

## RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE CARNE E DEJETOS SUÍNOS

[Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated in meat and fecal samples from pigs]

Robson Maia Franco, Samira Pirola Santos Mantilla\*, Raquel Gouvêa, Luiz Antônio Trindade de Oliveira

Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ.

**RESUMO** - A resistência bacteriana aos antimicrobianos é um tema amplamente pesquisado por diversos autores devido à grande importância desta condição para a saúde coletiva. À medida que os antimicrobianos vão sendo utilizados indiscriminadamente, aumenta-se o número de bactérias resistentes às drogas mais utilizadas na terapia humana, incluindo as do gênero *Escherichia*. O objetivo deste estudo foi avaliar a resistência antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* isoladas de amostras de dejetos e carne suína, utilizando-se a metodologia Kirb-Bauer. Todas as cepas de *Escherichia coli* patogênicas apresentaram resistência à pelo menos sete antibióticos usados rotineiramente no tratamento das enfermidades transmitidas por alimentos e foram sensíveis apenas à gentamicina e à tobramicina.

**Palavras-Chave:** Antibiograma, carne suína, sensibilidade, saúde coletiva.

**ABSTRACT** - Bacterial resistance to antibiotics is a subject widely researched due to its great importance for public health. The more antibiotics are indiscriminately used, the more is the increase of bacteria resistant to the drugs in use on human therapy, including bacteria of the genus *Escherichia*. The objective of this study was to evaluate the resistance of *Escherichia coli* isolated from fecal samples and pork to antibiotics, using the Kirb-Bauer methodology. All pathogenic strains of *Escherichia coli* showed resistance to, at least, seven antibiotics usually employed on diseases of food origin therapy, and just showed sensibility to gentamicin and tobramicin.

**Keywords:** Antibiogram, pork, sensitivity, public health.

### INTRODUÇÃO

Os antibióticos são compostos produzidos por bactérias e fungos que inibem o crescimento de outros microorganismos. Esses produtos podem ser utilizados para promover o crescimento e/ou a eficiência alimentar ou prevenir/controlar as doenças que afetam os suínos. Em geral, aceita-se que a ação benéfica desses compostos resulta da alteração seletiva da população microbiana no intestino animal (Bellaver, 2000).

Os antimicrobianos, quando usados como promotores de crescimento na alimentação animal, podem exercer forte pressão seletiva sobre os patógenos e a microbiota saprofítica, principalmente quando utilizados abusivamente, podendo resultar no aparecimento de resistência quer seja na microbiota saprofítica e/ou patogênica, em dependência da codificação de genes para resistência antimicrobiana pela ação de plasmídios e transposons, colocando em

perigo o ingestor de produtos de origem animal pelo rápido desenvolvimento da resistência por mutação (Franco et al., 2006).

Com o aumento do uso de antimicrobianos como promotores de crescimento e até mesmo com fins terapêuticos na criação de animais de produção, existe o interesse global referente ao consumo de baixos níveis de resíduos de antimicrobianos em alimentos e os efeitos destes na saúde humana. A ingestão de alimentos contendo resíduos de fármacos antimicrobianos pode ocasionar resistência bacteriana aos antimicrobianos utilizados rotineiramente na terapêutica humana, dificultando o tratamento de enfermidades infecciosas humanas (Mantilla et al., 2007).

Microingredientes a base de sulfas e outros antibióticos têm sido amplamente usados na produção suína para melhorias do crescimento e da eficiência alimentar. Devido a alta incidência de

\* Autor para correspondência. E-mail: samiramantilla@yahoo.com.br.

violações ao uso dessas drogas as recomendações são para que sejam respeitados os períodos de retirada da droga das rações. A maior preocupação é com respeito a penicilina e tetraciclina porque esses são usados na terapia de enfermidades humanas (Bellaver, 2000).

