gene *ant6-Ia* são as principais determinantes de resistência aos aminoglicosídeos nos *Enterococcus* spp. isolados de carnes e queijos e de amostras clínicas.
- *Enterococcus* spp. isolados de carnes e queijos e de amostras clínicas carregam genes codificadores dos seguintes fatores de virulência *As*, *Ace*, *EfaA*, *GelE*, *Cyl*, *Esp*.
- A expressão fenotípica da gelatinase e citolisina não está presente em todos os isolados de *Enterococcus* spp. que apresentaram os genes *gelE* e *cylA*.
- *E. faecalis* e *E. faecium* isolados de carnes e queijos e de amostras clínicas não apresentam similaridade genética, pelo método do PFGE.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F. M. et al. 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. et al. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 2054-2059, 2001.

AARESTRUP, F. M. et al. Glycopeptide susceptibility among Danish *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates of animal and human origin and PCR identification of genes within the VanA cluster. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, p. 1938-1940, 1996.

AARESTRUP, F. M. Occurrence of glycopeptide resistance among *Enterococcus faecium* isolates from conventional and ecological poultry farms. **Microbial Drug Resistance**, v. 1, p. 255-257, 1995.

ABIQ 2015. **Irã, Quênia e Brasil: Três mercados a serem acompanhados no segmento do queijo.** Disponível em: <http://www.abiq.com.br/noticias_ler.asp?codigo=1648&codigo_categoria=6&codigo_subcategoria=5>. Acesso 5 jun. 2016.

ABOUELNAGA, M. et al. Evaluation of the extent of spreading of virulence factors and antibiotic resistance in *Enterococci* isolated from fermented and unfermented foods. **Annals of Microbiology**, v. 66, p. 577-585, 2016.

ALLINGTON, D. R.; RIVEY, M. P. Quinupristin/dalfopristin: A therapeutic review. **Clinical Therapeutics**, v. 23, p. 24-44, 2001.

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

AMYES, S. G. B. Enterococci and streptococci. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 29, p. 43-52, 2007.

ANDERSON, A. C. et al. *Enterococcus faecalis* from food, clinical specimens, and oral sites: Prevalence of virulence factors in association with biofilm formation. **Front Microbiol**, v. 6, p. 1-14, 2016.

ANUAL BRASILEIRO DA PECUÁRIA. **Anuário Brasileiro da Pecuária 2014**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, 2014. 64p.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Surto de Enterococos resistente à vancomicina em estabelecimentos de assistência à saúde. **Informe Técnico**, n. 05/07, 2007.

APUA 2006. Alliance for the Prudent Use of Antibiotics. **Practitioner guidelines**. Disponível em: <<http://www.tufts.edu/med/apua/Practitioners/healthcare.html>>. Acesso 5 mar. 2014.

ARCA, P.; REGUERA, G.; HARDISSON, C. Plasmid-encoded fosfomycin resistance in bacteria isolated from the urinary tract in a multicentre survey. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 3, p. 393-399, 1997.

ARIAS, C. A. et al. Cotransfer of antibiotic resistance genes and a hylEfm-containing virulence plasmid in *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, p. 4240-4246, 2009.

ARIAS, C. A.; MURRAY, B. E. The rise of the *Enterococcus*: Beyond vancomycin resistance. **Nature**, v. 10, p. 266-278, 2012.

ARSÈNE, S.; LECLERCQ, R. Role of a *qnr*-Like Gene in the intrinsic resistance of *Enterococcus faecalis* to fluoroquinolones. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 3254-3258, 2007.

ASADIAN, M. et al. Antimicrobial resistance pattern and genetic correlation in *Enterococcus faecium* isolated from healthy volunteers. **Microbial Pathogenesis**, v. 92, p. 54-59, 2016.

ASLAM, M. et al. Characterization of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus* spp. isolated from retail meats in Alberta. **Canada International Journal of Food Microbiology**, v. 156, p. 222-230, 2012.

AYENI, F. A. et al. Identification and prevalence of tetracycline resistance in enterococci isolated from poultry in Ilishan, Ogun State, Nigeria. **Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences**, v. 8, p. 69-73, 2016.

BAMAS-JACQUES, N. et al. Cluster organization of the genes of *Streptomyces pristinaespiralis* involved in pristinomycin biosynthesis and resistance elucidated by pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 87, p. 939-948, 1999.

BARZA, M.; GORBACH, S. L. The need to improve antimicrobial use in agriculture: Ecological and human health consequences. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, p. 76-77, 2002.

BATES, E. M.; JORDENS, J. Z.; GRIFFITS, D. T. Farm animals as a putative reservoir for vancomycin resistant enterococcal infections in man. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 34, p. 507-516, 1994.

BATES, J.; JORDENS, Z.; SELKON, J. B. Evidence for an animal origin of vancomycin-resistant enterococci. **The Lancet**, v. 342, p. 490-491, 1993.

BENNETT, P. M. Plasmid encoded antibiotic resistance: Acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, p. 347-357, 2008.

BERTELLONI, F. et al. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. isolated from laying hens of backyard poultry flocks. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 22, p. 665-669, 2015.

BETHEA, J. A.; WALKO, C. M.; TARGOS P. A. Treatment of vancomycin-resistant enterococci with quinupristin/dalfopristin and high-dose ampicillin. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 38, p. 989-991, 2004.

BILLINGTONA, E. O. et al. Incidence, risk factors, and outcomes for *Enterococcus* spp. blood stream infections: A population-based study. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 26, p. 76-82, 2014.

BIMINGHAM, M. C. et al. Linezolid for the treatment of multidrug-resistant, gram-positive infections: experience from a compassionate-use program. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, p. 159-68, 2003.

BISWAS, P. P. et al. Molecular characterization of virulence genes in vancomycin-resistant and vancomycin-sensitive enterococci. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 8, p. 16-24, 2016.

BOELTER, R. Resíduos de antibióticos nos alimentos de origem animal. In: MAGALHÃES, H. M. (Ed.). **Farmacologia veterinária**. Guaíba: Agropecuária LTDA, 1998.

BOGAARD, A. E. et al. Vancomycin-resistant enterococci in turkeys and farmers. **The New England Journal of Medicine**, v. 337, p. 1558-1559, 1997.

BORTOLAIA, V.; ESPINOSA-GONGORA, C.; GUARDABASSI, L. Human health risks associated with antimicrobial-resistant enterococci and *Staphylococcus aureus* on poultry meat. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, p. 130-140, 2016.

BRAGA, T. M.; POMBA, C.; LOPES, M. F. High-level vancomycin resistant *Enterococcus faecium* related to humans and pigs found in dust from pig breeding facilities. **Veterinary Microbiology**, v. 161, p. 344-349, 2013.

BRITT, N. S.; POTTER, E. M. Clinical epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* and *Enterococcus casseliflavus* bloodstream infections. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 5, p. 57-61, 2016.

CAMARGO, C. H. et al. Prevalence and phenotypic characterization of *Enterococcus* spp. isolated from food in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 111-115, 2014.

CAMPOS, A. C. F. B. et al. Resistência antimicrobiana em *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* isolados de carcaças de frango. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33 p. 575-580, 2013.

CARIAS, L. L. et al. Genetic linkage and cotransfer of a novel, vanB-containing transposon (Tn5382) and a low-affinity penicillin-binding protein 5 gene in a clinical vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolate. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 4426-4434, 1998.

CASTRO, R. D. et al. Lactic acid microbiota identification in water, raw milk, endogenous starter culture, and fresh Minas artisanal cheese from the Campo das Vertentes region of Brazil during the dry and rainy seasons. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 6086-6096, 2016.

CDC 2012. Centers for Disease Control and Prevention. **Unified Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Protocol for Gram Positive**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/hai/pdfs/labsettings/unified_pfge_protocol.pdf>. Acesso 2 out. 2016.

CERCENADO, E. *Enterococcus*: Resistencias fenotípicas y genotípicas y epidemiología en España. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 29, p. 59-65, 2011.

CHEN, C. et al. Prevalence of the fosfomycin-resistance determinant, fosB3, in *Enterococcus faecium* clinical isolates from China. **Journal of Medical Microbiology**, v. 63, p. 1484-1489, 2014.

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

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

CHUANG-SMITH, O. N. et al. Acceleration of *Enterococcus faecalis* biofilm formation by aggregation substance expression in an ex model of cardiac valve colonization. **PloS One**, v. 5, p. 1-11, 2010.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. Twenty-second informational supplement M100-S22, v. 32, n. 3. Wayne, P.A. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. Twenty-first Informational Supplement M100-S23, v. 33, n. 1. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2013.

COBURN, P. S.; GILMORE, M. S. The *Enterococcus faecalis* cytolysin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. **Cellular Microbiology**, v. 5, p. 661-669, 2003.

COCCONCELLI, P. S.; CATTIVELLIA, D.; GAZZOLAB, S. Gene transfer of vancomycin and tetracycline resistances among *Enterococcus faecalis* during cheese and sausage fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 315-323, 2003.

CORMELATO, C. B et al. Presence of virulence factors in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* susceptible and resistant to vancomycin. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 590-595, 2013.

CORREIA, S. et al. Vancomycin-resistant enterococci among haemodialysis patients in Portugal: Prevalence and molecular characterization of resistance, virulence and clonality. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 32, p. 174-176, 2014.

DAVIES, J. E. Aminoglycosides: Ancient and Modern. **The Journal of Antibiotics**, v. 59, p. 529-532, 2006.

DEL CAMPO, R. et al. Aminoglycoside-modifying enzymes in high-level streptomycin and gentamicin resistant *Enterococcus* spp. in Spain. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 15, p. 221-226, 2000.

DEL GROSSO, M. et al. Detection and characterization of vancomycin-resistant enterococci in farm animals and raw meat products in Italy. **Microbial Drug Resistance**, v. 6, p. 313-318, 2000.

DEL GROSSO, M. et al. The macrolide resistance genes *erm*(B) and *mef*(E) are carried by Tn2010 in dual gene *Streptococcus pneumoniae* isolates belonging to clonal complex CC271. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 4184-4186, 2007.

