

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

THIAGO RANOLFI

**PERFIL DE SENSIBILIDADE *IN VITRO* DE *Escherichia coli*
ISOLADOS DE ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

LONDRINA
2014

THIAGO RANOLFI

**PERFIL DE SENSIBILIDADE *IN VITRO* DE *Escherichia coli*
ISOLADOS DE ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso 2 do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, *campus* Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos

Orientadora: Prof^a Dr^a Luciana Furlaneto-Maia

LONDRINA
2014

THIAGO RANOLFI

**PERFIL DE SENSIBILIDADE *IN VITRO* DE *Escherichia coli* ISOLADOS DE
ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL**

Monografia apresentada ao Curso de Tecnologia em Alimentos da Universidade
Tecnológica Federal do Paraná, *campus* Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Caroline Maria Calliari
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. Givan Jose Ferreira Dos Santos
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dra. Luciana Furlaneto-Maia
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Orientadora

Londrina, 04 de fevereiro de 2014

RESUMO

RANOLFI, Thiago. **Perfil da sensibilidade *in vitro* de *Escherichia coli* isolados de alimentos de origem animal**. 2014. 33f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Tecnologia em Alimentos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2014.

Diversos estudos indicam contaminação microbiana em queijos Minas frescal, carne suína e carne de frango, fator que prejudica a qualidade e integridade destes produtos. Um dos patógenos frequentemente encontrados nestes produtos é a bactéria *Escherichia coli*, micro-organismo diretamente relacionado à manipulação inadequada dos alimentos e falta de higiene durante o processamento. O objetivo deste trabalho foi verificar a sensibilidade *in vitro* de isolados de *E. coli* provenientes de queijo minas frescal, carne de frango e carne suína. A sensibilidade microbiana foi realizada pelo teste preconizado pelo Nacional Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Os antimicrobianos utilizados para verificar a sensibilidade foram a ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol, amoxicilina, ciprofloxacina, gentamicina, norfloxacina, estreptomicina, vancomicina, eritromicina, amicanina, ácido nalidíxico, imipenen, teiclopanina, imipenem e penicilina frente a 61 isolados de *E. coli*. Os resultados apresentaram cepas de *E. coli* multirresistentes provenientes de carne de frango e carne suína. Cepas provenientes de queijo Minas frescal apresentaram alta sensibilidade aos antimicrobianos testados. Todos os isolados foram resistentes aos antimicrobianos eritromicina e tetraciclina.

Palavras-chave: Queijo Minas frescal. Carne suína. Carne de frango. Micro-organismos. Antimicrobianos.

ABSTRACT

RANOLFI, Thiago. **Sensibility profile *in vitro* of *Escherichia coli* isolated from food of animal origin**. 2014. 33p. Completion of course work (Superior course of Food technology) - Federal Technology University - Paraná. Londrina, 2014.

Several studies indicate microbial infection at minas fresh cheese, pork and chicken meat, this factor damage the quality and integrity of these products. One of these pathogens that frequently found was *Escherichia coli* bacterium, microorganism directly related at food improper handling and lack hygiene during the processing. The objective of this work was verifying the sensibility *in vitro* *E. coli* isolated from minas fresh cheese, pork and chicken meat. The microbial sensibility was done by Nacional Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). The antimicrobials used to sensibility verify were ampicillin, tetracycline, chloramphenicol, amoxicillin, ciprofloxacin, gentamicin, norfloxacin, streptomycin, vancomycin, erythromycin, amicanina, nalidixic, imipenem, teiclopanina, imipene and penicillin on sixty-one *E. coli* isolated. The results shown *E. coli* strains multiresistant from chicken meat and pork. The strains from fresh cheese shown high sensibility by antimicrobial tested. Every isolated were resistant to erythromycin and tetracycline antimicrobials.

