

1. Introdução

Enterococos são patógenos oportunistas reconhecidos como causa importante de infecções hospitalares, destacando-se as endocardites e as infecções do trato urinário e de feridas cirúrgicas. A terapêutica destas infecções tem se mostrado limitada, uma vez que os enterococos vêm adquirindo resistência a vários antimicrobianos, como a ampicilina, os aminoglicosídeos e, notadamente, os glicopetídios vancomicina e teicoplanina – neste caso os denominados “enterococos resistentes à vancomicina” ou ERVs (Bonten et al., 2001; Rice et al., 2003).

Do ponto de vista epidemiológico, os animais de produção, incluindo os frangos, podem ser reservatórios de ERVs (Mc Donald et al., 1997; Títze-de-Almeida & Palermo-Neto, 2005). Alguns estudos sobre a presença de enterococos em frangos de corte já foram realizados anteriormente em nosso país, porém não foram identificados ERVs nestes animais (Leme et al., 1996). Entretanto, Ike et al. (1999) em pesquisa realizada no Japão, identificaram ERVs em frangos importados do Brasil. Destaque-se que a presença de ERVs em frangos criados em sistemas não-intensivos, o denominado frango caipira, ainda não foi investigada em nosso país.

Relatos de outros países a respeito de ERVs em animais de produção correlacionavam essa resistência ao uso de avoparcina como promotor de crescimento na alimentação de frangos e suínos, antibiótico este com estrutura química similar à da vancomicina (Bager et al., 1997). Considerando este risco, o Brasil, assim como outros países, decidiram suspender o uso de avoparcina em frangos de corte. Estudos mostraram que a suspensão foi efetiva, ou seja, houve redução na prevalência de ERV. Porém, a bactéria ainda tem sido isolada de animais de produção em alguns países, o que mostra que o uso de antibióticos não é um pré-requisito para colonização por ERV (Borgen et al., 2000; Aarestrup et al., 2002). Pesquisas mais recentes mostraram que na Europa o ERV teve como ancestral um bacilo Gram positivo esporulado, presente no solo, que é intrinsecamente resistente aos glicopeptídios (Messi et al., 2006, Sorum et al., 2006).

Estudos de vigilância de ERVs em novos reservatórios, desta forma, são de grande relevância. Podem elucidar, por exemplo, se os frangos caipiras, criados sem antibióticos, participam da cadeia epidemiológica desta bactéria e qual a estrutura genética desta população microbiana. Os conhecimentos gerados poderão apontar aspectos relevantes para programas de contenção da resistência e para modelos de

análise de risco, no que se refere ao uso de antimicrobianos em animais de produção.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Estudar a epidemiologia dos enterococos com resistência à vancomicina isolados de frangos caipiras criados no Distrito Federal.

2.2. Objetivos específicos

- Estudar a prevalência de espécies mais freqüentes de enterococos através de um protocolo específico para isolamento e caracterização molecular;
- Avaliar os genótipos de resistência microbiana encontrados;
- Caracterizar a variabilidade genética dos enterococos com resistência à vancomicina.

3. Revisão Bibliográfica

Enterococos são bactérias comensais presentes na microbiota do homem e de outras espécies animais. Porém, podem comportar-se como agentes infecciosos, sobretudo em pacientes expostos a fatores de risco (Facklam, Carvalho & Teixeira, 2002). Apresentam resistência natural a vários antibióticos (cefalosporinas, fluoroquinolonas) e têm adquirido, também, resistência à ampicilina e aos aminoglicosídeos gentamicina e estreptomicina. A aquisição de resistência à vancomicina, no final dos anos 80, foi um grande salto evolutivo para esta bactéria (Rice, 2001). Os enterococos resistentes à vancomicina (ERVs) são patógenos oportunistas reconhecidos como causa importante de infecções hospitalares (Cetinkaya et al, 2000). Estudos mostram que essas bactérias também colonizam animais saudáveis, que são considerados reservatórios da bactéria e de seus genes de resistência (Aarestrup et al, 2002).

O papel dos animais de produção tem sido muito discutido na epidemiologia de enterococos resistentes à vancomicina. Uma das principais causas, apoiada pela

maioria dos pesquisadores, é de que o uso de antibióticos promotores de crescimento, especialmente a avoparcina, exerce pressão seletiva para o desenvolvimento de enterococos resistentes (Mc Donald et al., 1997). A retirada deste promotor, entretanto, não causou diminuição na prevalência de ERVs na totalidade dos países, o que indica que outros fatores além do antibiótico devem ser estudados (Borgen et al., 2000, Manson et al., 2004, Lim et al., 2006, Sorum et al., 2006). Além disso, ERVs foram isolados de cães e gatos não tratados com avoparcina (Van Belkun et al., 1996). Ou seja, ERVs podem colonizar indivíduos mesmo na ausência da pressão seletiva. Frangos caipiras, criados sem a utilização de antibióticos poderiam, portanto, ser reservatórios de ERVs.

3.1. Microbiologia dos Enterococos

As bactérias do gênero *Enterococcus* são classificadas como cocos Gram-positivos, podendo ser visualizados como células individuais ou arranjar-se aos pares ou em cadeias, apresentando comumente morfologia ovóide. São anaeróbios facultativos, crescem a temperaturas de 10°C a 45°C, sendo 35°C a temperatura ótima de crescimento. Crescem em meios contendo cloreto de sódio 6,5%, hidrolisam esculina na presença de 40% de sais biliares e, em sua maioria, hidrolisam a pirrolidonil- β -naftilamida (PYR). Apesar de serem catalase-negativos, podem produzir uma pseudocatalase, causando fraca efervescência no respectivo teste (Murray et al., 1990, Facklam, Carvalho & Teixeira, 2002).

As espécies do gênero *Enterococcus* podem ser identificadas por testes fenotípicos convencionais (Facklam, Carvalho & Teixeira, 2002). Além disto, diversos métodos moleculares para identificação de espécies já foram descritos, a maioria baseando-se em reações de PCR (Dutka-Malen et al., 1997, Titze-de-Almeida et al., 2004). Assim, as seguintes espécies de enterococos já foram descritas: *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. malodoratus*, *E. hirae*, *E. mundtii*, *E. raffinosus*, *E. pseudoavium*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. saccharolyticus*, *E. dispar*, *E. sulfureus*, *E. asini*, *E. villorum*, *E. haemoperoxidus*, *E. moraviensis*, *E. ratii*, *E. porcinus*, *E. pallens*, *E. gilvus*, *E. seriolicida*, *E. solitarius* (Facklam, Carvalho & Teixeira, 2002).

3.2. Animais como reservatórios de ERVs

Enterococos distribuem-se amplamente na natureza podendo ser encontrados no solo, em plantas, na água e em diversas espécies do reino animal, incluindo mamíferos, aves, répteis e insetos (Aarestrup et al, 2002). A importância dos animais na cadeia epidemiológica dos enterococos tem sido muito discutida (Fig. 1). Na Europa, verificou-se que o antibiótico avoparcina, fornecido como promotor de crescimento para melhorar o desempenho nutricional de frangos e suínos, exercia pressão seletiva para ERVs (Bager et al, 1997). Em particular, ERVs isolados de suínos foram classificados em genogrupos semelhantes daqueles que colonizam indivíduos não hospitalizados (Willems et al., 2000). O uso da avoparcina foi suspenso em vários países europeus que, em sua maioria, verificaram redução significativa da prevalência de enterococos resistentes à vancomicina nestes animais (Aarestrup et al., 2002). Na Noruega e na Nova Zelândia foi encontrada a persistência de ERVs após a suspensão do uso de avoparcina, o que implica que a pressão seletiva desse antibiótico não é um pré-requisito para a manutenção dos ERVs nas granjas de aves (Borgen et al., 2000, Manson et al., 2004). De fato animais não tratados com avoparcina, como cães e gatos, podem carrear ERVs (Van Belkum et al., 1996).

No Brasil, o antibiótico avoparcina foi utilizado como promotor de crescimento em aves por 10 anos, somente em granjas de criação intensiva. O uso deste promotor de crescimento no Brasil foi suspenso em 1998 pelo Ministério da Agricultura (Ofício circular 19/98, Ministério da Agricultura, 1998). Entretanto, poucos estudos investigaram a presença de enterococos em animais, antes e após a suspensão da avoparcina em nosso país. ERVs não foram isolados em um total de 100 amostras coletadas de uma granja de criação intensiva no estado de São Paulo em lotes que utilizavam avoparcina como promotor de crescimento (Leme et al., 2000). Porém, ERVs foram encontrados contaminando produtos de carne de frango exportados do Brasil para o Japão, o que pode indicar que este reservatório participou da cadeia epidemiológica da bactéria, conforme observado em outros países (Ike et al., 1999).