DOMIG, K. J.; MAYER, H. K.; KNEIFEL, W. Methods used for the isolation, enumeration, characterization and identification of *Enterococcus* spp. 2. Pheno and geno typic criteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 165-188, 2003.

DONABEDIAN, S. M. et al. Molecular characterization of gentamicin-resistant enterococci in the United States: evidence of spread from animals to humans through food. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 1109-1113, 2003.

DUTKA-MALEN, S.; EVERS, S.; COURVALIN, P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 24-27, 1995.

EATON, T. J.; GASSON, M. J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. **Applied and Environmental of Microbiology**, v. 67, p. 1628-1635, 2001.

ECDC. **Antimicrobial resistance and healthcare-associated infections**. Stockholm: Annual epidemiological report, 2014. 23p.

ERLANDSON, K. M. et al. Impact of the more-potent antibiotics quinupristin-dalfopristin and linezolid on outcome measure of patients vancomycin-resistant *Enterococcus* bacteremia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, p. 30-36, 2008.

ESHAGHI, A. et al. Characterization of an *Enterococcus gallinarum* isolate carrying a dual vanA and vanB cassette. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, p. 2225-2229, 2015.

EUZEBY, J. P. 2016. **List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature**. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/enterococcus.html>>. Acesso 22 set. 2016.

FÀBREGA, A. et al. Quinolone resistance in the food chain. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 31, p. 307-315. 2008.

FACKLAM, R. R.; CAREY, R. B. Streptococci and aerococci. In: LENETTE, E. H. et al. (Eds.). **Manual of Clinical Microbiology**. 4. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1985. p. 154-175.

FACKLAM, R. R.; SHAM, D. F.; TEIXEIRA, L. M. *Enterococcus*. In: MURRAY, P. R. et al. (Eds.). **Manual of clinical microbiology**. 7. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1999. p. 297-305.

FAO/OMS 2004. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Animal Food Production: Code of Practice to Minimize and Contain Antimicrobial Resistance**. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/012/i1111e/i1111e00.htm>>. Acesso 20 nov. 2011.

FARD, R. M. N.; HEUZENROEDER, M. W.; BARTON, M. D. Antimicrobial and heavy metal resistance in commensal enterococci isolated from pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 148, p. 276-282, 2011.

FARIA, D. E. et al. Alternativas ao uso de antibióticos como promotores de crescimento para frangos de corte: 1. Probióticos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, p. 1-6, 2009.

FDA 2015. Food and Drug Administration, United States Department of Agriculture. **On Antimicrobials Sold or Distributed for Use in Food-Producing Animals**. Disponível em <<http://www.fda.gov/downloads/ForIndustry/UserFees>>. Acesso 12 ago. 2016.

FERNANDES, M. S. F. et al. Dissemination of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in a ricotta processing plant and evaluation of pathogenic and antibiotic resistance profiles. **Journal of Food Science**, v. 80, p. 765-775, 2015.

FINEGOLD, S. M.; SUTTER, V. L.; MATHISEN, G. E. Normal indigenous intestinal flora. In: HENTGES, D. J. (Ed.). **Human intestinal microflora in health and disease**. Waltham: Academic Press, 1983. p. 3-29.

FLETCHER, H. M.; MARRI, L.; DANEOMOORE, L. Transposon-916 like elements in clinical isolates of *Enterococcus faecium*. **Journal General Microbiology**, v. 135, p. 3067-3077, 1989.

FRACALANZZA, S. A. et al. Antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from poultry meat and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 853-859, 2007.

FRANCIA, M. V. et al. Completion of the nucleotide sequence of the *Enterococcus faecalis* conjugative virulence plasmid pAD1 and identification of a second transfer origin. **Plasmid**, v. 46, p. 117-127, 2001.

FREITAS, A. R. et al. Human and swine hosts share vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* CC17 and CC5 and *Enterococcus faecalis* CC2 clonal clusters harboring Tn1546 on indistinguishable plasmids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, p.925-931, 2011.

FRENCH, G. L. The continuing crisis in antibiotic resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, p. 3-7, 2010.

FURLANETO-MAIA, L. et al. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* sp. isolated from soft cheese in southern Brazil. **Advances in Microbiology**, v. 4, p. 175-181, 2014.

GAGLIO, R. et al. Evaluation of antimicrobial resistance and virulence of enterococci from equipment surfaces, raw materials, and traditional cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 236, p. 107-114, 2016.

GALES, A. C. et al. Antimicrobial susceptibility of gram-positive bacteria isolated in Brazilian hospitals participating in the SENTRY Program (2005-2008). **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 13, p. 90-98, 2009.

GARNIER, F. et al. Characterization of transposon Tn1549, conferring VanB-type resistance in *Enterococcus* spp. **Microbiology**, v. 146, p. 1481-1489, 2000.

GASPAR, F. B.; CRESPO, M. T. B.; LOPES, M. F. S. Proposal for a reliable enterococcal cytolysin production assay avoiding apparent incongruence between phenotype and genotype. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 1122-1124, 2009.

GASTMEIER, P. et al. Dramatic increase in vancomycin-resistant enterococci in Germany. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, p. 1660-1664, 2014.

GAZZOLA, S. et al. Assessment of tetracycline and erythromycin resistance transfer during sausage fermentation by culture-dependent and -independent methods. **Food Microbiology**, v. 30, p. 348-354, 2012.

GILMORE, M. S. et al. **Enterococci from commensals to leading causes of drug resistant infection on Bookshelf**. Rockville: Eye and Ear Infirmary Boston, 2014.

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

GOEL, V. Community acquired enterococcal urinary tract infections and antibiotic resistance profile in North India. **Journal of Laboratory Physicians**, v. 8, p. 50-54, 2016.

GOMES, B. C. et al. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. **Food Microbiology**, v. 25, p. 668-675, 2008.

GOZALAN, T. A. et al. Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strains isolated from carriage and clinical samples in a tertiary hospital. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, p. 759-766, 2015.

GUARDDON, M. et al. Real-time polymerase chain reaction for the quantitative detection of *tetA* and *tetB* bacterial tetracycline resistance genes in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, p. 284-289, 2011.

GUERRERO-RAMOS, E. et al. Antimicrobial resistance and virulence genes in enterococci from wild game meat in Spain. **Food Microbiology**, v. 53, p. 156-164, 2016.

GUERRERO-RAMOS, E. et al. Prevalence, antimicrobial resistance, and genotypic characterization of vancomycin-resistant enterococci in meat preparations. **Journal of Food Protection**, v. 79, p. 748-756, 2016.

GUTIERREZ, L. et al. Pharmacokinetics of disodium fosfomycin in broilers and dose strategies to comply with its pharmacodynamics versus *Escherichia coli*. **Poultry Science**, v. 89, p. 2106-2115, 2010.

HAAS, W.; SHEPARD, B. D.; GILMORE, M. S. Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction. **Nature**, v. 415, p. 84-87, 2002.

HAMMAD, A. M.; HASSAN, H. A.; SHIMAMOTO, T. Prevalence, antibiotic resistance and virulence of *Enterococcus* spp. in Egyptian fresh raw milk cheese. **Food Control**, v. 50, p. 815-820, 2015.

HAMMAD, A. M.; SHIMAMOTO, T.; SHIMAMOTO, T. Genetic characterization of antibiotic resistance and virulence factors in *Enterococcus* spp. from Japanese retail ready-to-eat raw fish. **Food Microbiology**, v. 38, p. 62-66, 2014.

HAMMERUM, A. M. et al. Characterization of vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus faecium* isolates from humans, chickens and pigs by ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 45, p. 677-680, 2000.

HAMMERUM, A. M.; LESTER, C. H.; HEUER, O. E. Antimicrobial-resistant enterococci in animals and meat: a human health hazard? **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, p. 1137-1146, 2010.

HAN, D. et al. The occurrence of virulence traits among high-level aminoglycosides resistant *Enterococcus* isolates obtained from feces of humans, animals, and birds in South Korea. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, p. 387-392, 2011.

HEGSTAD, K. et al. Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, p. 541-554, 2010.

HEIKENS, E. et al. Contribution of the enterococcal surface protein Esp to pathogenesis of *Enterococcus faecium* endocarditis. **Microbes and Infection**, v. 13, p. 1185-1190, 2011.

HEINTZ, B. H.; HALILOVIC, J.; CHRISTENSEN, C. L. Vancomycin-resistant enterococcal urinary tract infections. **Pharmacotherapy**, v. 30, p. 136-149, 2010.

HENDRICKX, A. P. et al. LPxTG surface protein of enterococci. **Trends Microbiology**, v. 17, p. 423-430, 2009.

HERSHBERGER, E. et al. Epidemiology of antimicrobial resistance in enterococci of animal origin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, p. 127-130, 2005.

HIDANO, A. et al. Unraveling antimicrobial resistance genes and phenotype patterns among *Enterococcus faecalis* isolated from retail chicken products in Japan. **PloS One**, v. 10, p. 1-15, 2015.

HIDRON, A. I. et al. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 29, p. 996-1011, 2008.

HIGUITA, N. I. A.; HUYNH, M. M. Enterococcal disease, epidemiology and implications for treatment. In: GILMORE, M. S. (Eds.). **Enterococci from commensals to leading causes of drug resistant infection**. Massachusetts: Eye and Ear Infirmary, 2014.

HIRT, H. et al. Characterization of the pheromone response of the *Enterococcus faecalis* conjugative plasmid pCF10: complete sequence and comparative analysis of the transcriptional and phenotypic responses of pCF10-containing cells to pheromone induction. **Journal of Bacteriology**, v. 187, p. 1044-1054, 2005.

HOPKINS, K. L.; DAVIES, R. H.; THRELFALL, E. J. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 25, p. 358-373, 2005.

HUBBLE, T. S. et al. Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 18, p. 121-126, 2003.

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. et al. Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from food. **Applied in Environmental Microbiology**, v. 70, p. 1555-1562, 2004.