O uso crescente de antimicrobianos, de maneira excessiva e indiscriminada na produção animal, tem sido apontado como uma das possíveis causas da emergência de linhagens bacterianas resistentes (Harakeh et al., 2006; Macedo et al., 2007). Esse uso indiscriminado e constante na medicina veterinária pode interferir no tratamento efetivo das infecções por agentes bacterianos (Bacarro et al., 2002).

Salyers & Amabile-Cuevas (1997) esclarecem que a aquisição desta resistência é decorrente de uma alteração genética determinada por mutações cromossômicas ou por aquisição de plasmídios R. Os antibióticos não induzem a essa resistência, apenas selecionam as amostras resistentes (Tavares, 1990).

Vários pesquisadores relataram a ocorrência de cepas e *E. coli* patogênicas isoladas de carne suína e outros alimentos que apresentaram resistência a diversos antimicrobianos como Hill et al. (1988), Ferreira et al. (1996), Meng et al. (1998), Schroeder et al. (2002), Boerlin et al. (2005), Silva et al. (2009). Outros autores também relatam a existência de cepas de *E. coli* patogênicas, oriundas de dejetos suínos diarréicos e sadios, resistentes a diversos antimicrobianos utilizados na terapia humana como Costa et al. (2006) e Macêdo et al. (2007).

A resistência antimicrobiana é um problema com graves implicações clínicas, pois novos agentes

antimicrobianos devem ser desenvolvidos e são sempre mais caros e muitas vezes mais tóxicos que os utilizados anteriormente nos tratamentos das infecções. Portanto, um dos maiores desafios na área de produção animal tem sido à busca de alternativas para se reduzir o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento em rações. Este desafio é consequência das crescentes pressões impostas por legislações de países que importam produtos de origem animal, como os da Comunidade Européia, que proíbem a inclusão de antimicrobianos nas dietas de frangos de corte e outras espécies animais. (Medeiros et al., 2009).

O objetivo do presente estudo foi verificar a sensibilidade de cepas de *E. coli*, isoladas de diferentes amostras de carne suína e de fezes, frente a diversos antimicrobianos, enfatizando a importância do uso indiscriminado desses fármacos na alimentação animal.

## MATERIAL E MÉTODOS

As cepas de *Escherichia coli* foram isoladas de suínos (Franco, 2002) escolhidos aleatoriamente, abatidos na área do Grande Rio, em matadouro frigorífico, sob a Inspeção Estadual, provenientes dos estados do Rio de Janeiro (Magé e Rio Bonito), Minas Gerais, Paraná e Santa Catarina. As regiões de coleta das amostras para posterior isolamento das cepas de *E. coli* estão dispostas no Quadro 1, assim como os sorogrupos isolados de cada região.

Todas as cepas patogênicas (EPEC-B: O125; EPEC-C: O86, O126, O128; EIEC-A: O29 e EHEC-O157) foram testadas frente aos seguintes antimicrobianos:

**Quadro 1.** Regiões de coleta das amostras e sorogrupos de *E. coli* isolados de cada região.

Regiões de coleta	Sorogrupos de <i>Escherichia coli</i>					
	EPEC				EIEC A029	EHEC O157
	B0125	C 086	C0126	C0128		
Região interna da papada (correspondente à área de ferida de sangria)	0	2	0	0	0	0
Cavidade torácica entre 4ª e 7ª costelas (pleura e músculos intercostais)	0	0	0	0	0	0
Cavidade pélvica (região sub-sacral próxima à base da cauda)	0	0	0	0	2	0
Linfonodos mesentéricos	2	1	2	1	0	0
Fezes da região íleo-ceco-cólica	1	1	0	2	2	1
<b>Total de <i>E. coli</i> patogênicas</b>	<b>17</b>					

Amicacina, Ampicilina, Carbenicilina, Cefalexina, Cefalotina, Cefotaxina, Cefoxitina, Ceftazidina, Ceftriaxona, Ciprofloxacina, Clindamicina, Cloranfenicol, Eritromicina, Gentamicina, Netilmicina, Nitrofurantoina, Norfloxacina, Oxacilina, Penicilina, Rifampicina, Tetraciclina, Tobramicina, Trimetropin+sulfá e Vancomicina.