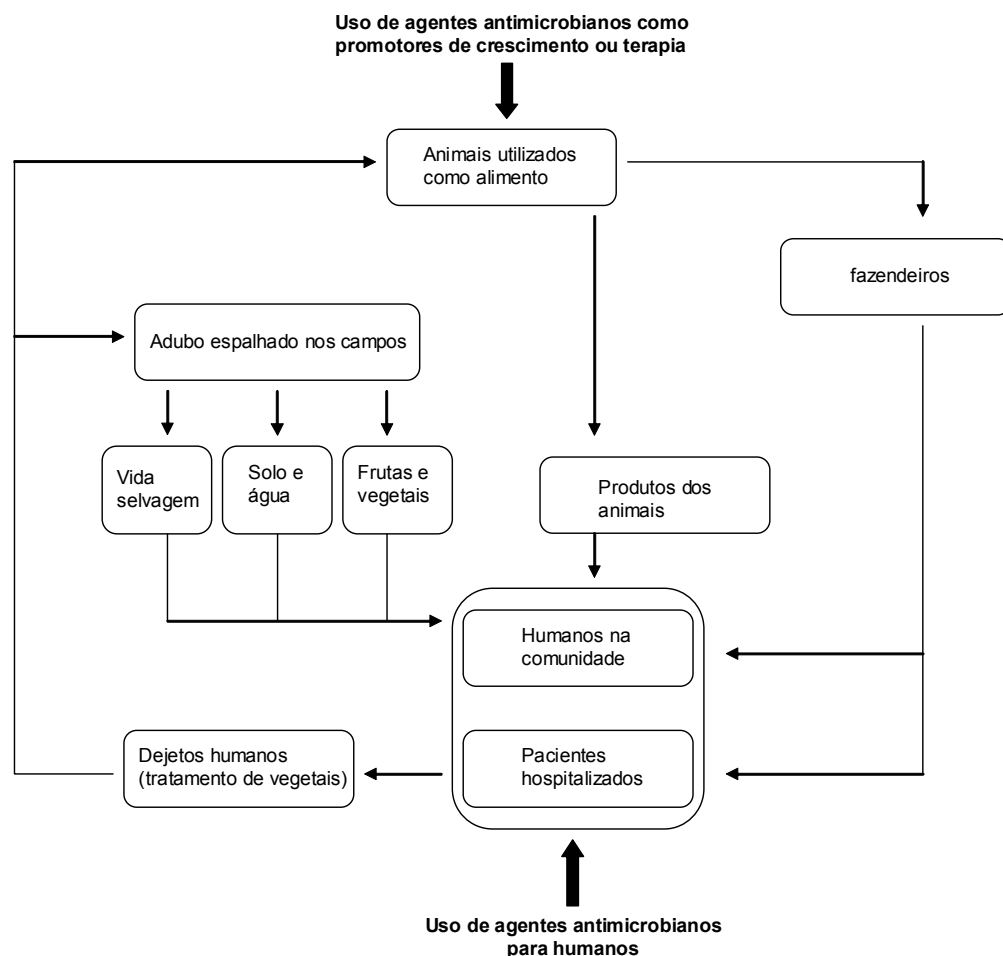


Figura 1 – Possíveis relações epidemiológicas entre diferentes reservatórios de enterococos.

3.3. Reservatórios humanos e importância médica do ERV no Brasil

Os enterococos fazem parte da microbiota normal presente no intestino do homem e de outros animais, como agente comensal, sendo *E. faecalis* e *E. faecium* as espécies mais prevalentes (Murray, 1990). Podem também causar infecções graves em pacientes de risco, por isto a denominação de patógenos oportunistas (Murray, 1990; CDC, 1993; Moellering, 1995).

Nos Estados Unidos, a grande prevalência de enterococos resistentes à vancomicina ocorre em pacientes hospitalizados, nos quais o trato gastrointestinal humano é considerado o principal reservatório (Boyce, 1995; McDonald et al., 1997; Pearl, 1999; Cetinkaya, Falk & Mayhall, 2000). No Brasil, Sader et al. (2001) verificaram que enterococos foram a oitava causa mais freqüente de septicemias (2,7%), a sétima de infecções do trato respiratório baixo (4%), a terceira de

infecções cutâneas ou de tecidos moles (8,4%) e a quinta de infecções do trato urinário (5,1%). Ocuparam, de forma geral, a oitava posição (4,0%) como agente de infecções nosocomiais, em um total de 3.728 isolados durante os anos de 1997/1998 (Rio de Janeiro, Florianópolis e São Paulo) e 1999 (Porto Alegre, Florianópolis e São Paulo).

Apesar de o primeiro isolamento ter sido de uma infecção comunitária, a colonização de indivíduos da comunidade por ERVs não é comum no Brasil (Zanella et al., 1997; Mondino et al., 2003), o que contrasta com os dados europeus. Assim, o estudo dessas bactérias em novos reservatórios, como o frango caipira, contribuiria para o entendimento da cadeia epidemiológica dos ERVs em nosso país.

3.4. Resistência Microbiana de Enterococos

Os enterococos são agentes infecciosos que podem apresentar resistência natural e adquirida a antimicrobianos. A resistência natural ocorre para vários antibióticos, incluindo as cefalosporinas, as penicilinas “antiestafilocócicas” (oxacilina), os aminoglicosídeos (em baixas concentrações), a clindamicina (também em baixas concentrações) e o trimetoprim. Resistência adquirida, por sua vez, foi descrita para antibióticos utilizados no tratamento de infecções enterocócicas, como ampicilina, gentamicina e níveis elevados de vancomicina, fato que tem representado sério problema para a terapêutica das infecções enterocócicas (Rice et al., 2003).

Investigações sobre o mecanismo de resistência de enterococos, principalmente relacionadas aos glicopeptídeos vancomicina e teicoplanina, identificaram genes específicos de resistência *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE* e *vanG*. A resistência a glicopeptídeos é devida à síntese de precursores de parede celular modificados, pelos quais a vancomicina apresenta menor afinidade (Cetinkaa, Falk & Mayhall, 2000).

Os principais fenótipos de resistência à vancomicina são VanA, VanB e VanC. O fenótipo VanA, mediado pelo gene *vanA*, exibe um alto nível de resistência à vancomicina e à teicoplanina, enquanto que VanB (gene *vanB*) é susceptível à teicoplanina. Baixo ou moderado nível de resistência à vancomicina e susceptibilidade à teicoplanina relaciona-se a enterococos com resistência intrínseca, pertencentes ao fenótipo VanC. Os genes responsáveis por este fenótipo

são *vanC1* e *vanC2/3*, normalmente identificados nas espécies *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*, respectivamente. Assim, a identificação dos genes *vanA*, *vanB*, *vanC1* e *vanC2/3* é indicativa dos respectivos fenótipos de resistência à vancomicina VanA, VanB e VanC (Dutka-Malen et al., 1997).

3.5. Identificação de espécies e de genes de resistência à vancomicina por PCR

Atualmente, estudos mostram que a técnica da reação de polimerização em cadeia (PCR) é uma forma de identificação eficiente para espécies mais frequentes de enterococos e genes de resistência à vancomicina (Dutka-Malen et al, 1997; Patel et al., 1997). Trabalhos recentes mostram métodos para identificação de espécies de interesse e de genes de resistência à vancomicina a partir de colônias de enterococos, em uma única reação, o denominado PCR multiplex (Titze-de-Almeida et al., 2004).

3.6. Genotipagem de enterococos

A tipagem de isolados microbianos permite avaliar a estrutura genética da população microbiana e a disseminação de clones entre reservatórios de interesse.

Os métodos de tipagem molecular baseiam-se na utilização de marcadores moleculares que identifiquem a variabilidade genética existente entre os microrganismos. Essa resulta primariamente de mutações que ocorrem no DNA dos indivíduos. Dessa forma, alterações mutacionais podem originar-se de erros na replicação do DNA, comumente nas substituições, inserções, deleções ou inversões de nucleotídeos, ou da atividade de *transposons* e elementos de inserção que se movem e replicam-se no genoma bacteriano. Os métodos de genotipagem devem contemplar, cada um com suas limitações, características desejáveis para o estudo da variabilidade genética, dentre elas, capacidade discriminatória, reprodutibilidade, facilidade de implementação e uso, facilidade para interpretação de resultados e rapidez na obtenção de resultados. Diversos métodos foram desenvolvidos para o estudo da variabilidade genética e genotipagem de microrganismos, incluindo enterococos, tais como PFGE (Eletroforese em Gel de Campo Pulsado), MLST (sequenciamento de multilocus), rep-PCR, ribotipagem e amplificação de fragmentos próximos de sítios de restrição raros (ADSRRS). Até o presente, o

PFGE é considerado o “padrão ouro” para análise de surtos e o MLST para estudos de epidemiologia global (Sprat, 1999; Van Belkum et al., 2001).

