



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**PREVALÊNCIA E VARIABILIDADE GENÉTICA DE  
ENTEROCOCOS COM RESISTÊNCIA À VANCOMICINA  
ISOLADOS DE FRANGOS CAPIRAS DE REGIÕES DO  
DISTRITO FEDERAL**

**DIEGO BATISTA XAVIER**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**BRASÍLIA - DF  
FEVEREIRO/2007**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**PREVALÊNCIA E VARIABILIDADE GENÉTICA DE  
ENTEROCOCOS COM RESISTÊNCIA À VANCOMICINA  
ISOLADOS DE FRANGOS CAIPIRAS DE REGIÕES DO  
DISTRITO FEDERAL**

**DIEGO BATISTA XAVIER**

**ORIENTADOR: PROF. DR. FRANCISCO ERNESTO MORENO BERNAL**  
**CO-ORIENTADOR: PROF. DR. RICARDO TITZE DE ALMEIDA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**PUBLICAÇÃO: 245 / 2007**

**BRASÍLIA - DF**  
**FEVEREIRO/2007**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**PREVALÊNCIA E VARIABILIDADE GENÉTICA DE  
ENTEROCOCOS RESISTENTES À VANCOMICINA  
ISOLADOS DE FRANGOS CAIPIRAS DE REGIÕES DO  
DISTRITO FEDERAL**

DIEGO BATISTA XAVIER

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS NA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO DE DISCIPLINAS DE PRODUÇÃO ANIMAL.

---

RICARDO TITZE DE ALMEIDA, DR. (UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA)  
(CO-ORIENTADOR) CPF: 506910749-68 E-mail: [titze@unb.br](mailto:titze@unb.br)

APROVADA POR:

---

FRANCISCO ERNESTO MORENO BERNAL, DR. (UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA)  
(ORIENTADOR) CPF:000810096-90 E-mail: [framobe@unb.br](mailto:framobe@unb.br)

---

ANGELA PATRÍCIA, DRa. (UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA)  
(EXAMINADOR INTERNO) CPF: 760817291-68 E-mail: [patvet@unb.br](mailto:patvet@unb.br)

---

PEDRO ALVES D'AZEVEDO, DR. (FUNDAÇÃO FACULDADE FEDERAL DE  
CIÊNCIAS MÉDICAS DE PORTO ALEGRE)  
(EXAMINADOR EXTERNO) CPF:409040320-00 E-mail:  
[pedro\\_dazevedo@yahoo.com.br](mailto:pedro_dazevedo@yahoo.com.br)

BRASÍLIA/DF, 07 de Fevereiro de 2007

## FICHA CATALOGRÁFICA

Xavier, Diego Batista

Prevalência e variabilidade genética de enterococos com resistência à vancomicina isolados de frangos caipiras de regiões do Distrito Federal. / Diego Batista Xavier; orientação de Francisco Ernesto Moreno Bernal. – Brasília, 2007.

33 p. : il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2007.

1. *Enterococcus*. 2. Resistência à vancomicina. 3. Frango Caipira.  
I. Bernal, F. E. M., II. Doutor.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Xavier, D. B.. **Prevalência e variabilidade genética de enterococos com resistência à vancomicina isolados de frangos caipiras de regiões do Distrito Federal**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2007, 33 p. Dissertação de Mestrado.

## CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Diego Batista Xavier

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO: Prevalência e variabilidade genética de enterococos com resistência à vancomicina isolados de frangos caipiras de regiões do Distrito Federal.

GRAU: Mestre ANO: 2007

**É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.**

---

Diego Batista Xavier  
CPF 709593661-72  
SHIN QI 12 Conjunto 06 Casa 14  
CEP 71525-260 - Distrito Federal - Brasil  
Telefone: (61) 33688695  
e-mail: diegobxavier@gmail.com

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por estar sempre ao meu lado, e por ter me dado esta oportunidade.

Aos meus pais, Geferson e Angela, a quem devo tudo o que sou e conquistei nestes anos.

À minha namorada Christiane e sua família, pela força, carinho e compreensão, por estarem presentes em cada etapa da minha formação.