HWANG, I. Y. et al. Distribution of streptogramin resistance genes and genetic relatedness among quinupristin/dalfopristin-resistant *Enterococcus faecium* recovered from pigs and chickens in Korea. **Research in Veterinary Science**, v. 89, p. 1-4, 2010.

ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Microbial Ecology of Food Commodities**. New York: Kluwer Academic, Plenum Publishers, 2005. 736p. (Microorganisms in foods, 6).

IKE, Y. et al. Vancomycin-resistant enterococci in imported chickens in Japan. **The Lancet**, v. 353, p. 1854, 1999.

JACKSON, C. R. et al. Effects of tylosin use on erythromycin resistance in enterococci isolated from swine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 4205-4210, 2004.

JAHAN, M. et al. Horizontal transfer of antibiotic resistance from *Enterococcus faecium* of fermented meat origin to clinical isolates of *E. faecium* and *Enterococcus faecalis*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 199, p. 78-85, 2015.

JAHAN, M.; HOLLEY, R. A. Incidence of virulence factors in enterococci from raw and fermented meat and biofilm forming capacity at 25°C and 37°C. **International Journal of Food Microbiology**, v. 170, p. 65-69, 2014.

JAHAN, M.; KRAUSE, D. O.; HOLLEY, R. A. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* species from meat and fermented meat products isolated by a PCR-based rapid screening method. **International Journal of Food Microbiology**, v. 163, p. 89-95, 2013.

JAMET, E. et al. Prevalence and characterization of antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* in French cheeses. **Food Microbiology**, v. 31, p. 191-198, 2012.

JARVIS, W. R.; MARTONE, W. J. Predominant pathogens in hospital infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 29, p. 19-24, 1992.

JENKINS, I. Linezolid- and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* endocarditis: Successful treatment with tigecycline and daptomycin. **Journal of Hospital Medicine**, v. 2, p. 343-344, 2007.

JURKOVIC, D. et al. Genetic diversity of *Enterococcus faecium* isolated from Bryndza cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, p. 82-87, 2007.

KACMAZ, B.; AKSOY, A. Antimicrobial resistance of enterococci in Turkey. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 25, p. 535-538, 2005.

KAFIL, H. S. et al. Gentamicin induces *efaA* expression and biofilm formation in *Enterococcus faecalis*. **Microbial Pathogenesis**, v. 92, p. 30-35, 2016.

KAFIL, H. S.; MOBAREZ, A. M. Spread of enterococcal surface protein in antibiotic resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates from urinary tract infections. **The Open Microbiology Journal**, v. 9, p. 14-17, 2015

KAYAOGLU, G.; ORSTAVIK, D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: Relationship to endodontic disease. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 15, p. 308-320, 2004.

KE, D. et al. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. **Journal Clinical Microbiology**, v. 37, p. 3497-3503, 1999.

KEHOE, L. E. et al. Structural basis of Synercid® (Quinupristin-Dalfopristin) resistance in gram-positive bacterial pathogens. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 29963-29970, 2003.

KILONZO-NTHENGE, A. et al. Occurrence and antimicrobial resistance of enterococci isolated from organic and conventional retail chicken. **Journal of Food Protection**, v. 78, p. 760-766, 2015.

KLARE, I. et al. Decreased incidence of VanA-type vancomycin-resistant enterococci isolated from poultry meat and from fecal samples of humans in the community after discontinuation of avoparcin usage in animal husbandry. **Microbial Drug Resistance**, v. 5, p. 45-52, 1999.

KLARE, I. et al. *Enterococcus faecium* strains with vanA-mediated high-level glycopeptide resistance isolated from animal foodstuffs and fecal samples of humans in the community. **Microbial Drug Resistance**, v. 1, p. 265-272, 1995.

KLARE, I. et al. Environmental strains of *Enterococcus faecium* with inducible high-level resistance to glycopeptides. **FEMS Microbiology Letters**, v. 80, p. 23-29, 1993.

KLARE, I. et al. Increased frequency of linezolid resistance among clinical *Enterococcus faecium* isolates from German hospital patients. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 3, p. 128-131, 2015.

KLIBI, N. et al. Species distribution, antibiotic resistance and virulence traits in enterococci from meat in Tunisia. **Meat Science**, v. 93, p. 675-680, 2013.

KOLUMAN, A.; AKAN, L. S.; ÇAKIROGLU, F. P. Occurrence and antimicrobial resistance of enterococci in retail foods. **Food Control**, v. 20, p. 281-283, 2009.

KOO, H. J.; WOO, G. J. Distribution and transferability of tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli* isolated from meat and meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, p. 407-413, 2011.

KORB, A. et al. Riscos para a saúde humana do uso de antibióticos na cadeia produtiva leiteira. **Revista de Saúde Pública de Santa Catarina**, v. 4, p. 21-36, 2011.

KOROTKEVICH, Y. V. Antibiotic resistance analysis of *Enterococcus* spp. and *Enterobacteriaceae* spp. isolated from food. **Vopr Pitan**, v. 85, p. 5-13, 2016.

KRAMER, A.; SCHWEBKE, I.; KAMPF, G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. **BMC Infectious Diseases**, v. 6, p. 1-8, 2006.

KRISTICH, C. J.; RICE, L. B.; ARIAS, C. A. Enterococcal infection. Treatment and antibiotic resistance. In: GILMORE, M. S. et al. (Eds.). **Enterococci from commensals to leading causes of drug resistant infection**. Massachusetts: Eye and Ear Infirmary, 2014.

KRUSE, H.; RORVIK, L. M. The use of avoparcin as a growth promoter and the occurrence of vancomycin resistant *Enterococcus* spp. in poultry production. In: _____. **Program and abstracts of the 96th general meeting of the american society for microbiology**. New Orleans. American Society for Microbiology, 1996, p. 36.

LAMMIE, L. L.; HUGHES, J. M. Antimicrobial resistance, food safety, and one health: The need for convergence. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 7, p. 287-312, 2016.

LANDERS, T. F. et al. A review of antibiotic use in food animals: Perspective, Policy, and Potential. **Public Health Reports**, v. 127, p. 4-22, 2012.

LARSEN, J. et al. Porcine-origin gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* in humans, Denmark. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v. 16, p. 682-684, 2010.

LAVERDE GOMEZ, J. A. et al. A multiresistance megaplasmid pLG1 bearing a *hylEfm* genomic island in hospital *Enterococcus faecium* isolates. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, p. 165-175, 2011.

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

LEBRETON, F.; WILLEMS, R. J. L.; GILMORE, M. S. Enterococcus diversity, origins in nature, and gut colonization. In: GILMORE, M. S. et al. (Eds.). **Enterococci from commensals to leading causes of drug resistant infection**. Massachusetts: Eye and Ear Infirmary, 2014. p. 3-44.

LEENDERTSE M. et al. Enterococcal surface protein transiently aggravates *Enterococcus faecium*-induced urinary tract infection in mice. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 200, p. 1162-1165, 2009.

LEME, I. L. et al. 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.

LI, B. et al. Investigation of mechanisms and molecular epidemiology of linezolid nonsusceptible *Enterococcus faecalis* isolated from a teaching hospital in China. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 49, p. 595-599, 2016.

LOPES, A. M. et al. Smith cloning of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen: Homology with adhesins from some oral streptococci. **Infection and Immunity**, v. 63, p. 703-706, 1995.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10. ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004. 144p.

MAGIORAKOS, A. P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 18, p. 268-281, 2011.

MALANI, P. N.; KAUFFMAN, C. A.; ZERVOS, M. J. Enterococcal disease, epidemiology and treatment. In: GILMORE, M.S. (Ed.). **The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance**. Washington: ASM Press, 2002. p. 385-408.

MANNU, L. et al. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 291-304, 2003.

MANSON, J. M.; HANCOCK, L. E.; GILMORE, M. S. Mechanism of chromosomal transfer of *Enterococcus faecalis* pathogenicity island, capsule, antimicrobial resistance, and other traits. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, p. 12269-12274, 2010.

MAPA 1998. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Brasil. **Aditivos proibidos**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/aditivos-proibidos>>. Acesso 2 fev. 2014.

MAPA 2003. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Brasil. **Instrução normativa nº 9, de 27 de junho de 2003**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/alimentacao/legislacao>>. Acesso 28set. 2016.

MAPA 2012. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Brasil. **Resíduos e contaminantes animal**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/residuos-e-contaminantes>>. Acesso 25 jan. 2016.

MAPA 2014. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Brasil. **Registros e autorização**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Registros_Autorizacao>. Acesso 15 fev. 2016.

MAPA 2015. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Brasil. **Bovinos e Bubalinos**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies>>. Acesso 2 fev. 2016.

MARSHALL, B. M.; LEVY, S. B. Food animals and antimicrobials: Impacts on human health. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, p. 718-733, 2011.

MARTINEZ, M.; McDERMOTT, P.; WALKER, R. Pharmacology of the fluoroquinolones: a perspective for the use in domestic animals. **Veterinary Journal**, v. 172, p. 10-28, 2006.

MASLOW, J. N.; SLUTSKY, A. M.; ARBEIT, R. D. Application of pulsedfieldgel electrophoresis to molecular epidemiology. In: PERSING, D. H. et al. (Eds.). **Diagnostic molecular microbiology: Principles and applications**. Washington: American Society for Microbiology, 1993. p. 563-572.

MAVE, V. et al. Vancomycin-resistant enterococcal bacteraemia: Is daptomycin as effective as linezolid? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, p. 175-180, 2009.

MEDEIROS, A. W. et al. Molecular detection of virulence factors among food and clinical *Enterococcus faecalis* strains in South Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 327-332, 2014.

MESSI, P. et al. Vancomycin-resistant enterococci (VRE) in meat and environmental samples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 107, p. 218-222, 2006.

MICHALOPOULOS, A. S.; LIVADITIS, I. G.; GOUGOUTAS, V. The revival of fosfomycin. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, p. 732-739, 2011.

MOHAMED, J. A. et al. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 3658-3663, 2004.

MORAIS, C. M. Q. J. et al. Presença de resíduos de antibióticos em leite bovino pasteurizado. **Ciência e Tecnologia Alimentar**, v. 30, p. 33-35, 2010.