3.7. Produção de Frango Caipira no Brasil

O frango convencional apresenta no mercado brasileiro um baixo preço relativo, que foi fator determinante para o aumento do seu consumo nos últimos anos, substituindo outras carnes. Porém, as aves criadas confinadas em galpões fechados e com alta concentração por metro quadrado estão sujeitas a alguns problemas, principalmente intestinais. Por isso, o uso contínuo de medicamentos, como os promotores de crescimento antimicrobianos e os anticoccidianos, são práticas rotineiras na prevenção de doenças e melhoria da produtividade, reduzindo a idade de abate (Garcia et al., 2002).

Estudos têm relacionado a ocorrência de bactérias resistentes a antibióticos e quimioterápicos em animais, alimentos e seres humanos, com o uso das mesmas substâncias ou grupos semelhantes na produção animal, como promotores de crescimento antimicrobianos (DANMAP 2001). Neste aspecto, a produção de aves e suínos sem dúvida destaca-se na grande utilização dos promotores artificiais de crescimento que, na sua maioria, são antibióticos adicionados à ração desses animais.

A pressão dos mercados consumidores por alimentos mais saudáveis, com concentrações de resíduos químicos menores, fez com que o modelo de criação tradicional de frangos fosse questionado. Além desse aspecto de saúde, há também o aspecto do bem estar das aves e também da poluição ambiental produzida por esses animais (Bolis, 2001). Figueiredo et al. (2001) e Silva et al. (2003) descreveram que a produção alternativa de frangos de corte e galinhas de postura tornou-se viável para pequenos e médios produtores do Brasil, tanto para consumo doméstico, como para produção comercial, com oferta de produtos nos supermercados, açougues e feiras-livres.

A criação de aves em sistemas semi-intensivos com acesso a pasto onde consomem sementes, capins, insetos e também ração, denominados "Free Range Chicken", iniciou na Europa e nos Estados Unidos, chegando posteriormente em

nosso país. A criação alternativa de aves está se expandido amplamente em regiões do país, mesmo naquelas com altas concentrações de produção industrial (Jaenisch, 2000).

Apresentamos, a seguir, os principais sistemas de criação de frango no Brasil:

1. Sistema Industrial/Convencional ou Avicultura Industrial, utilizado em granjas de exploração comercial, altamente tecnificadas, de linhagens comerciais geneticamente selecionadas para alta taxa de crescimento e excelente eficiência alimentar, criados em sistemas intensivos segundo as normas sanitárias vigentes, sem restrições ao uso de antibióticos, anticoccidianos, promotores de crescimento, quimioterápicos e ingredientes de origem animal (Demattê Filho et al., 2003; Figueiredo et al., 2001);

2. Sistema Caipira/Colonial de produção de aves de corte, normatizado pelo ofício circular DOI/DIPOA nº 007/99 de 19/05/1999 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, onde as aves são denominadas de frango caipira, frango colonial, frango tipo caipira, frango estilo caipira, frango tipo colonial ou frango estilo colonial. Apenas linhagens específicas de crescimento lento são permitidas. As aves devem ter acesso à área externa e a alimentação do frango caipira tem que ser exclusivamente de fontes vegetais sendo proibido o uso de promotores de crescimento de qualquer tipo ou natureza, não podendo receber produtos quimioterápicos e ingredientes de origem animal na ração. A idade mínima de abate é de 85 dias. Figueiredo et al. (2001) descrevem a avicultura caipira ou colonial, como sendo o tipo de criação, em que os pintos são produzidos em incubatórios e, por via de regra, vêm vacinados contra Marek e boubá. Os frangos caipiras são alimentados com ração balanceada, complementada com pastagem, frutas, verduras, hortaliças, insetos e tubérculos, ou seja, alimentação mista, ração e pasto. As aves devem ser criadas em galpões até os vinte e cinco dias de vida para completar o empenamento, após isso, devem ser soltas a campo usando um espaçamento mínimo de três metros quadrados por ave no piquete, entre outras determinações;

3. Sistema Alternativo de produção de aves de corte de exploração intensiva ou não, sem restrição de linhagens, criados sem o uso de antibióticos, anticoccidianos,

promotores de crescimento, quimioterápicos e ingredientes de origem animal na dieta. A isenção dessas substâncias será total; se houver necessidade de uso para fins terapêuticos o lote será comercializado como convencional, implicando em perda da qualidade própria do frango alternativo (Demattê Filho et al., 2003);

4. Sistema Orgânico/Agroecológico de produção de aves de corte normatizado pela Instrução Normativa nº 7, de maio de 1999 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, onde se faz referência aos produtos obtidos pelo sistema orgânico, ecológico, biológico, biodinâmico, natural, sustentável, regenerativo e agroecológico (Demattê Filho et al., 2003 e Figueiredo et al., 2001);

5. Avicultura Nativa, conhecida como sistema nativo brasileiro, onde as galinhas se reproduzem de forma natural via choco. As aves apresentam resistência às principais doenças e quase nunca são vacinadas nem vermifugadas, recebem apenas suplementação alimentar com grãos, ração, verduras, etc. e apresentam também baixa velocidade de crescimento; os machos são abatidos após seis meses de idade com aproximadamente 1,5 kg e as fêmeas são mantidas para produção de cerca de 100 ovos/ave/ano destinados ao consumo e/ou ninhada. Os frangos da avicultura nativa produzem carcaças descarnadas e com pouca gordura. Enquadra-se nessa descrição o frango da roça, capoeira, nativo ou pé duro (Figueiredo et al., 2001).

Em 1988 foi introduzida no Brasil a linhagem de galinha caipira francesa "Label Rouge", dando o primeiro passo para o desenvolvimento da avicultura alternativa, que hoje no país representa pouco mais de 1% do mercado avícola. Seu crescimento ainda não acompanha o potencial do mercado consumidor que é cada vez mais exigente em alimentos saudáveis e de qualidade (Lana, 2001). Segundo Demattê Filho & Mendes (2001), a criação alternativa de frangos no Brasil vem crescendo desde a década de 90. O número de empresários dedicados a essa atividade está aumentando, abrangendo um leque de iniciativas baseadas em motivos ecológicos e principalmente na busca por saúde. Silva et al. (2003) confirmam que a criação alternativa de frangos tem aumentado na última década no Brasil e no mundo, tornando-se uma atividade interessante para pequenos e médios produtores rurais.

Em síntese, o frango caipira é um produto diferenciado, obtido normalmente pelo cruzamento de raças pesadas de corte com raças semi-pesadas de postura, o que o caracteriza como menos exigente e mais resistente a adversidades que o frango de corte industrial (Silva et al., 2003).

4. Material e Métodos

No presente estudo, foram coletadas amostras de frangos caipiras para isolamento seletivo de enterococos resistentes à vancomicina. A identificação das espécies e dos genes de resistência à vancomicina foi realizada por PCR e a variabilidade genética por eletroforese em gel de campo pulsado.

4.1. Indivíduos, coleta de amostras e isolamento seletivo

Foram colhidos swabs cloacais de 200 frangos caipiras. As amostras foram obtidas de 40 propriedades do Entorno do Distrito Federal, divididas nas 8 diferentes regiões: Jardim, Pad/DF, Paranoá, Sobradinho, Planaltina, Rio Preto, Taquara e São Sebastião (Fig. 2). Todos animais analisados foram escolhidos de forma aleatória, realizando-se contenção manual e coleta por swab estéril. Foram amostradas, portanto, 5 propriedades por região, e de cada propriedade colhidas 5 amostras.