Key-words: Minas frescal cheese. pork Chicken meat. Micro-organisms. antimicrobial.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Esquema de análise de coliformes totais e termotolerantes em alimentos pelo método do NMP.....17
- Figura 2** - Em (A) Semeadura em caldo Mueller-Hinton com um palito de poliuretano estéreo; em (B) Deposição dos discos com antimicrobianos.....19
- Figura 3** - Parte da tabela do teste de sensibilidade a antimicrobianos. Valores em mm para definir sensibilidade, resistência intermediária e resistência a agentes antimicrobianos específicos.....20
- Figura 4.** Parte da tabela do teste de sensibilidade a antimicrobianos. Valores em mm para definir sensibilidade, resistência intermediária e resistência a agentes antimicrobianos específicos.....21
- Figura 5** - Gráfico do perfil de resistência aos antimicrobianos cepas de *Escherichia coli* isoladas de alimentos.....26

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Perfil de sensibilidade e resistência antimicrobiana das cepas de *Escherichia coli* isoladas de carne de frango.....22
- Tabela 2** - Perfil de sensibilidade e resistência antimicrobiana das cepas de *Escherichia coli* isoladas de carne suína.....23
- Tabela 3:** Perfil de sensibilidade e resistência antimicrobiana das cepas de *Escherichia coli* isoladas de queijo Minas frescal.....24

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	07
2 OBJETIVOS	08
2.1 OBJETIVO GERAL	08
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	08
3 REFERENCIAL TEÓRICO	09
3.1 COLIFORMES TOTAIS E TERMOTOLERANTES.....	09
3.2 <i>ESCHERICHIA COLI</i>	09
3.3 <i>ESCHERICHIA COLI</i> EM ALIMENTOS.....	11
3.4 ANTIMICROBIANOS.....	14
4 MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 ISOLADOS DE <i>E. COLI</i>	16
4.2 REATIVAÇÃO DOS ISOLADOS	16
4.3 TESTE DE DIFUSÃO EM DISCO	19
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5.1 PERFIS DE SUSCEPTIBILIDADE	20
6 CONCLUSÕES	28
REFERÊNCIAS	29

1 INTRODUÇÃO

Desde a década de 50, quando os antibióticos passaram a ser amplamente utilizados em terapêuticas humanas e animais, iniciou-se o fenômeno de resistência bacteriana. A seleção de linhagens bacterianas resistentes pode representar um risco para a sanidade animal e humana, por possibilitar o surgimento de bactérias multirresistentes. Os antimicrobianos podem ser utilizados na forma terapêutica, profilática e como promotor de crescimento.

Apesar da ampla preocupação sobre o tema, pouco se sabe sobre a resistência em bactérias isoladas de alimentos. Alimentos como queijo e carnes cruas representam um excelente meio de cultura para micro-organismos, por serem ricos em nutrientes essenciais, principalmente pela disposição de proteína e açúcares para o micro-organismo. Estes fatores podem favorecer que nestes alimentos ocorra o desenvolvimento de micro-organismos potencialmente patogênicos, podendo causar toxi-infecções se ingeridos. Dentre os micro-organismos cita-se a *Escherichia coli*. Condições higiênico-sanitárias deficientes durante o abate ou preparo do produto e armazenamento impróprio favorecem a contaminação e desenvolvimento dessa bactéria nos alimentos.

E. coli é uma bactéria que pertence ao grupo dos coliformes termotolerantes e sua presença indica, necessariamente, que ocorreu contaminação de origem fecal durante a produção, já que esse micro-organismo tem como *habitat* primário o trato intestinal de humanos e animais. Alguns sorogrupos desta bactéria são patogênicos ao homem e animais, com o agravante de apresentar resistência a diversos agentes antimicrobianos.

Com base nessa problemática, destaca-se a importância de determinar a resistência de bactérias isoladas de alimentos, frente a antimicrobianos de uso clínico.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a sensibilidade a antimicrobianos de isolados *E. coli* de amostras de alimentos.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- determinar a sensibilidade a antimicrobianos de *E. coli* provenientes de amostras de carne de frango, carne suína e queijo Minas frescal.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 COLIFORMES TOTAIS E TERMOTOLERANTES

O grupo dos coliformes totais inclui bactérias da família *Enterobacteriaceae*, que fermentam a lactose, com formação de gás, a 37°C por 48h. São bactérias Gram negativas, anaeróbias facultativas e não esporogênicas (LANDGRAF, 2005).