MORRISON, D.; WOODFORD, N.; COOKSON, B. Enterococci as emerging pathogens of humans. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, v. 83, p. 89-99, 1997.

NALLAPAREDDY, S. R. et al. *Enterococcus faecalis* adhesin, ace, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 5218-5224, 2000.

NALLAPAREDDY, S. R. et al. Relative contributions of Ebp pili and the collagen adhesin Ace to host extracellular matrix protein adherence and experimental urinary tract infection by *Enterococcus faecalis* OG1RF. **Infection and Immunity**, v. 79, p. 2901-2910, 2011.

NALLAPAREDDY, S. R.; SINGH, K. V.; MURRAY, B. E. Contribution of the collagen adhesin Acm to pathogenesis of *Enterococcus faecium* in experimental endocarditis. **Infection and Immunity**, v. 76, p. 4120-4128, 2008.

NG, L. K. et al. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistance genes. **Molecular and Cellular Probes**, v. 15, p. 209-215, 2001.

NIUA, H. et al. The prevalence of aminoglycoside-modifying enzyme and virulence genes among enterococci with high-level aminoglycoside resistance in Inner Mongolia, China. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 691-696, 2016.

O'DRISCOLL, C. et al. First outbreak of linezolid-resistant vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in an Irish hospital, February to September 2014. **Journal of Hospital Infection**, v. 91, p. 367-370, 2015.

OIE 2010. World Organization for Animal Health. **Terrestrial animal health code**. Disponível em: <http://web.oie.int/eng/normes/mcode/a_summry.htm>. Acesso 21 abr. 2014.

OIE 2015. World Organization for Animal Health. **OIE list of antimicrobials of veterinary importance**. Disponível em: <<http://www.oie.int/doc/ged/D9840.PDF>>. Acesso 02 nov. 2016.

OLIVEIRA, J. S.; ZANINE, A. M.; SANTOS, E. M. Uso de aditivos na nutrição de ruminantes. **Revista Eletrônica de Veterinária**, v. 6, p. 1-23, 2005.

ORSI, G. B.; CIORBA V. Vancomycin-resistant enterococci healthcare infections. **Annali di Igiene**, v. 25, p. 485-92, 2013.

ORSI, G. B.; CIORBA, V. Vancomycin resistant enterococci healthcare associated infections. **Annali di Igiene**, v. 25, p. 485-492, 2013.

OYAMADA, Y. et al. Combination of known and unknown mechanisms confers high-level resistance to fluoroquinolones in *Enterococcus faecium*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 729-736, 2006.

PALAZZO, I. C. V. et al. Changes in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* causing outbreaks in Brazil. **Journal of Hospital Infection**, v. 79, p. 70-74, 2011.

PALMER, K. L.; KOS, V. N.; GILMORE, M. S. Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, p. 632-639, 2010.

PAMvet-PR 2005. **Levantamento do uso e comercialização de medicamentos veterinários em frango de corte**. Disponível em: <<http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/vigilancia%20sanitaria/Relatorio%20levantamento%20frango.pdf>>. Acesso 15 mar. 2016.

PAPICH, M. G.; RIVIERE, J. E. Fluorquinolone antimicrobial drug. In: ADAMS, R. H. (Ed.). **Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. 8. ed. Oxford: Wiley Black Well, 2001. p. 898-917.

PARK, S. Y. et al. Immune evasion of *Enterococcus faecalis* by an extracellular gelatinase that cleaves C3 and iC3b. **The Journal of Immunology**, v. 181, p. 6328-6336, 2008.

PEREIRA-MAIA, E. et al. Tetraciclina e glicilciclina: Uma visão geral. **Química Nova**, v. 33, p. 700-706, 2010.

PÉREZ, D. S.; TAPIA, M. O.; SORACI, A. L. Fosfomicina: Uses and potentialities in veterinary medicine. **Open Veterinary Journal**, v. 4, p. 26-43, 2014.

PESAVENTO, G. et al. Prevalence and antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. isolated from retail cheese, ready-to-eat salads, ham, and raw meat. **Food Microbiology**, v. 41, p. 1-7, 2014.

PETERS, J. et al. Species distribution and antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from food of animal origin in Germany. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 311-314, 2003.

PIENIZ, S. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus* species isolated from meat and dairy products. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, p. 923-931, 2015.

POIREL, L.; CATTOIR, V.; NORDMANN, P. Plasmid-mediated quinolone resistance; interactions between human, animal, and environmental ecologies. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1-7, 2012.

POULSEN, L. L. et al. *Enterococcus faecalis* clones in poultry and in humans with urinary tract infections, Vietnam. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v. 18, p. 1096-1100, 2012.

- QU, T. T. et al. Fosfomycin resistance among vancomycin-resistant enterococci owing to transfer of a plasmid harbouring the *fosB* gene. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 43, p. 361-365, 2014.
- QU, T. T. et al. Novel vancomycin-resistance transposon, plasmid replicon types, and virulence factors of vancomycin-resistant enterococci in Zhejiang, China. **Microbial Drug Resistance**, v. 18, p. 183-189, 2012.
- RANJBAR, R. Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: a how-to guide. **New Microbiologica**, v. 37, p. 1-15, 2014.
- RESENDE, M. et al. Emergence of *vanA* vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a hospital in Porto Alegre, South Brazil. **The Journal of Infection Developing Countries**, v. 8, p. 160-167, 2014.
- RIBOLDI, G. P. et al. 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. et al. A potential virulence gene, *hylEfm*, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 187, p. 508-512, 2003.
- RICE, L. B. et al. Transferable capacity for gastrointestinal colonization in *Enterococcus faecium* in a mouse model. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 199, p. 342-349, 2009.
- RISTORI, C. A. et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility profile of *Enterococcus* spp. isolated from frozen chicken carcasses. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 2, p. 237-243, 2012.
- RIZZOTTI, L. et al. 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, A. A. et al. Mechanistic studies of *FosB*: a divalent-metal-dependent bacillithiol-S-transferase that mediates fosfomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Biochemical Journal**, v. 451, p. 69-79, 2013.
- ROBERTS, M. C. Update on acquired tetracycline resistance genes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 245, p. 195-203, 2005.
- ROBICSEK, A.; JACOBY, G. A.; HOOPER, H. C. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 6, p. 629-640, 2006.
- ROSSI, F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, p. 1138-43, 2011.
- ROUCH, D. A. et al. The *aacA-aphD* gentamicin and kanamycin resistance determinant of Tn4001 from *Staphylococcus aureus*: Expression and nucleotide sequence analysis. **Journal of General Microbiology**, v. 133, p. 3039-3052, 1987.
- SACRAMENTO, A. G. et al. Identification of new sequence types among *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* carrying the *vanA* gene in retail chicken meat. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 4, p. 72-73, 2016.

SAHGAL, V. S. et al. Quinupristin/dalfopristin (RP595000) therapy for vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* aortic graft infection: Case report. **Microbiology Drug Resistance**, v. 1, p. 245-247, 1995.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: A laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor, 2001. 34p.

SANTOS, K. M. et al. Safety, beneficial and technological properties of *Enterococcus faecium* isolated from Brazilian cheeses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 1, p. 237-49, 2015.

SCHLEIFER, K. H. Gram-positive cocci. In: SNEATH, H. A. et al. (Eds.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2. ed. Baltimore: The Williams & Wilkins Co., 1984. p. 999-1103.

SCHLIEVERT, P. M. et al. Aggregation and binding substances enhance pathogenicity in rabbit models of *Enterococcus faecalis* endocarditis. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 218-223, 1998.

SCHLUNZEN, F. et al. Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. **Nature**, v. 413, p. 814-821, 2001.

SCHWARZ, F. V.; PERRETEN, V.; TEUBER, M. Sequence of the 5 kb conjugative multiresistance plasmid pRE25 from *Enterococcus faecalis* RE25. **Plasmid**, v. 46, p. 170-187, 2001.

SESA. Secretaria de Estado da Saúde do Paraná. **Levantamento do uso e comercialização de medicamentos veterinários em frangos de corte no estado do Paraná**. Curitiba, SESA/ISEP, 2005. 25p.

SHANKAR, N. et al. Role of *Enterococcus faecalis* surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 4366-4372, 2001.

SHANKAR, N.; BAGHDAYAN, A. S.; GILMORE, M. S. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. **Nature**, v. 417, p. 746-50, 2002.

SHANKAR, V. et al. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 193-200, 1999.

SHARIFI, Y. et al. Virulence and antimicrobial resistance in enterococci isolated from urinary tract infections. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 3, p. 197-201, 2013.

SHIPP, G. M.; DICKSON, J. S. A longitudinal study of the establishment and proliferation of *Enterococcus* on a dairy farm. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, p. 425-430, 2012.

SILVA, N. S. et al. Identification of temporal *clusters* and risk factors of bacteremia by nosocomial vancomycin-resistant enterococci. **American Journal of Infection Control**, v. 42, p. 389-392, 2014.

SINGH, K. V. et al. Fsr-independent production of protease(s) may explain the lack of attenuation of an *Enterococcus faecalis* fsr mutant versus a gelE-sprE mutant in induction of endocarditis. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 4888-4894, 2005.

SINGH, K. V. et al. Generation and testing of mutants of *Enterococcus faecalis* in a mouse peritonitis model. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 178, p. 1416-1420, 1998.

SINGH, K. V. et al. Importance of the collagen adhesin Ace in pathogenesis and protection against *Enterococcus faecalis* experimental endocarditis. **PloS Pathogens**, v. 6, p. 1-13, 2010.

SOARES, R. O. et al. Correlation between biofilm formation and gelE, esp, and agg genes in *Enterococcus* spp. clinical isolates. **Virulence**, v. 5, p. 634-637, 2014.

SOMILY, A. M. et al. Molecular epidemiology of vancomycin resistant enterococci in a tertiary care hospital in Saudi Arabia. **Microbial Pathogenesis**, v. 97, p. 79-83, 2016.