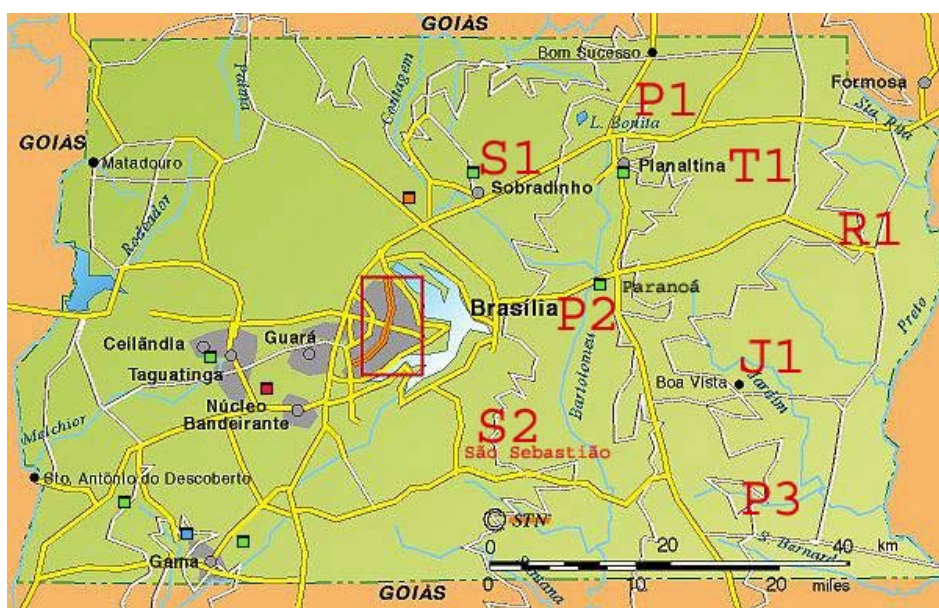


Figura 2. Distribuição geográfica das regiões do Distrito Federal analisadas. P1, Planaltina; P2, Paranoá; P3, Pad/DF; R1, Rio Preto; S1, Sobradinho; S2, São Sebastião; T1, Taquara.

As amostras foram transportadas em meio específico, *BBL transport medium*, Difco, (Becton Dickinson and Co., Sparks, MD) em recipiente resfriado. A semeadura inicial foi realizada em meio seletivo para enterococos resistentes à vancomicina, *BBL Enterococcosel broth*, Difco, (Becton Dickinson and Co., Sparks, MD) contendo vancomicina 8µg/mL. O protocolo foi modificado de Van Horn et al. (1996), que utilizava 6µg/mL de vancomicina. As amostras foram incubadas por 18 horas a 35-37°C, sendo que os meios com crescimento negativo permaneceram incubados por um período adicional de 24 horas. Para cada ensaio de isolamento, foi realizado controle de qualidade dos meios e dos testes, utilizando-se cepas previamente identificadas em coleção por testes bioquímicos e as cepas controle ATCC (American Type Culture Collection) para amostras sensíveis e resistentes à vancomicina. Foram utilizadas as seguintes: *E. faecalis* (ATCC 29212 e ATCC 775), *E. faecalis vanB* (ATCC 51299), *E. gallinarum* (ATCC 12359) e *E. faecalis vanA* (A256 – Rio de Janeiro).

O crescimento positivo foi caracterizado pelo enegrecimento do meio devido à hidrólise da esculina. As amostras positivas foram semeadas em ágar sangue de carneiro 5% para avaliação das colônias, realizando-se os testes fenotípicos presuntivos. As colônias características de enterococos, com morfologia de cocos Gram positivos e negativas para catalase, foram submetidas à PCR.

4.2. Reação de polimerização em cadeia – PCR multiplex

A reação de polimerização em cadeia - PCR multiplex foi conduzida com *primers* de oligonucleotídeos para identificação de genes das espécies de interesse, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* (*ddl*_{*Enterococcus faecalis*}, *ddl*_{*E. faecium*}, *vanC1*, *vanC2/3*, 18,0 pmol, respectivamente), e dos genes de resistência à vancomicina *vanA* e *vanB* (*vanA*, 3,0 pmol e *vanB*, 1,5 pmol). Foram adicionadas 10 colônias de enterococos à mistura de PCR contendo os primers e os seguintes reagentes: tampão de *Taq* 1X; 3mM de MgCl₂; 0,25mM de cada dNTP; e 2U de *Taq* DNA polimerase. A amplificação do PCR foi realizada em termociclador com o seguinte programa: desnaturação inicial a 94°C/5min, seguida de 30 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C/1min, anelamento a 52°C/1 min e extensão a 72°C/2 min), e uma extensão final a 72°C/5min. (Titze-de-Almeida et al., 2004). Os

produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio, e fotografados sob luz ultra-violeta.

4.3. Eletroforese em gel de campo pulsado

A tipagem dos isolados para análise da variabilidade genética foi realizada por PFGE. Nessa técnica, o DNA cromossomal é extraído e fixado em agarose. Para dissolução da parede celular bacteriana foram utilizados detergentes apropriados, enzimas líticas e proteinase K. Após extraído, o DNA genômico da bactéria foi digerido pela enzima de restrição *Sma* I. As amostras foram submetidas à eletroforese (Agarose 1%, Tempo de corrida 23 horas, “switch time” 5 - 30 segundos, 6V/cm; 14° C, separação dos fragmentos em Kb <50 - 350). Os géis foram corados com brometo de etídio e fotografados sob luz ultra-violeta (Chu et al., 1986, Tenover et al., 1995,).

Os isolados foram identificados por inspeção visual e classificados de acordo com critérios internacionalmente aceitos (Tenover et al., 1995).

5. Resultados

5.1. Isolamento Seletivo

O ensaio de isolamento seletivo utilizando-se o meio *Enterococcosel broth* suplementado com vancomicina 8µg/mL foi efetivo na seleção dos microrganismos de interesse. Houve crescimento em 119 amostras de um total de 200 testadas (59,5%) (Fig. 3). Após a semeadura em ágar sangue das amostras positivas, um total de 47 isolados apresentou colônias sugestivas de enterococos, identificando-se cocos Gram positivos, catalase negativos (Fig. 4). Essas foram submetidas à PCR multiplex para identificação de espécie e de genes de resistência à vancomicina. Nesta etapa, identificou-se 23,5% de amostras sugestivas de enterococos (Tab. 1).



Figura 3 - Exemplo de amostra com crescimento negativo (esquerda) e positivo (direita) em meio BBL *Enterococcosel Broth* suplementado com vancomicina 8µg/mL.



Figura 4 – Placa de ágar sangue mostrando colônias características de enterococos.

Tabela 1. Resultados do isolamento seletivo por região do Distrito Federal

Região	Amostras coletadas (número)	Isolados no meio seletivo número (%)*	Isolados Gram positivos e catalase negativos número (%)*
Jardim	25	15 (60,0%)	4 (16,0%)
Pad/DF	25	17 (68,0%)	7 (28,0%)
Paranoá	25	14 (56,0%)	13 (52,0%)
Planaltina	25	13 (52,0%)	7 (28,0%)
Rio Preto	25	15 (60,0%)	3 (12,0%)
São Sebast.	25	12 (48,0%)	4 (16,0%)
Sobradinho	25	16 (64,0%)	3 (12,0%)
Taquara	25	17 (68,0%)	6 (24,0%)
Total	200	119 (59,5%)	47 (23,5%)

* percentual de isolados em relação ao número de amostras coletadas.

Foram obtidos resultados de isolamento seletivo para todas regiões. O percentual variou de 48% a 68% dependendo da região. O percentual de isolamentos de cocos Gram positivos, catalase negativos, também variou de acordo com a região, conforme descrito na tabela 1, Sobradinho e Rio Preto apresentaram os menores percentuais (12%), quando comparados com o Paranoá (52%), onde foi obtida a maior taxa de isolamento. Os isolados Gram positivos, catalase negativos foram submetidas à PCR.

5.2. Identificação de espécies e de genes de resistência à vancomicina por PCR multiplex

A PCR multiplex mostrou-se efetiva para os testes de identificação das espécies *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, e dos genes de resistência *vanA*, *vanB*, *vanC1* e *vanC2/3*, a partir de amostras de enterococos isolados de frangos caipiras (Fig. 5), de cepas previamente identificadas em coleção por testes bioquímicos e de cepas controle ATCC (American Type Culture Collection), como as seguintes: *E. faecalis* (ATCC 29212 e ATCC 775), *E. faecalis vanB* (ATCC 51299), *E. gallinarum* (ATCC 12359) e *E. faecalis vanA* (A256 – Rio de Janeiro). Foram analisadas 47 amostras

características de enterococos, havendo 38 resultados positivos da PCR. Destes, trinta e sete isolados submetidos à PCR apresentaram o genótipo VanC. Os genes *vanC1* e *vanC2/3* foram presentes em 26 (13%) e 11 (5,5%) dos isolados, respectivamente. Somente um isolado foi positivo para o gene *ddl*_{*Enterococcus faecalis*}, sendo identificado como *E. faecalis*. Destaque-se que os genes de resistência *vanA* e *vanB* não foram identificados na totalidade das amostras estudadas. Os outros 9 isolados, analisados pelo PCR multiplex, obtiveram resultado negativo. Estes podem se enquadrar como enterococos, mas não são de nenhuma das espécies de interesse do presente estudo.