O método utilizado no teste de resistência antimicrobiana foi o de Kirb-Bauer (Bauer et al., 1976) com preparo de inóculo para leitura de cinco horas com uso de polidisco 24 Vitor Lorian. O meio base utilizado foi o Ágar Müeller Hinton. As cepas isoladas, biotipificadas e sorotipadas, em estoque, foram mantidas em meio ambiente durante 30 minutos, sendo após esse tempo semeadas em Ágar Caso e incubadas à 37°C por 18-24 horas. A partir dos subcultivos crescidos foram selecionadas quatro a cinco colônias iguais e emulsionadas em 4 mL de água destilada esterilizada, padronizando-se a suspensão para uma turvação igual ao padrão nº 1 da escala de McFarland: 1mL de cloreto de bário a 1% com 99mL de ácido sulfúrico a 1% (0,36N) que corresponde a  $3,8 \times 10^8$  microrganismos por mililitro.

As placas contendo Ágar Müeller Hinton, após serem retiradas da geladeira, incubadas à 37°C durante uma hora antes da semeadura e mantidas em temperatura ambiente por três a cinco horas, foram semeadas utilizando-se "swab" esterilizado embebido no inóculo, sendo espalhado homogeneamente na superfície do meio. Após a absorção do inóculo por alguns minutos, eram colocados os polidiscos 24, da marca Vitor Lorian, utilizando-se pinça previamente flambada e resfriada; sendo em seguida as placas incubadas a 37°C durante cinco horas. A leitura dos resultados da sensibilidade aos antimicrobianos, foi realizada medindo-se o tamanho das zonas de inibição de crescimento bacteriano com um halômetro, sendo a cepa bacteriana classificada em sensível ou resistente em função do diâmetro da zona de sensibilidade padrão estabelecida para cada antimicrobiano.

## RESULTADOS

Todas as cepas de *Escherichia coli* patogênicas foram resistentes a carbenicilina, ceftazidina, clindamicina, cloranfenicol, eritromicina, penicilina e rifampicina, cujo resultado completo do teste do antibiograma pode ser visualizado na Tab. 1, onde observa-se que as 17 cepas foram 100% sensíveis apenas a dois antibióticos e 100% resistentes a sete,

enquanto que para as 15 cepas restantes a reposta foi variável. Todas as cepas isoladas apresentaram-se resistentes à pelo menos sete antibióticos e sensíveis apenas a dois antibióticos.

## DISCUSSÃO

A realização do antibiograma para *Escherichia coli* tornou-se fundamental tendo em vista os fatores ecológicos, genéticos, ambientais, pelo fato de que os sorotipos mais isolados são resistentes à maioria dos antibióticos como afirmam Campos & Trabulsi (1999) e esta afirmação é fundamentada ao observar-se a Tabela 1 desta pesquisa, onde as cepas de *Escherichia coli* patogênicas apresentaram em sua maioria grande espectro de resistência aos antibióticos testados. Hill et al. (1988), também pesquisando em alimentos de origem suína, verificaram semelhança com os resultados da Tabelas 1 ao afirmarem que 70% das cepas isoladas foram resistentes a pelo menos um antibiótico estudado.

De acordo com Costa et al. (2006), dos 40 isolados clínicos de suínos com diarreia e 13 isolados ambientais, a maior resistência foi observada à tetraciclina, em 88,6% o corrobora com os achados nesse experimento, visto que (70,6% das cepas foram resistentes a esse antimicrobiano). Meng et al. (1998) também ressaltaram a importância da variabilidade de resistência antibiótica de cepas de *Escherichia coli* isoladas de alimentos.

Os achados inclusos na Tabela 1 também mostram semelhança com os achados de Silva et al. (2008) que ao analisarem cepas de *E. coli*, oriundas de sistemas de armazenamento de dejetos suínos nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina, verificaram que todas foram sensíveis a gentamicina e tobramicina.

