
Isolamento, identificação e detecção de resistência aos antimicrobianos em *Enterococcus* spp. isolados de carnes bovinas e suínas

Isolation, identification and detection of antimicrobial resistance in Enterococcus spp. isolates from beef and pork

Naiady Konno Madela¹, Simone Quintão Silva², Mara Corrêa Lelles Nogueira², Tatiana Elias Colombo^{1,2}

¹Curso de Biomedicina da Universidade Paulista, São José do Rio Preto-SP, Brasil; ²Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto-SP, Brasil.

Resumo

Objetivo – Isolar, identificar e detectar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em cepas de *Enterococcus* spp. encontradas em amostras de carnes bovinas e suínas comercializadas em São José do Rio Preto-SP. **Métodos** – A partir de três amostras de carnes bovinas e quatro de suínos, sete porções de 25 gramas de carnes foram homogeneizadas com água peptonada tamponada e incubadas por 24h/37°C. Alíquotas dessa suspensão foram inoculadas em ágar bile esculina (HIMEDIA®). Colônias típicas foram submetidas ao teste de catalase e coloração de Gram. O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos foi determinado por disco-difusão de acordo com *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI. **Resultados** – Dentre os 63 isolados, 30 (47,5%) isolados foram identificados como *Enterococcus* spp. (14 de carne bovina e 16 de suína) que apresentaram resistência à tetraciclina, quinupristina/dalfopristina, norfloxacin, dentre outros. Além disso, foram detectadas resistências intermediárias. **Conclusão** – Foram isolados e identificados *Enterococcus* spp. multiresistentes em amostras de carnes bovinas e suínas comercializadas em São José do Rio Preto.

Descritores: Resistência; Antimicrobianos; *Enterococcus*

Abstract

Objective – To isolate, identify and detect the profile of antimicrobial susceptibility in strains of *Enterococcus* spp. found in samples of beef and pork in São José do Rio Preto-SP. **Methods** – From three samples of beef and four samples of pork, seven portions of 25 grams of meat were homogenized with buffered peptone water and incubated for 24h/37°C. Samples of this suspension were inoculated in bile esculin agar (HIMEDIA®). Typical colonies were subjected to catalase test and Gram staining. The profile of antimicrobial susceptibility was determined by disk diffusion according to *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI. **Results** – Among the 63 isolates, 30 (47,5%) isolates were identified as *Enterococcus* spp. (14 of beef and 16 of swine) the highest resistance to tetracycline, quinupristin/dalfopristin and norfloxacin. Also showed some resistance intermediate. **Conclusions** – Were isolated 30 *Enterococcus* spp. multiresistant in samples of beef and pork sold in São José do Rio Preto.

Descriptors: Resistance; Antimicrobial; *Enterococcus*

Introdução

Enterococcus são componentes da microbiota intestinal de animais e humanos, podendo também ser detectados em plantas, solo, água e alimentos, provavelmente devido à disseminação de conteúdo fecal e à sua tolerância a condições ambientais adversas^{1,2}.

Até recentemente, os *Enterococcus* eram considerados comensais não patogênicos, ocasionalmente associados a infecções do trato urinário e endocardite³⁻⁴. Entretanto, nos últimos anos, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus 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 mortalidade⁵⁻⁶.

Os *Enterococcus* não são considerados agentes de infecções gastrointestinais transmitidas por alimentos. Entretanto, podem colonizar a mucosa intestinal humana após o consumo de carnes contaminadas⁷. A maioria das infecções por *Enterococcus* tem origem endógena, ocorrendo após a translocação por meio do epitélio intestinal⁸. Assim, a presença de resistência aos antimicrobianos nestas cepas dificulta o tratamento⁹. Devido

ao intenso uso de agentes antimicrobianos no manejo dos animais de produção, *Enterococcus* isolados destes animais e de carnes têm apresentado resistência a uma grande variedade de antimicrobianos de importância para o tratamento de infecções em humanos^{6-7,10}.

No Brasil há poucos relatos sobre a ocorrência de *Enterococcus* em alimentos de origem animal¹¹. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi isolar e identificar *Enterococcus* spp. presentes em amostras de carnes bovinas e suínas, assim como determinar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos dos mesmos.

Métodos

A pesquisa utilizou uma abordagem indutiva com experimentos empíricos controlados laboratorialmente e foi conduzida nos Laboratórios de Microbiologia e de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP).

No campo técnico, a presença de *Enterococcus* spp. foi investigada em sete amostras de carnes, sendo três bovinas e quatro suínas, adquiridas no mercado local em São José do Rio Preto, SP.