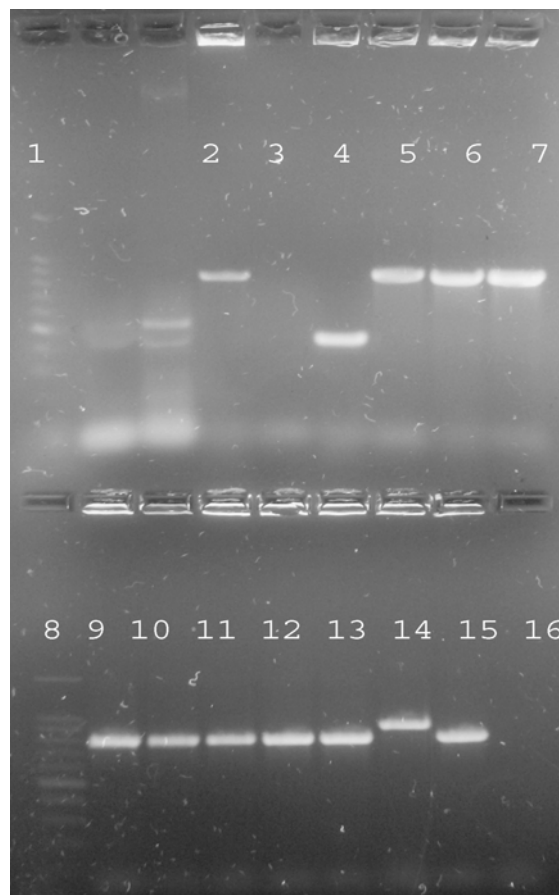


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose 1% de amostras isoladas no presente estudo: 1 e 8, Ladder; 2, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13 e 15, *E.gallinarum* (822bp); 3, amostra negativa; 4, *E. casseliflavus* (439bp); 14, *E. faecalis* (941bp); 16, controle neg.

Tabela 2. Prevalência de espécies de enterococos por região amostrada.

Região	Amostras coletadas (número)	<i>E. gallinarum</i> número (%) [*]	<i>E. casseliflavus</i> número (%) [*]	<i>E. faecalis</i> número (%) [*]	Total de resultados positivos número (%) [*]
Jardim	25	2 (8,0%)	0	0	2 (8,0%)
Pad/DF	25	1 (4,0%)	6 (24,0%)	0	7 (28,0%)
Paranoá	25	9 (36,0%)	2 (8,0%)	0	11 (44,0%)
Planaltina	25	6 (24,0%)	1 (4,0%)	0	7 (28,0%)
Rio Preto	25	0	1 (4,0%)	0	1 (4,0%)
São Seb.	25	1 (4,0%)	0	0	1 (4,0%)
Sobradinho	25	3 (12,0%)	0	1 (4,0%)	4 (16,0%)
Taquara	25	4 (16,0%)	1 (4,0%)	0	4 (20,0%)
Total (200)	200	26 (13,0%)	11 (5,5%)	1	38 (19,0%)

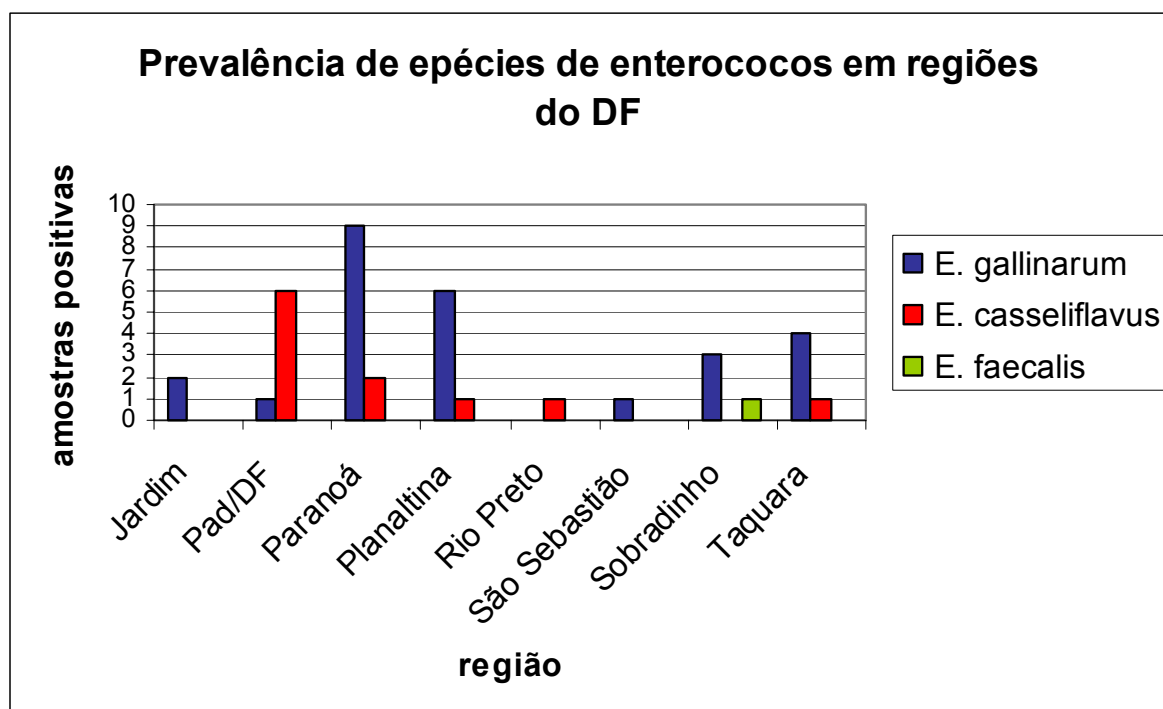


Figura 6. Diferenças na prevalência de enterococos em regiões do Distrito Federal

Os resultados do presente estudo identificaram diferenças na distribuição das espécies de acordo com a região estudada (Tab. 2, Fig. 6). As regiões do Paranoá e Planaltina foram as que apresentaram maior prevalência de *E. gallinarum*, carreando o gene de resistência *vanC1*. O oposto ocorreu na região do Pad/DF, onde *E. casseliflavus*, com o gene *vanC2/3*, foi mais prevalente. As regiões do Jardim e São Sebastião apresentaram apenas *E. gallinarum* e a área do Rio Preto somente *E. casseliflavus*.

Concluindo, apesar da proximidade geográfica, observou-se notada diferença na prevalência das espécies de acordo com as regiões investigadas.

5.3. Eletroforese em gel de campo pulsado

Amostras representativas dos genótipos VanC identificados por PCR multiplex (*E. casseliflavus*, n=10 e *E. gallinarum*, n=12), foram submetidas à tipagem molecular por PFGE. Os isolados foram analisados seguindo-se padrões internacionalmente aceitos onde a diferença em pelo menos 3 bandas caracteriza um genótipo diferente (Tenover et al., 1995).

No presente estudo, verificou-se que a totalidade dos 10 isolados da espécie *E. casseliflavus* apresentaram perfis eletroforéticos diferentes, denominados de A, B, C, D, E, F, G, L, M e N (Fig. 7, Tab. 3). Para a espécie *E. gallinarum*, entretanto, foram identificados genogrupos de isolados com perfis eletroforéticos similares. Assim, as 12 amostras analisadas pelo PFGE foram classificadas em 4 genótipos, como segue: H (n=8; subtipos H1, n=2; H2, n=4 e; H3, n=2), I (n=1), J (n=2) e K (n=1), conforme ilustrado na Figura 8.

A totalidade dos isolados de *E. gallinarum* das regiões de Planaltina, Sobradinho e Paranoá, foram classificadas em um mesmo genótipo, "H". além disto, o mesmo subtipo "H3", foi encontrado em duas regiões geográficas diferentes, Planaltina e Sobradinho (Tab. 4). Os demais resultados de *E. gallinarum*, no Pad/DF, Jardim e Taquara, confirmaram que amostras da mesma região pertenciam ao mesmo genótipo.

Os resultados de PFGE mostram diferenças marcantes de variabilidade genética entre as espécies de genótipo VanC. A espécie *E. casseliflavus* apresentou alta diversidade clonal, sugerindo que os mesmos não se originaram de um ancestral comum ou não apresentavam capacidade de disseminação de linhagens

entre os animais. A espécie *E. gallinarum*, ao contrário, mostrou maior nível de similaridade genética entre os isolados, definindo-se claramente genogrupos inclusive com isolados de regiões geográficas diferentes, como ocorreu com os genogrupos H e J. Tais resultados podem sugerir que os mesmos se originaram de um ancestral comum ou que se tratam de isolados com alta capacidade de adaptação ao hospedeiro e de disseminação de linhagens.