Ferreira et al. (1996) estudaram a sensibilidade de *Escherichia coli* isoladas de carne moída, lingüiça e carne de rã, frente a antibióticos pelo método de difusão em placa encontrando sensibilidade para ciprofloxacina (94,8%), norfloxacina (91,6%) e tobramicina (87,7%) e resistência frente a carbenicilina (100,0%), eritromicina (91,0%), penicilina (90,3%), demonstrando maior sensibilidade às quinolonas de 2ª geração. Estes resultados vêm ao encontro com os achados neste experimento, devido à ocorrência de resistência aos mesmos antimicrobianos testados.

**Tabela 1.** Comportamento das 17 cepas de *Escherichia coli* patogênicas frente aos antimicrobianos.

Antimicrobianos	Nº(%) de cepas resistentes	Nº(%) de cepas sensíveis
Amicacina(AC)	4(23,5%)	13(76,5%)
Ampicilina(A)	4(23,5%)	13(76,5%)
Carbencilina(CA)	17(100%)	0(0%)
Cefalexina(CN)	8(47,1%)	11(52,9%)
Cefalotina(C)	5(29,4%)	12(70,6%)
Cefotaxina(CT)	13(76,5%)	4(23,5%)
Cefoxitina(CX)	5(29,4%)	12(70,6%)
Ceftazidina(CZ)	17(100%)	0(0%)
Ceftriaxona(R)	13(76,5%)	4(23,5%)
Ciprofloxacina(CP)	2(11,8%)	15(88,2%)
Clindamicina(CI)	17(100%)	0(0%)
Cloranfenicol(CL)	17(100%)	0(0%)
Eritromicina(E)	17(100%)	0(0%)
Gentamicina(GE)	0(0%)	17(100%)
Netilmicina(NT)	1(5,9%)	16(94,1%)
Nitrofurantoina(F)	14(82,4%)	3(17,6%)
Norfloxacina(Fx)	9(53,0%)	8(47,1%)
Oxacilina(O)	15(88,2%)	2(11,8%)
Penicilina(P)	17(100%)	0(0%)
Rifampicina(RI)	17(100%)	0(0%)
Tetraciclina(CT)	12(70,6%)	5(29,4%)
Tobramicina(TO)	0(0%)	17(100%)
Trimetropin sulf.(B)	8(47,1%)	9(53,0%)
Vancomicina(V)	16(94,1%)	1(5,9%)

Boerlin et al. (2005) analisaram um total de 318 cepas de *E. coli* isolados de suínos diarreicos e saudáveis em Ontário, Canadá em relação ao perfil de susceptibilidade à dezenove agentes antimicrobianos. A frequência de resistência antimicrobiana entre os isolados de *E. coli* foi moderada em comparação com outros países, sendo mais elevada nos isolados de suínos com diarreia. Assim como Ferreira et al. (1996), foi detectada resistência a quinolonas.

Schroeder et al. (2002) analisaram cepas de *E. coli* O157 isoladas de seres humanos, bovinos, suínos e de alimentos e verificaram que a maior ocorrência de resistência antimicrobiana foi encontrada entre as cepas isoladas de suínos, onde 52 (74%) foram resistentes ao sulfamethoxazole, 50 (71%) a tetraciclina, 38 (54%) ao cefalotina e 17 (24%) mostraram-se resistentes a ampicilina. Em relação à tetraciclina, os resultados obtidos foram parecidos com os do presente estudo, à medida que 70,6 % das

cepas foram resistentes a este antimicrobiano, porém, maior percentagem de cepas demonstrou resistência a ampicilina (76,5%) quando comparado com os resultados obtidos por Schroeder et al. (2002).

Na pesquisa realizada por Macedo et al (2007), estudou-se o padrão de sensibilidade de cepas patogênicas de *E. coli* isoladas de leitões com diarreia, provenientes de granjas localizadas no estado de Minas Gerais. 47,37% das cepas foram sensíveis a norfloxacina, corroborando com os achados nesse estudo (47,1%). Entretanto, as porcentagens de cepas sensíveis a tetraciclina e ao trimetropim+sulfa foram menores.