SOOD, S.; MALHOTRA, M. B. K.; KAPIL, A. Enterococcal infections e antimicrobial resistance. **Indian Journal of Medical Research**, v. 129, p. 111-121, 2008.

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

STEPAN, R. M. et al. Molecular and comparative analysis of *Salmonella enterica* Senftenberg from humans and animals using PFGE, MLST and NARMS. **BMC Microbiology**, v. 11, p. 1-9, 2011.

STRATEVA, T. et al. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates collected in Bulgaria. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 20, p. 127-133, 2016.

SUSSMUTH, S. D. et al. Aggregation substance promotes adherence, phagocytosis and intracellular survival of *Enterococcus faecalis* within human macrophages and suppresses respiratory burst. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 4900-4906, 2000.

TALEBI, M. et al. Isolation and biochemical fingerprinting of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from meat, chicken and cheese. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 8, p. 1-5, 2015.

TANIMOTO, K.; IKE Y. Complete nucleotide sequencing and analysis of the 65-kb highly conjugative *Enterococcus faecium* plasmid pMG1: Identification of the transfer-related region and the minimum region required for replication. **FEMS Microbiology Letters**, v. 288, p. 186-95, 2008.

TANNOCK, G. W.; COOK, G. Enterococci as members of the intestinal microflora of humans. In: GILMORE, M. S. et al. (Eds.). **The Enterococci: Pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance and infection control**. Washington: ASM Press, 2002. p. 101-132.

THAKER, M.; SPANOGIANNOPOULOS, P.; WRIGHT, G. D. The tetracycline resistome. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, p. 419-431. 2010.

THURLOW, L. R. et al. Gelatinase contributes to the pathogenesis of endocarditis caused by *Enterococcus faecalis*. **Infection and Immunity**, v. 78, p. 4936-4943, 2010.

TOLEDO-ARANA, A. et al. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 4538-4545, 2001.

TREMBLAY, C. L. et al. Multiple-antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from cecal contents in broiler chicken and turkey flocks slaughtered in Canada and plasmid colocalization of *tetO* and *ermB* genes. **Journal of Food Protection**, v. 10, p. 1639-1648, 2011.

UPADHYAYA, G. P. M. et al. Comparative study among clinical and commensal isolates of *Enterococcus faecalis* for the presence of esp gene and biofilm production. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 5, p. 365-369, 2011.

UPADHYAYA, G. P. M.; UMAPATHY, B. L.; RAVIKUMAR, K. L. Comparative study for the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, hemolysin and biofilm among clinical and commensal isolates of *Enterococcus faecalis*. **Journal of Laboratory Physicians**, v. 2, p. 100-104, 2010.

UPADHYAYA, P. M.; RAVIKUMAR, K. L.; UMAPATHY, B. L. Review of virulence factors of enterococci: An emerging nosocomial pathogen. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 27, p. 301-305, 2009.

VALENZUELA, A. S. et al. 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.

VAN TYNE, D.; MARTIN, M. J.; GILMORE, M. S. Structure, function, and biology of the *Enterococcus faecalis* cytolysin. **Toxins**, v. 5, p. 859-911, 2013.

VANKERCKHOVEN, V. et al. Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among european hospital isolates of *Enterococcus faecium*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 4473-4479, 2004.

VERGIS, E. N. et al. Association between the presence of enterococcal virulence factors gelatinase, haemolysin and enterococcal surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, p. 570-575, 2002.

WANG, J. T. et al. High rates of multidrug resistance in *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* isolated from inpatients and outpatients in Taiwan. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 75, p. 406-411, 2013.

WANG, Q. Y.; LI, R. H.; SHANG, X. H. Urinary tract infection caused by *Enterococcus* isolates: aetiology and antimicrobial resistance patterns. **Journal of Chemotherapy**, v. 27, p. 117-119, 2015.

WELLS, C. L. et al. Inducible expression of *Enterococcus faecalis* aggregation substance surface protein facilitates bacterial internalization by cultured enterocytes. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 7190-7194, 2000.

WENG, P. L. et al. High genetic diversity of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* clinical isolates by pulsed-field gel electrophoresis and multilocus sequence typing from a hospital in Malaysia. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-6, 2013.

WERNER, G.; KLARE, I.; WITTE, W. Association between quinupristin/dalfopristin resistance in glycopeptides-resistant *Enterococcus faecium* and the use of additives in animal feed. **European Journal Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v. 17, p. 401-402, 1998.

WHALEY, D. N. et al. Gelatin agar medium for detecting gelatinase production by anaerobic bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 16, p. 224-229, 1982.

WHO. World Health Organization. **Critically important antimicrobials for human medicine: Categorization for the development of risk management strategies to contain antimicrobial resistance due to non-human antimicrobial use**. Geneva: WHO, 2007. 34p.

WHO. World Health Organization. **Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective in Europe**. Copenhagen: WHO, 2011. 88p.

WHO. World Health Organization. **The evolving threat of antimicrobial resistance: Options for action**. Geneva: WHO, 2012. 125p.

WHO 2015. World Health Organization. **Antibiotic resistance**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/en/>>. Acesso 2 out. 2016.

WILCKS, A.; ANDERSEN, S. R.; LICHT, T. R. Characterization of transferable tetracycline resistance genes in *Enterococcus faecalis* isolated from food. **FEMS Microbiology Letters**, v. 243, p. 15-19, 2005.

WILLEMS, R. J. L. et al. Population biology of Gram-positive pathogens: high-risk clones for dissemination of antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, p. 872-900, 2011.

WU, Z.; WRIGHT, G. D.; WALSH, C. T. Overexpression, purification and characterization of VanX, a D-, D-dipeptidase which is essential for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147. **Biochemistry**, v. 34, p. 2455-2463, 1995.

XAVIER, D. B.; BERNAL, F. E. M.; ALMEIDA, R. T. Prevalência de enterococos isolados de frangos caipiras em diferentes regiões do Distrito Federal. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, p. 1550-1553, 2008.

YASUFUKU, T. Mechanisms of and risk factors for fluoroquinolone resistance in clinical *Enterococcus faecalis* isolates from patients with urinary tract infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, p. 3912-3916, 2011.

YILMAZ, E. S. Prevalence, antimicrobial resistance and virulence traits in enterococci from food of animal origin in Turkey. **Food Science and Technology**, v. 66, p. 20-26, 2016.

ZENG, J.; TENG, F.; MURRAY, B. E. Gelatinase is important for translocation of *Enterococcus faecalis* across polarized human enterocyte-like T84 cells. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 1606-1612, 2005.

ZOU, L. K. et al. Erythromycin resistance and virulence genes in *Enterococcus faecalis* from swine in China. **New Microbiologica**, v. 34, p. 73-80, 2011.

ANEXO

Tabela 13 - Perfil de suscetibilidade dos *Enterococcus* spp. isolados de carnes bovina, suína e de frango, e de queijo Minas Frescal

Origem	Identificação	Gene <i>tuf</i>	Suscetibilidade aos Antimicrobianos (mm)															MOX	ERI	TIG
			AMP	C	CIP	FOS	LZD	NOR	EST	P	TE	TEC	VAN	Q/D	CN 120	LEV				
			R ≤ 16 S ≥ 17	R ≤ 12 S ≥ 18	R ≤ 15 S ≥ 21	R ≤ 12 S ≥ 16	R ≤ 20 S ≥ 23	R ≤ 12 S ≥ 17	R = 6 S ≥ 10	R ≤ 14 S ≥ 15	R ≤ 14 S ≥ 19	R ≤ 10 S ≥ 14	R ≤ 14 S ≥ 17	R ≤ 15 S ≥ 19	R = 6 S ≥ 10	R ≤ 13 S ≥ 17				
12	Queijo 1	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	22	18	16	22	23	16	14	18	18	14	17	22	16	18	S	S	S
13	Queijo 1	<i>Enterococcus faecium</i>	+	26	22	20	22	22	18	18	26	20	14	17	18	22	22	NT	NT	NT
15	Queijo 1	<i>Enterococcus</i> spp.	+	30	28	23	19	28	23	22	28	28	16	20	18	22	22	NT	NT	NT
16	Queijo 1	<i>Enterococcus faecium</i>	+	24	24	24	20	26	22	18	24	24	16	20	16	20	22	NT	NT	NT
17	Queijo 1	<i>Enterococcus faecium</i>	+	24	24	24	18	24	22	20	24	20	16	20	20	18	22	S	I	S
18	Queijo 1	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	18	22	18	22	22	16	18	20	16	17	20	16	20	22	NT	NT	NT
19	Queijo 1	<i>Enterococcus</i> spp.	+	28	22	20	22	24	16	20	26	16	18	20	18	20	22	NT	NT	NT
20	Queijo 1	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	26	18	21	22	25	12	16	18	24	15	17	20	18	18	S	S	S
22	Queijo 1	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	26	20	22	20	28	16	6	22	10	16	17	12	20	22	S	R	S
23	Queijo 1	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	25	22	22	20	28	20	6	22	8	16	17	6	18	22	S	R	S
24	Queijo 1	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	28	22	22	24	25	16	6	23	8	14	18	10	20	20	S	R	S
25	Queijo 1	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	26	23	24	23	28	15	6	22	8	18	17	12	20	20	S	R	S
26	Queijo 1	<i>Enterococcus</i> spp.	+	26	23	20	22	26	18	16	20	24	18	18	20	16	18	NT	NT	NT
27	Queijo 1	<i>Enterococcus faecium</i>	+	30	24	24	16	28	22	20	30	26	14	20	18	24	24	NT	NT	NT
28	Queijo 1	<i>Enterococcus durans</i>	+	24	20	21	18	23	17	20	24	20	14	18	18	24	14	I	I	S
30	Queijo 1	<i>Enterococcus durans</i>	+	26	20	22	22	23	20	20	26	24	16	18	20	24	20	S	S	S
31	Queijo 1	<i>Enterococcus durans</i>	+	28	20	20	18	20	18	20	28	22	14	18	20	24	18	NT	NT	NT
32	Queijo 1	<i>Enterococcus durans</i>	+	26	24	23	18	23	20	20	26	22	14	18	18	20	16	S	I	S
33	Queijo 1	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	18	14	25	20	24	19	6	18	8	14	17	12	20	20	S	I	S
34	Queijo 1	<i>Enterococcus durans</i>	+	24	24	24	18	24	17	6	26	24	14	18	12	18	20	S	I	S
35	Queijo 1	<i>Enterococcus durans</i>	+	28	22	22	22	23	20	20	30	24	14	18	20	22	18	I	S	S
36	Queijo 1	<i>Enterococcus durans</i>	+	26	24	20	22	24	18	20	28	22	14	18	20	24	18	NT	NT	NT
37	Queijo 1	<i>Enterococcus durans</i>	+	30	26	22	22	26	20	22	30	26	18	20	18	22	16	S	I	S
38	Queijo 1	<i>Enterococcus faecium</i>	+	26	22	22	22	18	20	26	22	14	18	20	24	18	22	NT	NT	NT
39	Queijo 1	<i>Enterococcus faecium</i>	+	32	28	26	22	30	24	22	32	26	18	20	22	18	22	S	I	S
40	Queijo 1	<i>Enterococcus</i> spp.	+	24	24	14	20	26	12	20	26	24	16	20	18	24	14	NT	NT	NT

Continuação Tabela 13...