Uma porção de 25 gramas de carne, referente a cada

amostra coletada, foi homogeneizada com água peptonada tamponada e incubada por 24h/37°C. Alíquotas dessa suspensão foram inoculadas, por esfregaço (swab), em ágar bile esculina (HIMEDIA®). Critérios fenotípicos (colônias arredondadas, pequenas e enegrecidas) foram utilizados para seleção prévia de colônias típicas para identificação de *Enterococcus* spp. Além disso, foi utilizada a análise morfológica e tintorial pela coloração Gram e teste de produção de catalase, para identificação do gênero *Enterococcus*¹². Foi utilizado também meio cromogênico (CPS ID 3 *Biomerieux*) para identificação presumida de *Enterococcus* spp., pois essa bactéria nesse ágar fica com uma coloração azul turquesa.

De acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI* (2013)¹³, o perfil de suscetibilidade das amostras foi determinado por meio de testes de disco difusão em ágar Müeller-Hinton com os antimicrobianos ampicilina (10µg), ciprofloxacina (5µg), cloranfenicol (30µg), estreptomicina (300µg), fosfomicina (200µg), gentamicina (120µg), levofloxacina (5µg), linezolida (30µg), norfloxacina (10µg), penicilina (10 units), quinupristina/dalfopristina (15µg), teicoplanina (30µg), tetraciclina (30µg) e vancomicina (30µg). Foi utilizado como controle a linhagem de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Resultados

Foram analisadas sete amostras de carnes, quatro de suínos e três de bovinos, adquiridas em diferentes mercados de São José do Rio Preto-SP. Foram isolados trinta cepas de *Enterococcus* spp., 14 de carne bovina e 16 de suína.

Entre os 14 isolados de carnes bovinas, sete (50,0%) foram resistentes à quinupristina/dalfopristina, quatro (28,5%) à norfloxacina, três (21,4%) fosfomicina, dois (14,2%) à tetraciclina, levofloxacina e a linezolida, um

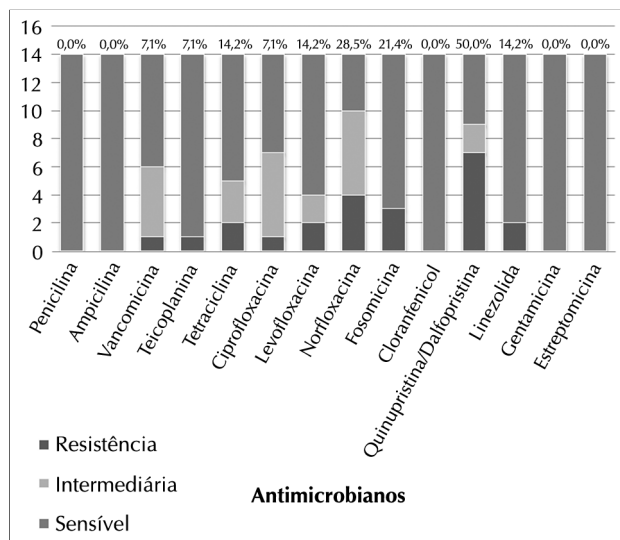


Gráfico 1. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em *Enterococcus* spp. isolados de carnes bovinas. As porcentagens representam a taxa de resistência ao antimicrobiano correspondente

Fonte: Dados da pesquisa, 2013

(7,1%) à vancomicina, teicoplanina, ciprofloxacina. Além disso, foram detectadas taxas de resistências intermediárias à ciprofloxacina e norfloxacina (seis isolados), vancomicina (cinco isolados), tetraciclina (três isolados), levofloxacina e quinupristina/dalfopristina (um isolado). Todos os isolados foram sensíveis à penicilina, ampicilina, gentamicina, cloranfenicol e estreptomicina.

Com relação aos 16 isolados de carnes suínas, 16 (100,0%) apresentaram resistência à tetraciclina, seis (37,5%) à fosfomicina e à linezolida, um (6,2%) à ciprofloxacina e à estreptomicina. Além disso, foram detectadas taxas de resistências intermediárias à ciprofloxacina (sete isolados), norfloxacina (seis), levofloxacina e quinupristina/dalfopristina (dois), vancomicina e fosfomicina (um). Todos os isolados foram sensíveis à penicilina, ampicilina, gentamicina, cloranfenicol, teicoplanina e à linezolida.

Discussão

Enterococcus isolados de diversas espécies de animais, como bovinos e suínos, podem apresentar resistência a uma grande variedade de antimicrobianos de importância para o tratamento de infecções em humanos, além disso, a presença de *Enterococcus* resistentes em humanos e na comunidade pode atuar como reservatório para infecções hospitalares.

Assim como o estudo realizado por Gomes *et al.* (2008)⁷, o presente estudo apresentou isolados de *Enterococcus* multirresistentes em carnes bovinas e suínas, fato que pode ser explicado devido ao intenso uso de antimicrobianos no manejo dos animais de produção⁶⁻⁷.