Bacarro et al. (2008) estabeleceram o perfil de resistência de 600 cepas de *E.coli* isoladas de fezes de 100 leitões lactentes com diarreia e procederam a determinação da concentração inibitória mínima para diversos antimicrobianos. Os índices de resistência

observados para o cloranfenicol (97%) e gentamicina (86%) foram parecidos com os do presente estudo, todavia, esses autores relataram uma maior resistência das cepas à ampicilina (87%), norfloxacina (92%) e sulfadiazina/trimetoprima (87%).

As cepas de *E. coli* patogênicas testadas apresentaram uma boa sensibilidade à amicacina (76,5%), resultado também encontrado por Silva et al. (2009) que ao analisarem cepas de *E. coli* patogênicas oriundas de lingüiça frescal suína verificaram que a amicacina foi o que apresentou melhores resultados em relação à sensibilidade (71,42%).

Menin et al. (2008) coletaram amostras de segmentos intestinais, contemplando intestino delgado, grosso, linfonodos inguinais e mesentérios de suínos com diarreia no Estado de Santa Catarina e verificaram o perfil de resistência das cepas de *Escherichia coli* isoladas frente aos principais antimicrobianos utilizados em granjas de suínos. Esses autores também verificaram um excelente índice de resistência para tetraciclina (89,5%). Silva et al. (2008), igualmente, relataram um alto percentual de resistência para tetraciclina (82,3%) de cepas oriundas de fezes suínas. Em abatedouros europeus também foi observada alta prevalência de *E. coli* resistente a antimicrobianos de uso na suinocultura (tetraciclina e sulfá/trimetoprima) bem como a aqueles de uso restrito na veterinária, como exemplo o cloranfenicol (Bogaard et al., 2000).

Filippsen et al. (2005) avaliaram 85 cepas de *Escherichia coli*, isoladas de amostras de fezes de leitões com diarreia criados ao ar livre na região sudoeste do Paraná, quanto à resistência antimicrobiana. Os resultados demonstraram altos índices de resistência à tetraciclina, penicilina e eritromicina; e a gentamicina apresentou grande número de cepas sensíveis, corroborando com os resultados do presente estudo.

### CONCLUSÃO

Nesta pesquisa todas as cepas de *Escherichia coli* patogênicas apresentaram resistência à pelo menos sete antibióticos usados rotineiramente no tratamento das enfermidades transmitidas por alimentos e foram sensíveis apenas à gentamicina e à tobramicina. Estes resultados têm implicações importantes em relação ao uso prudente de agentes antimicrobianos e à possível propagação de resistência antimicrobiana em populações bacterianas, o que dificultaria um

tratamento de doenças de origem alimentar e até mesmo de outros tipos de enfermidades.