Origem	Identificação	Gene tuf	Suscetibilidade aos Antimicrobianos (mm)															MOX	ERI	TIG
			AMP	C	CIP	FOS	LZD	NOR	EST	P	TE	TEC	VAN	Q/D	CN 120	LEV				
			R ≤ 16 S ≥ 17	R ≤ 12 S ≥ 18	R ≤ 15 S ≥ 21	R ≤ 12 S ≥ 16	R ≤ 20 S ≥ 23	R ≤ 12 S ≥ 17	R = 6 S ≥ 10	R ≤ 14 S ≥ 15	R ≤ 14 S ≥ 19	R ≤ 10 S ≥ 14	R ≤ 14 S ≥ 17	R ≤ 15 S ≥ 19	R = 6 S ≥ 10	R ≤ 13 S ≥ 17				
41	Queijo 1	<i>Enterococcus durans</i>	+	22	24	24	16	24	20	18	18	26	18	20	20	26	14	NT	NT	NT
42	Queijo 1	<i>Enterococcus</i> spp.	+	20	22	26	18	26	22	18	20	24	18	20	16	20	24	S	R	S
50	Queijo 1	<i>Enterococcus durans</i>	+	24	20	14	18	14	12	18	20	24	14	18	18	20	18	NT	NT	NT
51	Queijo 2	<i>Enterococcus faecium</i>	+	28	26	22	22	24	18	18	30	26	18	22	14	20	6	S	S	S
52	Queijo 2	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	24	22	22	20	24	19	24	22	24	16	18	18	16	16	NT	NT	NT
53	Queijo 2	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	22	22	18	20	22	18	14	22	20	16	16	16	16	16	NT	NT	NT
54	Queijo 2	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	24	22	24	20	23	22	20	15	22	14	17	10	16	6	S	S	S
55	Queijo 2	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	24	22	23	20	22	18	14	20	24	14	18	18	16	20	S	I	S
56	Queijo 2	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	18	20	18	20	22	16	12	18	24	16	18	16	12	12	S	I	S
57	Queijo 2	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	24	24	20	22	22	18	16	22	24	17	18	18	18	18	S	I	S
58	Queijo 2	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	24	20	20	20	24	16	14	20	24	16	18	14	6	6	S	I	S
59	Queijo 2	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	36	22	30	42	34	32	34	6	18	20	20	16	18	NT	NT	NT	
72	Frango 1	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	24	10	22	22	22	18	16	20	6	14	18	6	20	6	S	S	S
94	Suína 1	<i>Enterococcus</i> spp.	+	26	24	20	26	26	18	18	20	6	18	20	16	20	16	NT	NT	NT
95	Suína 1	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	26	24	18	24	26	16	22	18	6	18	18	12	18	18	NT	NT	NT
96	Suína 1	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	26	22	25	26	28	18	20	20	6	18	18	14	16	18	S	S	S
100	Suína 1	<i>Enterococcus</i> spp.	+	26	24	22	24	24	20	20	24	8	18	20	14	24	20	S	S	S
115	Bovina 1	<i>Enterococcus</i> spp.	+	24	26	24	18	30	20	20	24	26	22	24	30	30	28	S	S	S
116	Bovina 1	<i>Enterococcus</i> spp.	+	24	26	24	18	24	18	20	24	30	20	24	22	30	18	S	S	S
120	Queijo 3	<i>Enterococcus faecium</i>	+	28	22	22	20	28	22	26	30	26	18	22	22	28	18	NT	NT	NT
121	Queijo 3	<i>Enterococcus faecium</i>	+	26	24	24	22	26	18	24	26	24	16	18	22	26	14	S	I	S
122	Queijo 3	<i>Enterococcus faecium</i>	+	28	26	26	18	28	18	26	24	30	16	20	12	24	16	S	I	S
123	Queijo 3	<i>Enterococcus durans</i>	+	26	24	23	22	24	20	26	26	22	18	20	22	24	18	S	S	S
131	Suína 2	<i>Enterococcus</i> spp.	+	26	24	14	18	34	14	18	26	6	20	18	22	24	16	NT	NT	NT
132	Suína 2	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	26	20	20	14	32	16	18	24	6	20	20	28	24	20	S	S	S
159	Bovina 2	<i>Enterococcus</i> spp.	+	20	22	22	20	26	14	16	24	16	16	10	14	20	NT	NT	NT	
160	Bovina 2	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	22	22	25	20	24	14	12	24	16	18	12	14	20	S	S	S	
161	Bovina 2	<i>Enterococcus</i> spp.	+	24	26	22	22	28	18	14	20	26	18	10	16	20	NT	NT	NT	
162	Bovina 2	<i>Enterococcus</i> spp.	+	22	24	22	22	26	14	14	20	26	18	10	14	22	NT	NT	NT	

Continuação Tabela 13...

			Suscetibilidade aos Antimicrobianos (mm)																	
Origem	Identificação	Gene tuf	AMP	C	CIP	FOS	LZD	NOR	EST	P	TE	TEC	VAN	Q/D	CN 120	LEV	MOX	ERI	TIG	
			R ≤ 16	R ≤ 12	R ≤ 15	R ≤ 12	R ≤ 20	R ≤ 12	R = 6	R ≤ 14	R ≤ 14	R ≤ 10	R ≤ 14	R ≤ 15	R = 6	R ≤ 13				
			S ≥ 17	S ≥ 18	S ≥ 21	S ≥ 16	S ≥ 23	S ≥ 17	S ≥ 10	S ≥ 15	S ≥ 19	S ≥ 14	S ≥ 17	S ≥ 19	S ≥ 10	S ≥ 17				
163	Bovina 2	<i>Enterococcus</i> spp.	+	20	22	18	20	26	14	14	18	24	18	16	14	16	NT	NT	NT	
164	Bovina 2	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	20	22	20	20	24	16	14	20	18	22	12	14	16	S	S	S	
185	Suína 3	<i>Enterococcus</i> spp.	+	40	30	30	30	34	20	26	40	6	26	28	24	24	NT	NT	NT	
186	Suína 3	<i>Enterococcus</i> spp.	+	40	30	22	34	36	16	30	40	6	26	30	NT	30	20	NT	NT	
187	Suína 3	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	34	38	26	10	40	23	6	38	6	32	30	NT	22	24	S	I	S
188	Suína 3	<i>Enterococcus</i> spp.	+	36	30	26	28	30	22	22	40	6	24	24	NT	22	26	NT	NT	NT
189	Suína 3	<i>Enterococcus</i> spp.	+	26	26	24	24	28	23	22	24	6	14	20	NT	24	24	S	S	S
192	Frango 2	<i>Enterococcus</i> spp.	+	30	26	30	16	38	20	28	26	12	30	30	NT	34	28	NT	NT	NT
195	Frango 2	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	28	26	15	24	30	10	24	24	6	20	20	NT	26	20	I	R	S
196	Frango 2	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	26	24	22	26	28	19	12	22	6	18	18	NT	22	22	S	R	S
197	Frango 2	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	28	26	24	28	32	21	6	24	12	20	20	NT	24	24	S	R	S
202	Frango 3	<i>Enterococcus</i> spp.	+	28	32	24	14	36	22	22	28	36	30	30	NT	26	26	S	S	S
207	Frango 4	<i>Enterococcus faecium</i>	+	40	24	24	26	30	22	24	42	14	30	30	NT	26	24	NT	NT	NT
208	Frango 4	<i>Enterococcus</i> spp.	+	32	26	24	22	36	25	24	40	24	24	24	NT	18	20	S	S	S
211	Bovina 3	<i>Enterococcus faecium</i>	+	24	20	12	14	30	10	16	16	26	20	20	NT	24	16	R	R	S
212	Bovina 3	<i>Enterococcus faecium</i>	+	25	26	16	18	28	12	22	18	26	20	24	NT	24	18	I	I	S
213	Bovina 3	<i>Enterococcus faecium</i>	+	22	28	18	14	26	16	20	12	26	20	24	NT	22	18	S	I	S
214	Bovina 3	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	28	26	18	18	30	14	22	24	26	20	22	NT	24	18	S	I	S
215	Bovina 3	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	30	28	14	6	28	14	22	26	6	16	18	NT	24	16	NT	NT	NT
216	Bovina 3	<i>Enterococcus</i> spp.	+	16	28	18	16	28	24	16	22	8	18	18	NT	18	18	NT	NT	NT
219	Bovina 3	<i>Enterococcus</i> spp.	+	18	24	24	14	30	23	22	22	22	20	18	NT	24	20	S	S	S
221	Frango 5	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	18	22	24	14	26	24	20	20	6	18	18	NT	20	20	S	R	S
222	Bovina 6	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	20	8	23	18	28	10	6	18	6	16	18	NT	22	18	S	R	S
223	Bovina 6	<i>Enterococcus</i> spp.	+	22	8	24	18	26	10	6	18	6	18	NT	20	18	S	R	S	
224	Bovina 6	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	21	6	24	6	26	14	6	16	6	14	18	NT	24	16	S	R	S
225	Bovina 6	<i>Enterococcus</i> spp.	+	22	8	25	22	28	10	6	18	6	18	NT	20	18	S	R	S	
226	Bovina 6	<i>Enterococcus</i> spp.	+	20	8	20	20	26	23	6	18	6	18	18	NT	22	22	NT	NT	NT
227	Bovina 6	<i>Enterococcus</i> spp.	+	24	8	17	24	28	8	6	20	6	18	18	NT	24	22	S	R	S
228	Bovina 6	<i>Enterococcus</i> spp.	+	22	8	22	22	28	14	6	18	6	18	18	NT	22	20	NT	NT	NT

Continuação Tabela 13...