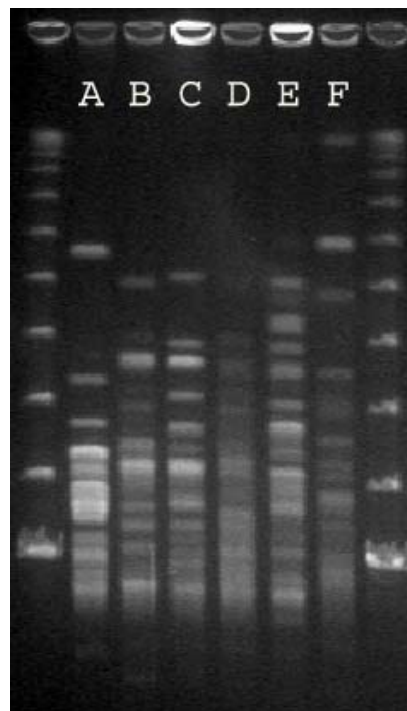


Figura 7. Eletroforese em gel de campo pulsado de amostras de *Enterococcus casseliflavus* obtidas de frangos caipiras de regiões do Distrito Federal. Os perfis eletroforéticos são designados com as letras maiúsculas (A, B, C, D, E e F). Os Padrões de peso molecular (λ) – Lambda ladder 48.5 Kb estão dispostos nas extremidades esquerda e direita do gel.

Tabela 3 – Perfis eletroforéticos das amostras de *E. casseliflavus* de acordo com a região amostrada.

Região do Isolamento	PFGE
Planaltina	“A”
Paranoá	“B”
Paranoá	“C”
Pad/DF	“D”
Pad/DF	“E”
Pad/DF	“F”
Pad/DF	“G”
Pad/DF	“L”
Rio Preto	“M”
<i>Taquara</i>	“N”



Figura 8. Eletroforese em gel de campo pulsado de amostras de *Enterococcus gallinarum* obtidas de frangos caipiras de regiões do Distrito Federal. Os perfis eletroforéticos são designados com as letras maiúsculas (H, I, J e K) e os subtipos descritos com a mesma letra maiúscula seguida do número arábico. Os padrões de peso molecular (λ) – Lambda ladder 48.5 Kb estão indicados à esquerda e à direita do gel.

Tabela 4 – Perfis eletroforéticos das amostras de *E. gallinarum* de acordo com a região amostrada.

Região do Isolamento	PFGE
Planaltina	“H3”
Sobradinho	“H1”
Sobradinho	“H1”
Sobradinho	“H3”
Paranoá	“H2”
Paranoá	“H2”
Paranoá	“H2”
Paranoá	“H2”
Pad/DF	“I”
Jardim	“J”
Jardim	“J”
<i>Taquara</i>	“K”

6. Discussão

O presente trabalho estudou a possível presença de ERVs em frangos caipiras, identificando genes de resistência à vancomicina anteriormente descritos e, também, avaliando a variabilidade genética desta população microbiana.

Uma das principais contribuições deste estudo foi mostrar que frangos caipiras, criados sem o uso de antibióticos promotores de crescimento e em sistemas de produção não intensiva, não são colonizados por ERVs.

A avoparcina, glicopeptídio com estrutura química similar à vancomicina, e que exerce pressão seletiva para ERVs (Bager et al., 1997), foi utilizada como promotor de crescimento no Brasil por 10 anos. Poucos estudos, entretanto, investigaram a presença de ERVs em frangos, durante o uso e após a suspensão do uso, em 1998. ERVs não foram isolados em um total de 100 amostras coletadas de uma fazenda localizada no estado de São Paulo que usava avoparcina como promotor de crescimento, contrastando com a maioria dos resultados europeus (Leme et al., 2000; Aarestrup, 2002). No entanto, Ike et al. (1999) isolaram ERVs em produtos da carne de frango exportada do Brasil para o Japão, o que mostra que os ERVs podem colonizar ou contaminar carcaças de frangos provenientes de sistemas de criação intensiva. O procedimento para isolamento de enterococos no trabalho

conduzido por Leme et al. (2000) não incluiu o isolamento seletivo, o que pode ter prejudicado a identificação de ERVs nas amostras.

O uso de avoparcina como promotor de crescimento era implicado como principal fator na seleção de ERVs em animais de produção. A primeira publicação que mostrou comparativamente que granjas que utilizavam avoparcina apresentavam maior prevalência de ERVs quando comparadas àquelas que não utilizavam este promotor foi realizada na Dinamarca em granjas de suínos e aves (Bager et al., 1997). Com base neste e em outros estudos, vários países da comunidade europeia optaram por retirar a avoparcina como promotor de crescimento, o que reduziu drasticamente a prevalência de ERVs em vários países, como na Dinamarca entre 1995 (72,7%) e 2000 (5,8%) (Aarestrup et al., 2001). Esta redução drástica, entretanto, não afetou a totalidade dos países que adotaram a mesma medida de suspensão. Noruega e Nova Zelândia, por exemplo, verificaram a persistência de ERVs após a suspensão da avoparcina, o que implica que a pressão seletiva de antibióticos não é um pré-requisito para a manutenção de ERVs em fazendas de frango de corte (Borgen et al., 2000, Manson et al., 2004, Lim et al., 2006, Sorum et al., 2006). No mesmo sentido, animais não tratados com avoparcina, como cães e gatos, podem ser reservatórios de ERVs (Van Belkum et al., 1996). Portanto, o conhecimento da cadeia epidemiológica dos ERVs requer a investigação tanto de reservatórios animais submetidos à pressão seletiva da avoparcina quanto daqueles que não utilizaram este antibiótico, como os frangos caipiras, objetos do presente estudo.

A pesquisa de ERVs utilizando meios seletivos tem se mostrado eficaz na identificação rápida desta bactéria em ambiente hospitalar. Estudos anteriores mostram que o meio Enterococcosel Broth suplementado com 6µg/mL de vancomicina apresenta resultados satisfatórios em relação a outros meios para a detecção e isolamento seletivo de ERVs em estudos de vigilância de pacientes hospitalizados (Van Horn et al., 1996). Este método favorece o isolamento das espécies com alto nível de resistência à vancomicina, carreando os genótipos *vanA* e *vanB*, porém, também seleciona aquelas que apresentam baixo nível de resistência à vancomicina (e.g., *Enterococcus gallinarum* e *E. casseliflavus*, com o genótipo *vanC*). Desta forma, no presente estudo foi aumentada a concentração de vancomicina para 8µg/mL, visando reduzir o crescimento dos isolados com o fenótipos de baixa resistência a vancomicina. Além disto, a confirmação de

isolamento de ERVs somente seria feita após o resultado do PCR multiplex (Titzede-Almeida et al., 2004), com a correta identificação dos genes de resistência à vancomicina. Desta forma, os dois métodos descritos anteriormente para espécimes clínicos, isolamento seletivo e PCR multiplex, mostraram-se efetivos para análise de amostras obtidas de frangos caipiras, podendo ser utilizados para programas de vigilância desta bactéria em criações avícolas.

Os resultados de prevalência de VanC em nosso estudo foram comparados com resultados da literatura. Investigações em cama de frango de fazendas do Arkansas mostram a espécie *E. gallinarum* como a mais prevalente, corroborando com nossos achados de amostras fecais (Khan et al., 2005). Em outro estudo, apesar dos fenótipos predominantes serem VanC (11,0%), a espécie mais prevalente foi *E. casseliflavus*, *vanC2* (Rice et al., 2003), contrastando com a predominância de *E. gallinaraum* (*vanC1*; 13,0 %) encontrada em nosso estudo. Outra diferença foi encontrada na Malásia, onde *E. faecalis* (*vanA*) e *E. casseliflavus* (*vanC2*) foram as espécies resistentes mais prevalentes isoladas de amostras de cortes de frangos (Radu et al., 2001). Diferenças nas prevalências das espécies podem refletir as habilidades das linhagens de enterococos em colonizar a microbiota dos animais criados sobre diferentes condições ambientais, que geram pressões evolucionárias distintas.