Aos meus irmãos Rafael e Danilo pelo apoio dado nas horas difíceis e por compartilhar os bons momentos.

Aos verdadeiros amigos que me acompanharam durante esta jornada, que sempre estiveram ao meu lado nos bons e maus momentos, e em especial aos mais presentes.

Aos professores que dedicaram seu tempo ao ensino e pesquisa, em especial ao Francisco Ernesto Moreno Bernal, meu orientador, e ao Ricardo Titze de Almeida, meu co-orientador, que além de ótimos professores se tornaram bons amigos.

À toda equipe do Laboratório de Microbiologia Molecular e Biotecnologia: Suzana Vieira, Ângela Ramos e Alexandra Greuel, que compartilharam esse período de pesquisa, pela paciência, disposição, atenção e oportunidade de aprendizagem a mim oferecida.

Aos criadores de frango caipira do Entorno do Distrito Federal e à EMATER pela colaboração na coleta de amostras.

Aos laboratórios de apoio: Microbiologia Clínica Veterinária - UnB, Laboratório Especial de Microbiologia Clínica – UNIFESP, Laboratório de Biologia Molecular – UnB, e aos seus coordenadores e funcionários, em especial à Simone Perecmanis, Hudson de Holanda, Nara Rúbia, Pedro d’Azevedo, Antonio Pignatari e Fernanda Marques.

## RESUMO

Xavier, D. B., PREVALÊNCIA E VARIABILIDADE GENÉTICA DE ENTEROCOCOS COM RESISTÊNCIA À VANCOMICINA ISOLADOS DE FRANGOS CAIPIRAS DE REGIÕES DO DISTRITO FEDERAL. Pesquisa realizada como requisito para conclusão do curso de mestrado em Ciências Agrárias, Produção Animal – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF. Enterococos resistentes à vancomicina (ERV) são patógenos emergentes em infecções hospitalares. Essas bactérias também colonizam animais saudáveis, que podem ser considerados reservatórios da bactéria e de genes de resistência. O presente estudo foi o primeiro realizado com objetivo de examinar a presença de ERV em fazendas de frangos caipiras no Brasil. A investigação foi conduzida em propriedades que utilizavam o sistema de produção não intensivo, criando os frangos sem antibióticos ou outros promotores de crescimento. Todas as fazendas localizavam-se no Distrito Federal, na região Centro-Oeste do Brasil. Foi coletado um total de 200 swabs cloacais, de 40 propriedades, amostradas de 8 regiões geográficas diferentes. Os swabs foram inoculados em meio BBL *Enterococcosel Broth* suplementado com 8 µg/mL de vancomicina. Após incubação, as amostras positivas foram plaqueadas em ágar sangue. Colônias típicas de enterococos, com cocos Gram positivos e catalase negativos foram submetidas à PCR multiplex, para identificação das espécies *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*, e dos genes de resistência à vancomicina, *vanA* e *vanB*. No atual estudo não foram isolados enterococos contendo os genes *vanA* ou *vanB*. Trinta e sete isolados carregaram o genes de resistência *vanC*. Desses os genes *vanC1* e *vanC2/3* foram presentes respectivamente em 26 (13,0%) e 11 (5,5%) isolados. Foi isolado somente um microrganismo da espécie *E. faecalis*. A análise de variabilidade dos isolados, realizada por eletroforese em gel de campo pulsado, mostrou que as espécies *E. casseliflavus* e *E. gallinarum* formam populações microbianas com diferenças em sua estrutura genética, sendo que a última pode formar genogrupos de linhagens geneticamente relacionados. Concluiu-se, então, que frangos caipiras não são reservatórios de enterococos *vanA* e *vanB*, e que as espécies *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* apresentam diferenças de variabilidade genética.