Origem	Identificação	Gene tuf	Suscetibilidade aos Antimicrobianos (mm)															MOX	ERI	TIG
			AMP	C	CIP	FOS	LZD	NOR	EST	P	TE	TEC	VAN	Q/D	CN 120	LEV				
			R ≤ 16 S ≥ 17	R ≤ 12 S ≥ 18	R ≤ 15 S ≥ 21	R ≤ 12 S ≥ 16	R ≤ 20 S ≥ 23	R ≤ 12 S ≥ 17	R = 6 S ≥ 10	R ≤ 14 S ≥ 15	R ≤ 14 S ≥ 19	R ≤ 10 S ≥ 14	R ≤ 14 S ≥ 17	R ≤ 15 S ≥ 19	R = 6 S ≥ 10	R ≤ 13 S ≥ 17				
229	Bovina 6	<i>Enterococcus</i> spp.	+	24	8	22	22	26	14	6	20	6	18	18	NT	22	20	S	R	S
230	Frango 6	<i>Enterococcus</i> spp.	+	22	22	6	22	30	12	6	24	6	18	20	NT	6	6	R	R	S
239	Frango 7	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	25	8	31	24	32	22	6	22	6	20	25	NT	36	31	S	R	S
240	Bovina 12	<i>Enterococcus</i> spp.	+	30	20	18	14	24	20	18	24	26	24	24	NT	24	14	NT	NT	NT
241	Bovina 12	<i>Enterococcus</i> spp.	+	24	18	18	16	24	20	14	24	20	24	26	NT	20	18	NT	NT	NT
242	Bovina 12	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	31	25	28	6	30	20	25	37	6	25	24	NT	32	22	S	S	S
243	Bovina 12	<i>Enterococcus</i> spp.	+	24	18	23	20	30	22	18	24	24	30	26	NT	20	14	S	S	S
248	Frango 16	<i>Enterococcus</i> spp.	+	12	30	18	20	36	12	24	14	18	20	24	NT	18	18	NT	NT	NT
252	Frango 16	<i>Enterococcus</i> spp.	+	16	18	14	16	24	16	14	14	18	14	18	NT	16	14	NT	NT	NT
255	Bovino 13	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	18	28	18	18	36	24	22	18	6	20	22	NT	24	24	NT	NT	NT
265	Frango 17	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	18	22	18	14	20	22	18	16	22	16	16	NT	18	20	NT	NT	NT
270	Suino 10	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	24	28	26	18	30	24	26	24	30	22	24	NT	30	24	NT	NT	NT
281	Bovino 15	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	20	20	16	10	24	18	18	18	26	18	18	NT	26	20	NT	NT	NT
297	Queijo 5	<i>Enterococcus</i> spp.	+	26	24	18	6	30	24	24	30	30	18	20	NT	24	12	NT	NT	NT
299	Queijo 5	<i>Enterococcus</i> spp.	+	26	26	18	6	30	12	24	30	30	18	20	NT	24	24	NT	NT	NT
300	Queijo 5	<i>Enterococcus</i> spp.	+	28	30	24	6	30	30	30	36	26	20	20	NT	30	30	NT	NT	NT
302	Bovino 16	<i>Enterococcus</i> spp.	+	18	30	20	18	24	20	24	24	14	20	22	NT	24	18	NT	NT	NT
303	Bovino 16	<i>Enterococcus</i> spp.	+	18	24	26	20	30	24	24	20	6	24	24	NT	22	26	NT	NT	NT

AMP: Ampicilina; C: Cloranfenicol; CIP: Ciprofloxacina; FOS: Fosfomicina; LZD: Linezolida; NOR: Norfloxacina; EST: Estreptomicina; P: Penicilina; TE: Tetraciclina; TEC: Teicoplanina; VAN: Vancomicina; Q/D: Quinupristina-Dalfopristina; CN: Gentamicina; LEV: Levofloxacina; MOX: Moxifloxacina; ERI: Eritromicina; TIG: Tigeciclina; NT: Não Testado; R: Resistente; I: Resistência Intermediária; S: Sensível.

Tabela 14 - Ocorrência de fatores de virulência em *Enterococcus* spp. isolados de carnes bovina, suína e de frango, e de queijo Minas Frescal

	Origem	Identificação	Fatores de virulência						
			<i>as</i>	<i>ace</i>	<i>gel</i>	<i>hyl</i>	<i>cyl</i>	<i>efaA</i>	<i>esp</i>
12	Queijo 1	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+			+	+
13	Queijo 1	<i>Enterococcus faecium</i>							
15	Queijo 1	<i>Enterococcus</i> spp.							
16	Queijo 1	<i>Enterococcus faecium</i>							
17	Queijo 1	<i>Enterococcus faecium</i>							
18	Queijo 1	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+			+	+
19	Queijo 1	<i>Enterococcus</i> spp.			+			+	+
20	Queijo 1	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+			+	+
22	Queijo 1	<i>Enterococcus faecalis</i>		+	+		+	+	
23	Queijo 1	<i>Enterococcus faecalis</i>		+	+		+	+	
24	Queijo 1	<i>Enterococcus faecalis</i>		+	+		+	+	
25	Queijo 1	<i>Enterococcus faecalis</i>		+	+		+	+	
26	Queijo 1	<i>Enterococcus</i> spp.		+	+			+	+
27	Queijo 1	<i>Enterococcus faecium</i>							
28	Queijo 1	<i>Enterococcus durans</i>							
30	Queijo 1	<i>Enterococcus durans</i>							
31	Queijo 1	<i>Enterococcus durans</i>							
32	Queijo 1	<i>Enterococcus durans</i>							
33	Queijo 1	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+		+	+	
34	Queijo 1	<i>Enterococcus durans</i>	+	+	+		+	+	
35	Queijo 1	<i>Enterococcus durans</i>							
36	Queijo 1	<i>Enterococcus durans</i>							
37	Queijo 1	<i>Enterococcus durans</i>							
38	Queijo 1	<i>Enterococcus faecium</i>			+		+		
39	Queijo 1	<i>Enterococcus faecium</i>							
40	Queijo 1	<i>Enterococcus</i> spp.							
41	Queijo 1	<i>Enterococcus durans</i>							
42	Queijo 1	<i>Enterococcus</i> spp.							
50	Queijo 1	<i>Enterococcus durans</i>							
51	Queijo 2	<i>Enterococcus faecium</i>							
52	Queijo 2	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+			+	+

Continuação Tabela 14...

	Origem	Identificação	Fatores de virulência						
			<i>as</i>	<i>ace</i>	<i>gel</i>	<i>hyl</i>	<i>cyl</i>	<i>efaA</i>	<i>esp</i>
53	Queijo 2	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+			+	+
54	Queijo 2	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+			+	+
55	Queijo 2	<i>Enterococcus faecalis</i>		+	+			+	+
56	Queijo 2	<i>Enterococcus faecalis</i>		+				+	+
57	Queijo 2	<i>Enterococcus faecalis</i>			+			+	+
58	Queijo 2	<i>Enterococcus faecalis</i>			+			+	+
59	Queijo 2	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+			+	+
72	Frango 1	<i>Enterococcus faecalis</i>			+			+	
94	Suína 1	<i>Enterococcus</i> spp.		+				+	
95	Suína 1	<i>Enterococcus faecalis</i>		+				+	
96	Suína 1	<i>Enterococcus faecalis</i>		+				+	
100	Suína 1	<i>Enterococcus</i> spp.	+					+	
115	Bovina 1	<i>Enterococcus</i> spp.							
116	Bovina 1	<i>Enterococcus</i> spp.							
120	Queijo 3	<i>Enterococcus faecium</i>							
121	Queijo 3	<i>Enterococcus faecium</i>							
122	Queijo 3	<i>Enterococcus faecium</i>							
123	Queijo 3	<i>Enterococcus durans</i>							
131	Suína 2	<i>Enterococcus</i> spp.							
132	Suína 2	<i>Enterococcus faecalis</i>							
159	Bovina 2	<i>Enterococcus</i> spp.	+	+	+		+	+	
160	Bovina 2	<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+			+	
161	Bovina 2	<i>Enterococcus</i> spp.	+	+	+		+	+	
162	Bovina 2	<i>Enterococcus</i> spp.	+	+	+		+	+	
163	Bovina 2	<i>Enterococcus</i> spp.	+	+	+		+	+	
164	Bovina 2	<i>Enterococcus faecalis</i>		+	+			+	
185	Suína 3	<i>Enterococcus</i> spp.							
186	Suína 3	<i>Enterococcus</i> spp.							
187	Suína 3	<i>Enterococcus faecalis</i>							
188	Suína 3	<i>Enterococcus</i> spp.							
189	Suína 3	<i>Enterococcus</i> spp.						+	

Continuação Tabela 14...