A epidemiologia dos enterococos com resistência à vancomicina apresenta marcada diferença com relação aos países em estudo. ERVs são patógenos pouco prevalentes na Europa, porém, têm sido isolados de animais de produção, animais de companhia e indivíduos da comunidade (Cetinkaya et al., 2000; Bonten et al., 2001). O comportamento epidemiológico dos enterococos nos Estados Unidos segue outro padrão. Trata-se de um patógeno emergente em infecções hospitalares e praticamente sem reservatórios na comunidade. Em nosso país ERVs têm sido progressivamente isolados em hospitais de São Paulo (1997) e de várias outras cidades, incluindo Rio de Janeiro e Porto Alegre (Albuquerque et al., 2000; d'Azevedo et al., 2000; Zanella et al., 2003). Esta complexidade epidemiológica justifica a realização de estudos a cerca de colonizações por ERVs em animais e, conforme foi citado anteriormente, ainda não temos relatos destes microrganismos em animais de produção no Brasil.

Uma das características marcantes do gênero *Enterococcus* é a capacidade de disseminar linhagens entre diferentes indivíduos. Isto foi observado no primeiro

surto hospitalar ocorrido em São Paulo, pelas espécies *E. faecium* e *E. faecalis*, e também nas cidades de Porto Alegre e Brasília (Zanella et al., 2002; Titze-de-Almeida et al., 2004; d'Azevedo et al., 2006). Do ponto de vista global, também foram identificados por sequenciamento de multilocus (MLST), clones epidêmicos de *E. faecium* disseminando linhagens em diferentes países, o denominado complexo-17, que apresentava isolados da maioria dos surtos hospitalares e isolados clínicos provenientes dos 5 continentes deste planeta. Todos os clones que apresentavam este comportamento epidêmico mostraram-se resistentes à ampicilina e continham uma provável ilha de patogenicidade (Willems et al., 2005). Apesar desta característica de epidemicidade, estudos recentes apontam que existe uma especificidade de hospedeiro, sendo que enterococos isolados de frangos não pertencem ao mesmo genogrupo de isolados de seres humanos (Willems et al., 2002). No atual estudo, a característica de epidemicidade foi observada na espécie *Enterococcus gallinarum*. Foram identificados isolados de regiões geográficas diferentes com o mesmo genótipo, o que pode sugerir a existência de um ancestral comum ou diferenciais genéticos que confirmam maior capacidade adaptativa ou de disseminação de linhagens destes clones. É importante destacar que este comportamento epidêmico não foi observado na espécie *E. casseliflavus*.

Em síntese, o presente estudo mostrou que enterococos VanA e VanB não colonizam frangos criados em sistemas não intensivos e que existem diferenças de variabilidade genética entre as espécies *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*. A espécie *E. gallinarum* apresenta menor diversidade genética, com capacidade de organizar-se em genogrupos.

7. Conclusão

O atual trabalho se propôs a estudar a presença de enterococos resistentes à vancomicina e sua variabilidade genética em um reservatório animal ainda não estudado, o frango caipira. A partir dos resultados obtidos na presente investigação, pôde-se concluir que:

- Frangos caipiras, criados sem o uso de antibióticos promotores de crescimento e em sistemas não intensivos, não são colonizados por ERVs VanA e VanB. Portanto, não participam da cadeia epidemiológica destes microrganismos no Brasil. Investigações posteriores poderão elucidar se frangos ou outros animais de produção criados em sistemas intensivos, ou seja, em sistemas industriais do Brasil, são reservatórios de ERV;
- Considerando-se que não foram isolados enterococos VanA ou VanB, o protocolo de isolamento seletivo favoreceu o crescimento apenas das espécies com o genótipo VanC, que apresenta resistência intrínseca à vancomicina. Dentre estas, as espécies mais prevalentes nas amostras fecais de frangos caipiras foram *E. gallinarum*, seguida de *E. casseliflavus*;
- As espécies *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* organizam-se em populações microbianas com estruturas genéticas diferentes. Os ensaios de macrorrestrrição por eletroforese em gel de campo pulsado evidenciaram maior variabilidade genética na espécie *E. casseliflavus*. A espécie *E. gallinarum*, ao contrário, mostrou capacidade de expansão clonal de isolados com perfis eletroforéticos semelhantes. A identificação destes clones pode indicar que se originaram de um único ancestral comum ou que se tratam de linhagens com grande capacidade adaptativa em relação ao frango caipira e com habilidade de disseminar linhagens entre indivíduos de uma mesma população.
- A espécie *E. gallinarum* foi a mais prevalente em frangos caipiras do Distrito Federal e, apesar da proximidade geográfica, observou-se notada diferença na prevalência das espécies de acordo com as regiões investigadas.

8. Referências

AARESTRUP, F. M.; BUTAYE, P.; WOLGANG, W. Nonhuman Reservoirs of Enterococci. In: GILMORE, M. S. **The Enterococci – Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance**. Washington, DC: ASM Press, 2002.

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. **Antimicrob Agents Chemother**, 45:2054–2059, 2001.

ALBUQUERQUE, V. S. Occurrence of cancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in Rio de Janeiro, Brazil: strains showed genetic relationship with a high-level gentamicin resistant (HLGR) endemic clone. In: Program and abstracts: **40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. Chicago, Illinois: The United States, 2000

BAGER, F.; EMBORG, H. D.; HEUER, O. E. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark. **DANMAP**, 2001. Disponível em: <<http://www.vetinst.dk/file/Danmap%2001.pdf>>

BAGER, F.; MADSEN, M.; CHRISTENSEN, J. et al. Avoparcin used as growth promoter is associated with the occurrence of cancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. **Prev Vet Med**, v. 31, p. 95-112, 1997.

BASTIANELLI, D. **A produção de frangos diferenciados na França. Mercado, Aspectos organizacionais e regulamentares**. In: CONFERÊNCIA APINCO 2001 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, Campinas, 2001. Anais Campinas:FACTA,,p.235 – 254, 2001.

BOLIS, D. A. **Análise de mercado para frangos orgânicos**. Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC), Joaçaba, 2002. dissertação de mestrado

BONTEN, M.K.M.; WILLEMS, R.; WEINSTEIN, R.A. Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from? **Lancet Infect Dis**, v. 1, p. 314-325, 2001.

BORGEN, K. et al. Continuing high prevalence of VanA-type vancomycin resistant enterococci on Norwegian poultry farms three years after avoparcin was banned. **J Appl Microbiol**, v.89, p. 478–485, 2000.

CETINKAYA, Y.; FALK, P.; MAYHALL, C. G. Vancomycin-resistant enterococci. **Clin Microbiol Rev** v.13, p.686–707, 2000.

CHU, G.; VOLLRATH, D.; DAVIS, R. W. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric field. **Science**, 234: 1582-5, 1986.

D'AZEVEDO, P. A.; DIAS, C. A. G.; TEIXEIRA, L. M. Genetic diversity and antimicrobial resistance of enterococcal isolates from southern region of Brazil. **Rev Inst Med Trop S Paulo**, 48: 11-16, 2006.

D'AZEVEDO, P. A. et al. Primeiro caso de *Enterococcus* resistente à vancomicina isolado em Porto Alegre, RS. **J Brás Patol Med Laboratorial**, v. 36, n. 3, p. 258, 2000.

DEMATTÊ FILHO, L. C.; MENDES, C. M. I.; KODAWARA, L. M. **Produção de Frango Orgânico – Desafios e Perspectiva. Disponível em:** <<http://www.planetaorganico.com.br/TrabFrango.htm>>

DEMATTÊ FILHO, L. C.; MENDES, C. M. I. **Viabilidade técnica e econômica na criação alternativa de frangos.** In: Conferência APINCO 2001 de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2., 2001, Campinas. Anais. Campinas: FACTA, 2001. p.255-266.

DUTKA-MALEN, S.; EVERS, S.; COURVALIN, P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant *Enterococci* by PCR. **J Clin Microbiol**, v.33, n.1, p. 24-27, 1995.

FACKLAM, R. R.; CARVALHO, M. G. S.; TEIXEIRA, L. M. History, Taxonomy, Biochemical Characteristics and Antibiotic Susceptibility Testing of Enterococci. In: GILMORE, M. S. (Ed.). **The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance**. Washington: ASM Press, 2002. p. 1-54

FIGUEIREDO, E. A. P. et al. **Diferentes denominações e classificação brasileira de produção alternativa de frangos**. In: CONFERÊNCIA APINCO 2001 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, Campinas, 2001. **Anais** Campinas:FACTA, p.209 - 222, 2001.

GARCIA, R. G. et al. **Perspectivas de mercado do frango certificado alternativo no Estado de São Paulo**. Projeto da disciplina de Tópicos em Sistemas de Gestão Agroalimentar, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP, Botucatu, 2002.