### REFERÊNCIAS

- Baccaro M.R., Moreno A.M., Corrêa A., Ferreira A.J.P. & Calderaro F.F. 2002. Resistência antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes de leitões com diarreia. Arq. Inst. Biol. 69:15-18.
- Bauer A.W., Kirby W.M.M., Scherris J.C. & Turck M. 1976. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol. 45:493-496.
- Bellaver C. 2002. O uso de microingredientes (aditivos) na formulação de dietas para suínos e suas implicações na produção e na segurança alimentar. Palestra apresentada no Congresso Mercosur de Producción Porcina. Buenos Aires. 22 a 25/10/2000.
- Boerlin P., Travis R., Gyles C. L., Reid-Smith R., Janecko N., Lim H., Nicholson V., Mcewen S. A., Friendship R. & Archambault M. 2005. Antimicrobial Resistance and Virulence Genes of *Escherichia coli* Isolates from Swine in Ontario. Appl Environ Microb. 71:6753-6761.
- Bogaard A.E.J.M van den, London N. & Stobberingh E. 2000. Antimicrobial resistance in pig faecal samples from the Netherlands (five abattoirs) and Sweden. J. Antimicrob. Chemother. 45:663-671.
- Campos L.C. & Trabulsi L. R. 1999. *Escherichia*, p.87-148. In: Trabulsi L.R., Alterthum F., Gompertz O.F. & Candeias J.A.N. *Microbiologia*. 3. ed. Atheneu, Rio de Janeiro.
- Costa M.M., Silva M.S., Spricigo D.A., Witt N.M., Marchioro S.B., Kolling L. & Vargas A.P.C. 2006. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. Pesq. Vet. Bras. 26:5-8.
- Filippsen L.F., Ribeiro J. & Leite D.M.G. 2005. Perfil de resistência e sensibilidade antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de leitões com diarreia criados ao ar livre na região sudoeste do Paraná, Brasil. Veterinária Notícias 11:53-58.
- Ferreira T., Franco R. M., Oliveira L.A.T., Carvalho J.C.A.P & Gonçalves P.M.R. 1996. Sensibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas de Produtos de Origem Animal (POA) e salmoura. Anais Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, p.285.
- Franco R.M., Oliveira, L.A.T. & Carvalho, J.C.A.P. 2006. Probióticos-Revisão. Hig. Alimentar 20:22-33.
- Franco R.M. 2002. *Escherichia coli*: Ocorrência em suínos abatidos na Grande Rio e sua viabilidade experimental em lingüiça frescal tipo toscana. Tese de Doutorado, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 153p.
- Hill S.M., Phillips A.D. & Walker-Smith J.A. 1988. Antibiotics for *Escherichia coli* gastroenteritis. Lancet, 1: 771-772.
- Macêdo N.R., Menezes C.P.L., Lage A.P, Ristow L.E., Reis A. & Guedes R.M.C. 2007. Detecção de cepas patogênicas pela PCR multiplex e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de leitões diarreicos. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 59:1117-1123.

Mantilla S.P.S., Franco R.M., Oliveira L.A.T., Santos E.B. & Gouvêa R. 2008. Resistência antimicrobiana de bactérias do gênero *Listeria* spp isoladas de carne moída bovina . Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 45:116-121.

Medeiros P.T., Padilha M.T.S., Padilha J.C.F., Espíndola F. & Maggioni R. 2009. Efeito de promotores de crescimento alternativos no desempenho e no custo de produção de frangos de corte. Biotemas 22:157-163.

Meng J., Zhao S., Doyle M.P. & Joseph S.W. 1998. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157:H7 and O157:NM isolated from animals, food and humans. J. Food Protect. 61:1511-1514.

Menin A., Reck C., Souza D., Klein C. & Vaz E. 2008. Agentes bacterianos enteropatogênicos em suínos de diferentes faixas etárias e perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. Cienc. Rural 38:1687-1693.

Salyers A.A. & Amabile-Cuevas C.F. 1997. Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination? Antimicrob Agents Ch. 41:2321-2325.

Schroeder C.M., Zhao C., Debroy C., Torcolini J., Zhao S., White D.G., Wagner D.D., Mcdermott P.F.R., Walker D. & Meng J. 2002. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from humans, cattle, swine, and food. Appl. Environ. Microb. 68:576-581.

Silva F.F.P., Santos M.A.A. & Schmidt V. 2008. Resistência a antimicrobianos de *Escherichia coli* isolada de dejetos suínos em esterqueiras. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 60:762-765.

Silva R.A., Pinto C.R.O., Mantilla S.P.S., Santos E.B. & Franco R.M. 2009. *Escherichia coli* : Determinação do número mais provável pela técnica de miniaturização e susceptibilidade antimicrobiana em linguiças frescas suínas. Anais da II Mostra UFF em Higiene e Tecnologia de Alimentos, Niterói, RJ. CD-ROM.

Tavares W. 1990. Manual de Quimioterápicos Antifécciosos. Editora Atheneu, Rio de Janeiro, 770p.