	Origem	Identificação	Fatores de virulência						
			<i>as</i>	<i>ace</i>	<i>gel</i>	<i>hyl</i>	<i>cyl</i>	<i>efaA</i>	<i>esp</i>
192	Frango 2	<i>Enterococcus</i> spp.							
195	Frango 2	<i>Enterococcus faecalis</i>		+	+			+	
196	Frango 2	<i>Enterococcus faecalis</i>		+	+			+	
197	Frango 2	<i>Enterococcus faecalis</i>		+	+			+	
202	Frango 3	<i>Enterococcus</i> spp.							
207	Frango 4	<i>Enterococcus faecium</i>							
208	Frango 4	<i>Enterococcus</i> spp.							
211	Bovina 3	<i>Enterococcus faecium</i>							
212	Bovina 3	<i>Enterococcus faecium</i>							
213	Bovina 3	<i>Enterococcus faecium</i>							
214	Bovina 3	<i>Enterococcus faecalis</i>							
215	Bovina 3	<i>Enterococcus faecalis</i>							
216	Bovina 3	<i>Enterococcus</i> spp.							
219	Bovina 3	<i>Enterococcus</i> spp.							
221	Frango 5	<i>Enterococcus faecalis</i>			+			+	
222	Bovina 6	<i>Enterococcus faecalis</i>		+	+			+	
223	Bovina 6	<i>Enterococcus</i> spp.		+	+			+	
224	Bovina 6	<i>Enterococcus faecalis</i>		+	+			+	
225	Bovina 6	<i>Enterococcus</i> spp.		+	+			+	
226	Bovina 6	<i>Enterococcus</i> spp.		+	+			+	
227	Bovina 6	<i>Enterococcus</i> spp.		+	+			+	
228	Bovina 6	<i>Enterococcus</i> spp.		+	+			+	
229	Bovina 6	<i>Enterococcus</i> spp.		+	+			+	
230	Frango 6	<i>Enterococcus</i> spp.			+			+	
239	Frango 7	<i>Enterococcus faecalis</i>			+			+	
240	Bovina 12	<i>Enterococcus</i> spp.							
241	Bovina 12	<i>Enterococcus</i> spp.							
242	Bovina 12	<i>Enterococcus faecalis</i>							
243	Bovina 12	<i>Enterococcus</i> spp.							
248	Frango 16	<i>Enterococcus</i> spp.							
252	Frango 16	<i>Enterococcus</i> spp.			+			+	

Continuação Tabela 14...

	Origem	Identificação	Fatores de virulência						
			<i>as</i>	<i>ace</i>	<i>gelE</i>	<i>hyl</i>	<i>cylA</i>	<i>efaA</i>	<i>esp</i>
255	Bovino 13	<i>Enterococcus faecalis</i>							
265	Frango 17	<i>Enterococcus faecalis</i>		+	+			+	
270	Suino 10	<i>Enterococcus faecalis</i>						+	
281	Bovino 15	<i>Enterococcus faecalis</i>						+	
297	Queijo 5	<i>Enterococcus</i> spp.							
299	Queijo 5	<i>Enterococcus</i> spp.							
300	Queijo 5	<i>Enterococcus</i> spp.							
302	Bovino 16	<i>Enterococcus</i> spp.							
303	Bovino 16	<i>Enterococcus</i> spp.							

as: Substância de agregação; *ace*: Adesina de colágeno; *gelE*: Gelatinase; *hyl*: hialuronidase; *cylA*: Citolisina; *efaA*: Antígeno A; *esp*: Proteína de superfície de *Enterococcus*.

Tabela 15 - Perfil de suscetibilidade e ocorrência de fatores de virulência em *Enterococcus* spp. de origem clínica

	Microorganismos	Material	Data de isolamento	AMP	CIP	EST	CN	LZD	P	TEC	VAN	as	ace	cyl	efaA	esp	gel	hyl
IC 1	<i>Enterococcus faecium</i>	SANGUE	02/04/2012	R	R	R	S	S	R	R	R							
IC 2	<i>Enterococcus faecalis</i>	URINA	03/04/2012	S	R	R	R	S	R	S	S	+	+		+		+	
IC 3	<i>Enterococcus faecalis</i>	URINA	15/05/2012	S	S	S	S	S	S	S	S			+	+			
IC 4	<i>Enterococcus faecium</i>	URINA	15/05/2012	R	R	S	R	S	R	S	S							
IC 5	<i>Enterococcus faecalis</i>	URINA	16/05/2012	S	R	S	S	S	R	R	R		+		+		+	
IC 6	<i>Enterococcus faecium</i>	URINA	17/05/2012	R	R	S	S	S	R	S	S							
IC 7	<i>Enterococcus faecium</i>	URINA	19/05/2012	R	R	S	S	S	R	S	S							
IC 8	<i>Enterococcus faecium</i>	URINA	20/05/2012	R	R	S	S	S	R	S	S							
IC 15	<i>Enterococcus faecalis</i>	URINA	25/09/2012	S	R	R	R	S	S	S	S		+		+		+	
IC 16	<i>Enterococcus faecium</i>	URINA	26/09/2012	R	R	S	S	S	R	R	R							
IC 19	<i>Enterococcus faecalis</i>	URINA	30/09/2012	S	R	R	S	S	R	S	S		+	+	+		+	
IC 20	<i>Enterococcus faecium</i>	URINA	01/10/2012	R	R	S	S	S	R	S	S							
IC 21	<i>Enterococcus faecalis</i>	URINA	01/10/2012	S	S	R	S	S	S	S	S		+		+		+	
IC 22	<i>Enterococcus faecalis</i>	URINA	02/10/2012	S	S	R	S	S	S	S	S		+		+		+	
IC 25	<i>Enterococcus faecium</i>	URINA	09/10/2012	R	R	S	S	S	R	R	R							
IC 26	<i>Enterococcus faecalis</i>	SANGUE	10/10/2012	S	S	S	S	S	S	S	S		+		+		+	
IC 27	<i>Enterococcus faecium</i>	URINA	13/10/2012	S	S	S	S	S	S	S	S							
IC 29	<i>Enterococcus faecium</i>	URINA	09/11/2012	R	R	S	S	S	R	R	R							
IC 30	<i>Enterococcus faecium</i>	URINA	14/11/2012	R	R	S	S	S	R	S	S							
IC 32	<i>Enterococcus faecium</i>	URINA	14/11/2012	R	R	R	S	S	R	S	S							
IC 33	<i>Enterococcus faecalis</i>	URINA	14/11/2012	S	S	S	S	S	S	S	S		+		+		+	
IC 34	<i>Enterococcus faecium</i>	URINA	06/01/2013	R	R	R	S	S	R	R	R							
IC 36	<i>Enterococcus faecium</i>	URINA	08/01/2013	R	R	R	S	S	R	R	R							
IC 37	<i>Enterococcus faecalis</i>	URINA	08/01/2013	S	S	R	S	S	S	S	S		+		+		+	
IC 39	<i>Enterococcus faecium</i>	SANGUE	08/01/2013	R	R	S	S	S	R	R	R							
IC 40	<i>Enterococcus faecalis</i>	URINA	09/01/2013	S	S	S	S	S	S	S	S	+	+		+			
IC 43	<i>Enterococcus faecalis</i>	URINA	12/01/2013	S	S	R	S	S	S	S	S		+		+		+	
IC 45	<i>Enterococcus faecalis</i>	URINA	14/01/2013	S	S	R	S	S	R	S	S		+		+		+	
IC 46	<i>Enterococcus faecalis</i>	URINA	14/01/2013	S	S	S	S	S	S	S	S		+		+		+	
IC 47	<i>Enterococcus faecalis</i>	URINA	14/01/2013	S	R	R	S	S	S	S	S		+	+	+	+	+	
IC 48	<i>Enterococcus faecalis</i>	URINA	14/01/2013	S	R	S	S	S	S	S	S		+		+	+	+	

Continuação Tabela 15...

	Microrganismos	Material	Data de isolamento	AMP	CIP	EST	CN	LZD	P	TEC	VAN	as	ace	cyl	efaA	esp	gel	hyl
IC 49	<i>Enterococcus faecium</i>	URINA	15/01/2013	R	R	S	S	S	R	S	S							
IC 52	<i>Enterococcus faecalis</i>	URINA	21/01/2013	S	S	S	S	S	S	S	S		+		+	+	+	
IC 53	<i>Enterococcus faecalis</i>	URINA	25/01/2013	S	S	S	S	S	S	S	S		+		+	+	+	
IC 54	<i>Enterococcus faecium</i>	URINA	25/01/2013	S	S	S	S	S	S	S	S		+		+		+	
IC 55	<i>Enterococcus faecalis</i>	URINA	25/01/2013	S	S	S	S	S	S	S	S		+		+	+		
IC 56	<i>Enterococcus faecium</i>	SANGUE	26/01/2013	R	R	S	S	S	R	R	R							
IC 58	<i>Enterococcus faecalis</i>	URINA	28/01/2013	S	R	S	S	S	S	S	S		+		+		+	
IC 59	<i>Enterococcus faecium</i>	URINA	31/01/2013	R	R	S	S	S	R	S	S		+					
IC 60	<i>Enterococcus faecium</i>	SANGUE	01/02/2013	R	R	S	S	S	R	R	R		+					
IC 64	<i>Enterococcus faecium</i>	URINA	04/02/2013	R	R	R	S	S	R	S	S		+					
IC 65	<i>Enterococcus faecalis</i>	URINA	04/02/2013	S	R	S	S	S	S	S	S	+	+	+	+			
IC 66	<i>Enterococcus faecium</i>	URINA	05/02/2013	R	R	S	S	S	R	R	R		+	+	+			
IC 67	<i>Enterococcus faecalis</i>	URINA	13/02/2013	S	R	R	R	S	R	S	S		+		+		+	
IC 68	<i>Enterococcus faecalis</i>	URINA	14/02/2013	S	R	R	S	S	S	S	S		+		+		+	
IC 70	<i>Enterococcus faecalis</i>	URINA	16/02/2013	S	R	R	R	S	R	S	S		+		+		+	

AMP: Ampicilina; CIP: Ciprofloxacina; ESP: Estreptomicina; CN: Gentamicina; LZD: Linezolida; P: Penicilina; TEC: Teicoplanina; VAN: Vancomicina; R: Resistente; S: Sensível; as: Substância de agregação; ace: Adesina de colágeno; cylA: Citolisina; efaA: Antígeno A; esp: Proteína de superfície de *Enterococcus*; gelE: Gelatinase; hyl: hialuronidase.