GILMORE, M. S. **The Enterococci – Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance**, Washington, DC: ASM Press, 2002.

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

JAENISCH, F.R. F. **Procedimentos de Bioseguridade na criação de frangos no sistema agroecológico**. Concórdia - CT 250. Embrapa, CNPSA, 2000. 1 - 5p.

KHAN, S. A., et al. Molecular characterization of multidrug-resistant *Enterococcus* spp. from poultry and dairy farms: detection of virulence and vancomycin resistance gene markers by PCR. **Mol Cell Probes** v.19, p.27–34, 2005.

LANA, G.R.Q. **Criação de Galinha Caipira**. In: X SEMANA DE ZOOTECNIA DA UFRPE, 2001, Recife, Anais... Recife: UFRPE, 2001. p.34.

LEME, I. L.; PIANTINO, A. J.; PIGNATARI, A. C. Glycopeptides susceptibility among enterococci isolated from a poultry farm in São Paulo, Brazil (1996/1997). **Braz J Microbiol**, v. 31, p. 53-57, 2000.

LIM et al. Persistence of vanA-type *Enterococcus faecium* in Korean livestock after ban of avoparcina. **Microbiol Drug Resist**, Summer; v.12, n. 2, p. 136-139, 2006

MANSON, J. M.; SMITH, J. M. B.; COOK M. G. Persistence of vancomycin-resistant enterococci in New Zealand broilers after discontinuation of avoparcin use. **Appl Environ Microbiol**, v.70, p.5764–5768, 2004.

MESSI, P. et al., Vancomycin-resistant enterococci (VRE) in meat and environmental samples. **Int J Food Microbiol**. Março; v.107, n.2, p.218-22, 2006.

MCDONALD, L.C. et al. Vancomycin-resistant enterococci outside the health-care setting: prevalence, sources, and public health implications. **Emerg Infect Dis**, v. 3, n. 3, p. 311-317, 1997.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, **Instrução Normativa no 7, de 17 de maio de 1999**, Diário Oficial da República Federativa do Brasil no 94, Brasília , 19/05/1999.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, **Ofício circular 19/98 de 16/11/98 do Ministério**, Brasília, Brasil, 1998.

MONDINO, S. S. et al. Phenotypic and genotypic characterization of clinical and intestinal enterococci isolated from inpatients and outpatients in two Brazilian hospitals. **Microb Drug Res**, v.9, n.2, p.167-174, 2003

MURRAY B.E. Life and times of the enterococcus. **Clin Microbiol Rev**, v.3, p.46-65, 1990.

NCCLS, Wayne, P. A. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**, National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).M100-S12; 2002.

NCCLS, Wayne, P. A. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**, National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 5th – Approved standard M7-A5., 2000.

PATEL, R. et al. Multiplex PCR detection of van A, van B, van C-1, and van C-2/3 genes in Enterococci. **J Clin Microbiol**, v. 35, n. 3, p. 703-707, 1997.

RADU, S. et al. Occurrence of the *vanA* and *vanC2/C3* genes in *Enterococcus* species isolated from poultry sources in Malaysia. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.39, p.145–153, 2001.

RICE, E. W. et al. Detection of intrinsic vancomycin resistant enterococci in animal and human feces. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 46, p. 155–158, 2003.

SILVA, M.J. et al. **Avicultura Alternativa como fonte de renda e melhoria da qualidade de vida nas propriedades de produção familiar**. Disponível em: <www.pantanal2002.ucdb.br/eixos/eixo02.pdf> (2003)

SORUM et al. Prevalence, persistence, and molecular characterization of glycopeptide-resistant enterococci in Norwegian poultry and poultry farmers 3 to 8 years after the ban on avoparcina. **Appl Environ Microbiol**, Jan; v.72, n. 1, p. 516-21, 2006

SPRAT, B. Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the Internet. **Curr Opin Microbiol**, v.2, p.312-316, 1999.

TENOVER F.C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J Clin Microbiol**, v. 33, p. 2233-9, 1995.

TITZE-DE-ALMEIDA, R. et al. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of Enterococci recovered from Brazilian intensive care units. **Braz J Infect Dis**, v.8, n.3, p.197-205., 2004.

TITZE-DE-ALMEIDA, R., PALERMO-NETO, J. Uso de antimicrobianos em avicultura e o desenvolvimento de resistência bacteriana. In: PALERMO-NETO, J., SPINOSA, H. S., GÓRNIK, S. L., **Farmacologia Aplicada à Avicultura**. [S.L.]: Roca , cap. 10, p. 161-173, 2005.

VAN BELKUM, A., et al. Vancomycin-resistant enterococci in cats and dogs. **Lancet** v.348, p.1038-1039., 1996.

VAN BELKUM, A. The role of short sequence repeats in epidemiologic typing. **Curr Opin Microbiol**, v. 2, p. 306-311, 1999.

VAN HORN et al. Selective isolation of vancomycin-resistant enterococci. **J Clin Microbiol**, v.34, p.924-927, 1996.

WILLEMS, R. J., J. et al. Host specificity of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. **J Infect Dis**, v.182, p.816-823, 2000.

WILLEMS, R. J. et al. Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. **Emerg Infect Dis**, v.11, p.821-828, 2005.

ZANELLA, R.C.. et al. First confirmed case of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* with vanA phenotype from Brazil: isolation from meningitis case in São Paulo. **Microb Drug Resist**, v. 5, n. 2, p. 159-162, 1999.

ZANELLA, R. C. et al. Phenotypic and genotypic characterization of VanA enterococcus isolated during the first nosocomial outbreak in Brazil. **Microb Drug Resist**, v.9, p.283–291, 2003.

Outras publicações durante o mestrado

Trabalhos resumidos publicados em anais de evento

Xavier, D. B., Bernal, F. E. M., Titze-de-Almeida, R. **Isolamento seletivo e PCR multiplex para identificação de espécies de enterococos e genes de resistência em frangos caipiras.** In: CONBRAVET – Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 2005, Uberlândia. Anais do XXXII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Uberlândia, 2005.

Santiago, K. A. S., Azevedo, P. A. D., Furtado, G., Xavier, D. B., Titze-de-Almeida, R., Pignatari, A. C. C. **Diagnóstico rápido de enterococos resistentes à vancomicina (ERV) em swabs de pacientes hospitalizados.** In: 40º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial, Curitiba, 2006.

Xavier, D. B., Marques, F., Bernal, F. E. M., Azevedo, P. A. D., Pignatari, A. C. C., Titze-de-Almeida, R. **Diferenças de variabilidade genética entre isolados de *Enterococcus gallinarum* e *E. casseliflavus* obtidos de frangos destinados ao consumo humano.** In: III Sinreban – Simpósio de resistência bacteriana aos antimicrobianos, Rio de Janeiro, 2006.

Greuel, A. M., Xavier, D. B., Titze-de-Almeida, R., Coelho, M. M. S., Stain, M. R., Paludo, G. R. **Relato de identificação molecular de *Ehrlichia canis* em cão do Distrito Federal.** In: CONBRAVET – Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 2005, Uberlândia. Anais do XXXII Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Uberlândia, 2005.

Greuel, A. M., Xavier, D. B., Titze-de-Almeida, R., Coelho, M. M. S., Paludo, G. R., **Diagnóstico molecular de Ehrlichiose em cães.** In: XII Congresso de Iniciação Científica da Universidade de Brasília e 3º Congresso de Iniciação Científica do DF, 2006.

Publicação em periódicos Qualis A

Xavier, D. B., Bernal, F. E. M., Titze-de-Almeida, R., **Absence of VanA- and VanB-Containing Enterococci in Poultry Raised on Nonintensive Production Farms in Brazil**, Applied and Environmental Microbiology, vol. 72, Num. 4, pg 3072-73, Abril de 2006. , **in:** Applied and Environmental Microbiology, 2006, American Society for Microbiology.

Projetos em andamento como estagiário bolsista de mestrado no Laboratório de Microbiologia Molecular e Biotecnologia – MMB:

- Prevalência e variabilidade genética de enterococos isolados de macacos do centro de primatologia da UnB;
- Prevalência e variabilidade genética de enterococos isolados de suínos da região do Distrito Federal;
- Prevalência e variabilidade genética de enterococos isolados de cães e gatos atendidos no Hospital Veterinário da UnB;
- Diagnóstico molecular de Ehrlichia spp.;
- Prevalência de Ehrlichia spp. em cães do Distrito Federal;
- Diagnóstico molecular de Leishmania;
- Utilização de isolados de *E. gallinarum* em probiótico destinado à produção de frangos de corte.