**Palavras-chave:** *Enterococcus*, resistência à vancomicina, frango caipira.

## ABSTRACT

Xavier, D. B., PREVALENCE AND GENETIC VARIABILITY OF VANCOMYCIN RESISTANT ENTEROCOCCI ISOLATED FROM POULTRY RAISED ON NON-INTENSIVE PRODUCTION FARMS FROM BRAZIL. Research made as a partial requisite to obtain the Mester of Science in Animal Production. Title of the Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF. Vancomycin-resistant enterococci (VRE) are emerging pathogens of hospital-acquired infections. Epidemiological studies found animals, like poultry, as non-human reservoirs of the bacteria and vancomycin resistant genes. Here we present the first surveillance study aimed at examining wheter VRE colonize poultry raised on non intensive farms from Brazil. We selected poultry farms that employ non-intensive production techniques and raise the animals without antibiotic growth promoter. The sampled farms (n=40) were from the Federal District which is located in the central-west geographic region of Brazil. We collected 200 cloacal swabs from eight different regions. The swabs were inoculated in the BBL *Enterococcus* *Broth* supplemented with 8 µg/mL vancomycin. After incubation, the positive samples were plated onto blood-sheep agar plates. Typical enterococcal colonies, were submitted to the multiplex PCR reaction. We used a carefully adjusted combination of primers to identify the enterococcal species *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*, and the vancomycin-resistance genes *vanA* and *vanB*. In the present surveillance study, *vanA*- and *vanB*-containing enterococci were absent in all the 200 samples studied. Thirty-seven isolates harbored the VanC-type genes. From these, the *vanC1* and the *vanC2/3* genes were identified, respectively, in 26 (13.0%) and 11 (5.5%) isolates. We found only one *E. faecalis* isolate. The genetic variability analyses carried by pulsed field gel eletrophoresis, showed differences in the genetic structure of the *E. casseliflavus* and *E. gallinarum* microbial populations. In conclusion, we showed that poultry raised in non intensive production farms are not reservoirs of *vanA*- and *vanB*-containing enterococci. In addition, we found remarkable differences in the genetic variability between *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* species.

**Key words:** *Enterococcus*, vancomycin resistance, poultry

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1</b> – Relações epidemiológicas entre diferentes reservatórios de enterococos.....	05
<b>FIGURA 2</b> – Distribuição geográfica das regiões do Distrito Federal analisadas.....	11
<b>FIGURA 3</b> – Meio seletivo para enterococos.....	14
<b>FIGURA 4</b> – Colônias características de enterococos.....	14
<b>FIGURA 5</b> – Eletroforese em gel de agarose 1%.....	16
<b>FIGURA 6</b> – Diferenças na prevalência de enterococos em regiões do DF.....	17
<b>FIGURA 7</b> – Eletroforese em gel de campo pulsado – <i>Enterococcus casseliflavus</i> ..	19
<b>FIGURA 8</b> – Eletroforese em gel de campo pulsado – <i>Enterococcus gallinarum</i> .....	20

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> – Resultados do isolamento seletivo por região do DF.....	15
<b>TABELA 2</b> – Prevalência de espécies de enterococos por região amostrada.....	17
<b>TABELA 3</b> – Áreas geográficas das amostras de <i>E. casseliflavus</i> analisadas.....	20
<b>TABELA 4</b> – Áreas geográficas das amostras de <i>E. gallinarum</i> analisadas.....	21

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	01
2. OBJETIVOS .....	02
2.1. Objetivo geral.....	02
2.2. Objetivos específicos.....	02
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	02
3.1. Microbiologia dos Enterococos .....	03
3.2. Animais como reservatórios de ERVs.....	04
3.3. Reservatórios humanos e importância médica dos ERV no Brasil.....	05
3.4. Resistência Microbiana dos Enterococos .....	06
3.5. Identificação de espécies por PCR multiplex .....	07
3.6. Genotipagem de enterococos .....	07
3.7. Produção de frango caipira no Brasil .....	08
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	11
4.1. Indivíduos, coleta de amostras e isolamento seletivo .....	11
4.2. Reação de polimerização em cadeia – PCR multiplex .....	12
4.3. Eletroforese em gel de campo pulsado .....	13
5. RESULTADOS .....	13
5.1. Isolamento seletivo .....	13
5.2. Identificação de espécies e genes de resistência por PCR multiplex .....	15
5.3. Eletroforese em gel de campo pulsado .....	18
6. DISCUSSÃO .....	21
7. CONCLUSÃO .....	25
8. REFERÊNCIAS.....	26
9. ANEXOS.....	32