O grupo dos coliformes termotolerantes inclui bactérias que fermentam a lactose com produção de gás à temperatura de incubação de 44 - 45°C. Fazem parte desse grupo os seguintes gêneros: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*. Todos estes gêneros podem ser encontrados em fezes, vegetais e solo, porém somente a espécie *E. coli* tem como *habitat* primário o trato intestinal do homem e de animais (LANDGRAF, 2005). Sua ocorrência em alimentos é avaliada sob dois aspectos:

(1) Por ser uma enterobactéria, sua presença no alimento indica uma contaminação de origem fecal, sendo, portanto, considerado como “condições higiênicas sanitárias insatisfatórias”; e

(2) Algumas cepas são patogênicas para o homem e animais, causando diarreias e podendo levar a morte (NATARO e KAPPER, 1998).

3.2 *ESCHERICHIA COLI*

E. coli tem obtido destaque entre os patógenos alimentares, principalmente em países desenvolvidos, pelas suas características de virulência. Esta bactéria pode ser classificada com base nos fatores de virulência, sendo descritos 6 sorotipos: (1) *E. coli* enteropatogênica (EPEC), (2) *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), (3) *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), (4) *E. coli* enterro-hemorrágica (EHEC), (5) *E. coli* enteroagregativa (EA_gEC) e (6) *E. coli* difusamente adesiva (*diffusely adherent E. coli*) (NATARO; KAPER, 1998).

O sorotipo O157:H7 produz uma potente toxina, que pode causar doença severa, entre elas a síndrome urêmica hemolítica. Este sorotipo foi responsável por diversos surtos alimentares nos Estados Unidos entre os anos de 2006 e 2009 (CDC, 2010).

Os tratos intestinais de bovinos e ovinos são as principais fontes de *E. coli* enterro-hemorrágica. Em aves e suínos, apesar de dificilmente serem encontradas, há relatos de isolamento desse micro-organismo no trato intestinal desses animais. Já ocorreram surtos ocasionados por produtos cárneos mal cozidos, leite cru, molhos para salada, maionese e suco de maçã. No Brasil, no período de janeiro de 1997 a outubro de 1999, o ITAL (Instituto de Tecnologia de Alimentos) avaliou a qualidade microbiológica de 2095 amostras de alimentos e não foi detectada a presença de *E. coli* em nenhuma das amostras mostrando que a ocorrência no Brasil deve ser significativamente mais baixa do que em outros países como o EUA que apresentou 2,5% das amostras, de carnes testadas estava contaminado com *E. coli* (KNIGHT, 1993).

A diarreia causada pela infecção por *E. coli* é muito mais severa do que aquelas causadas por outros micro-organismos patogênicos. É acompanhada de dores abdominais, vômitos e febre. A doença dura em torno de seis horas até três dias com incubação de 17 a 72 horas (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

E. coli Enteropatogênica Clássica (EPEC) é um sorotipo muito conhecido que causa gastroenterites em crianças. A contaminação por esse micro-organismo se caracteriza pelos seguintes sintomas: diarreia acompanhada de dores abdominais, vômitos e febre, com a doença durando cerca de três a seis dias. A patogenicidade dessa cepa se deve à capacidade de adesão e destruição das microvilosidades das células intestinais. A EPEC está entre os principais agentes enteropatogênicos, em especial na diarreia do lactente, com altos índices de mortalidade. Esse micro-organismo é responsável por cerca de 30% de diarreia aguda em crianças pobres com idade inferior a seis meses (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