Todos os isolados de carnes suínas apresentaram resistência à tetraciclina, resultado similar relatado por Campos *et al.* (2013)¹⁴, que observou 100,0% de resistência a este antimicrobiano em *Enterococcus faecalis*

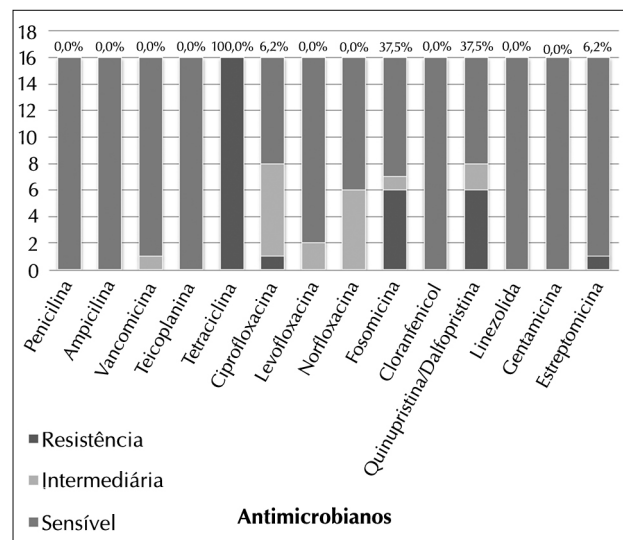


Gráfico 2. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em *Enterococcus* spp. isolados de carnes suínas. As porcentagens representam a taxa de resistência ao antimicrobiano correspondente

Fonte: Dados da pesquisa, 2013

isolados em carcaças de frango resfriadas e congeladas, comercializadas no Distrito Federal. A resistência à tetraciclina é considerada um dos fenótipos de resistência adquirida presentes em *Enterococcus* isolados de alimento; importante ressaltar que esta droga é muito utilizada na terapia humana, na medicina veterinária e na agricultura¹⁵.

Neste estudo foi constatado que isolados de bovinos e suínos apresentaram resistência à quinupristina/dalfopristina, prevalência também observada em isolados de suínos e frangos por Hwang *et al.* (2010)¹⁶; fato preocupante, pois essa droga foi recentemente introduzida na prática clínica como uma opção ao tratamento de *Enterococcus* resistente à vancomicina e a outros antimicrobianos¹⁷.

Enterococcus isolados de bovinos foram sensíveis aos aminoglicosídeos e às penicilinas. Os isolados de suínos também apresentaram sensibilidade às penicilinas, e apenas um foi resistente à estreptomina. Esses dados são semelhantes aos resultados encontrados por Dias (2009)¹⁷, que não detectou resistência à gentamicina e encontrou apenas 6% de resistência à estreptomina em *Enterococcus* spp. isolados de suínos em Portugal. Esse resultado é significativo, uma vez que essas drogas são utilizadas em sinergia com as penicilinas (principalmente ampicilina) para o tratamento de infecções em humanos¹⁸.

Os *Enterococcus* isolados de suínos apresentaram maior resistência à fosfomicina do que os de bovinos, resultado também encontrado por Schwaiger *et al.* (2010)¹⁹ em isolados de ovos e carne de frango. Esse resultado é importante, uma vez que essa droga tem sido utilizada no tratamento de infecção urinária²⁰.

Assim como o estudo realizado por Klare *et al.* (2003)²¹, foi observada resistência às quinolonas apenas entre os isolados de bovinos, achado que pode estar relacionado ao uso de uma quinolona como promotor de crescimento durante a produção animal.

Todos os isolados foram sensíveis ao cloranfenicol, teicoplanina e à linezolida. Sendo assim, essas drogas poderiam ser utilizadas como uma opção de tratamento contra as infecções causadas por esses isolados.

Conclusão

Bactérias entéricas multirresistentes em animais é uma preocupação de saúde pública, devido à transferência de resistência do microrganismo aos seres humanos por meio da cadeia alimentar. Com isso, devido à presença em carnes suínas e bovinas, de cepas de *Enterococcus* resistentes aos antimicrobianos, a utilização destes deve ser realizada de uma forma muito racional, tanto em terapia humana como animal, com o objetivo de evitar aumento e disseminação da resistência antimicrobiana.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, que plantou em mim um sonho que hoje se materializa;

Aos meus pais pelo carinho, dedicação e incentivo;

Agradeço aos meus orientadores Prof^a Ms Tatiana Elias Colombo e Prof. Givaldo César Borzillo e as minhas co-orientadoras Prof^a Dr^a Mara Corrêa Lelles Nogueira e Ms Simone Quintão Silva pelos ensinamentos e dedicação.

Referências

1. Messi P, Guerrieri E, Niederhausen S, Sabia C, Bondi M. Vancomycin-resistant *enterococci* (VRE) in meat and environmental samples. *Int J Food Microbiol.* 2006;107(2):218-22.
2. Valenzuela AS, Omar NB, Abriouel H, López RL, Ortega H, Cañamero MM, *et al.* Risk factors in *enterococci* isolated from foods in Morocco: determination of antimicrobial resistance and incidence of virulence traits. *Food Chem Toxicol.* 2008;46(8):2648-52.
3. Amyes SGB. *Enterococci* and *streptococci*. *Int J Antimicrob Agents.* 2007;29(3):S43-52.
4. Munita JM, Arias CA, Murray BE. Enterococcal endocarditis: can we win the war? *Curr Infect Dis Resp.* 2012;14(4):339-49.
5. Hammerum AM, Lester CH, Heuer OE. Antimicrobial-resistant enterococci in animals and meat: a human health hazard? *Foodborne Pathog Dis.* 2010;7(10):1137-46.
6. Garcia Migura L, Sanchez Valenzuela AJ, Jensen LB. Presence of glycopeptide-encoding plasmids in enterococcal isolates from food and humans in Denmark. *Foodborne Pathog Dis.* 2011;8(11):1191-7.
7. Gomes BC, Esteves CT, Palazzo IC, Darini AL, Felis GE, Sechi LA, *et al.* Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. *Food Microbiol.* 2008;25(5):668-75.
8. Wells CL, Jechorek RP, Erlandsen SL. Evidence for the translocation of *Enterococcus faecalis* across the mouse intestinal tract. *J Infect Dis.* 1990;162(1):82-90.
9. Aarestrup FM, Agerso Y, Gerner-Smidt P, Madsen M, Jensen LB. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2000;37(2):127-37.
10. Riboldi GP, Frazzon J, Azevedo PA, Frazzon APG. Antimicrobial resistance profile of *Enterococcus* spp. isolated from food in southern Brazil. *Braz J Microbiol.* 2009;40(1):125-8.
11. Campos ACFB, Souza NR, Silva PHC, Santana AP. Resistência antimicrobiana em *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* isolados de carcaças de frangos. *Pesq Vet Bras.* 2013;33(5):575-80.
12. Domig KJ, Mayer HK, Kneifel W. Methods used for the isolation, enumeration, characterization and identification of *Enterococcus* spp. 2. Pheno-and genotypic criteria. *Int J Food Microbiol.* 2003;88:165-88.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing. Twent third informational supplement. CLSI doc M100-S23. Wayne, PA: 2013.
14. Campos ACFB, Souza NR, Silva PHC, Santana AP. Resistência antimicrobiana em *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* isolados de carcaças de frangos. *Pesq Vet Bras.* 2013;33(5):575-80.
15. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2001;65(2):232-60.

16. Hwang IY, Ku HO, Lim SK, Lee KJ, Park CK, Jung GS, *et al.* Distribution of streptogramin resistance genes and genetic relatedness among quinupristin/dalfopristin-resistant *Enterococcus faecium* recovered from pigs and chickens in Korea. *Res Vet Sci.* 2010;89(1):1-4.
17. Dias AIGSF. Estudo da susceptibilidade a antibióticos em *Enterococcus* spp. oriundos do ambiente de suiniculturas Portuguesas (monografia). Porto: Universidade Fernando Pessoa; 2009.
18. Riboldi GP. Perfil de resistência antimicrobiana e análise genotípica de *Enterococcus* spp. isolados de alimentos em Porto Alegre, RS (dissertação). Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2007.
19. Schwaiger K, Schmied EMV, Bauer J. Comparative analysis on antibiotic resistance characteristics of *listeria* spp. and *Enterococcus* spp. isolated from laying hens and eggs in conventional and organic keeping Systems in Bavaria, Germany. *Zoonoses Public Health.* 2010;57(3):171-80.
20. Heintz BH, Halilovic J, Christensen CL. Vancomycin-resistant enterococcal urinary tract infections. *Pharmacotherapy.* 2010; 30(11):1136-49.
21. Klare I, Konstabel C, Badstubner D, Werner G, Witte W. Occurrence and spread of antibiotic resistences in *Enterococcus faecium*. *Int J Food Microbiol.* 2003;88(2-3):269-90.

Endereço para correspondência:

Tatiana Elias Colombo
Av. Juscelino K. de Oliveira, s/nº – Jd. Tarraf II
São José do Rio Preto-SP, CEP 15092-415
Brasil

E-mail: taty_ec@hotmail.com

Recebido em 20 de janeiro de 2014
Aceito em 29 de maio de 2017