E. coli Enterotoxigênica (ETEC) são cepas de *E. coli* que produzem enterotoxinas que são nocivas para os seres humanos. Os sintomas da doença causada por ETEC, quando muito grave, se parecem com os da cólera: fezes aquosas e desidratação, e se tratando de pessoas com quadro de desnutrição, a desidratação ocorre de maneira muito severa. As bactérias desse grupo são

as causas principais de diarreia em países subdesenvolvidos pelo fato de não oferecerem condições de saneamento básico ou inadequado. ETEC é considerada uma das principais causas da chamada “diarreia do viajante” que acomete pessoas que se deslocam com frequência para esses países subdesenvolvidos. Surtos de contaminação por *E. coli* enterotoxigênica em países da Europa e EUA estão ligados ao consumo de água e/ou alimentos contaminados por esse micro-organismo (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Devido às características de seu genoma e rápido tempo de geração, a *E. coli* funciona como micro-organismo modelo para diversos estudos, inclusive de resistência a antimicrobianos.

3.3. *ESCHERICHIA COLI* EM ALIMENTOS

Os principais fatores que contribuem para os surtos de origem alimentar são a temperatura inadequada de armazenagem, tempo e temperatura de cozimento incorretos, equipamentos e utensílios contaminados, matéria-prima de qualidade insatisfatória e más condições higiênicas dos manipuladores (ANDRADE *et al.*, 2008).

Estudos desenvolvidos em diversos países, afirmam que a contaminação microbiana dos alimentos é fato incontestável, sendo identificada a veiculação de microrganismos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e *Vibrio cholerae* entre outros (MULETA; ASHENAFI, 2001).

Alimentos de origem animal, como ovos, carnes, leite e seus derivados são os mais frequentemente envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos. Os agentes patogênicos veiculados por eles são na maioria bactérias (GERMANO; GERMANO, 2008).

No Brasil, cepas de *E. coli* resistentes tem sido identificadas em diversas fontes tais como dejetos suínos (SILVA; SANTOS; SCHMIDT, 2008), leite (MOREIRA *et al.*, 2008), produtos de origem animal (MARTINS *et al.*, 2003; CAMPOS *et al.*, 2006;).

O queijo Minas frescal é considerado um tipo de queijo desenvolvido no Brasil com origem nas fabricações caseiras difundidas no estado de Minas Gerais, as quais se expandiram para todo o país. Anteriormente conhecido como Queijo-de-Minas, deu origem aos queijos: Minas frescal, Minas Curado ou Minas Padrão ou Prensado, Queijo do Serro, Queijo de Coalho, queijo Minas de Araxá entre outros (ABREU, 1999). É um produto de grande popularidade, aceitação, consumo e produção em quase todo o país. Sua massa é crua, com alto teor de umidade (46 – 55%) e não maturada, por isso deve ser consumido nos primeiros quinze dias após sua fabricação, sendo, portanto, um produto altamente perecível (HOFFMANN; SILVA; VINTURIM, 2002). O interesse por este produto se deve ao fato de que o queijo Minas está relacionado a doenças de origem alimentar.

Segundo Silveira, Carvalho e Teixeira (1998), a qualidade higiênica insatisfatória do leite produzido no Brasil é um problema crônico, de difícil solução, porque fatores de ordem social, econômica e cultural estão envolvidos e não têm recebido a devida atenção no campo político, apesar do importante papel representado pelo leite na alimentação da população.

A qualidade do leite cru está associada à carga microbiana presente e a microbiota inicial terá uma influência direta na qualidade do leite pasteurizado, assim como nos produtos lácteos (MUTUKUMIRA *et al.*, 1996). A contaminação pós-pasteurização, produção, manipulação, equipamentos, temperaturas inadequadas durante o transporte e condições de estocagem podem resultar em altos níveis de micro-organismos patogênicos e enterotoxinas no queijo (ARAÚJO *et al.*, 2002).

No Brasil, tem-se evidenciado a presença de micro-organismos patogênicos em queijo Minas Frescal, sendo amplamente reconhecida a presença de coliformes fecais neste produto em vários estudos realizados em diferentes locais, como em cidades do interior do Paraná (KOTTWITZ; GUIMARÃES, 2003).

Em carnes de frango, o crescimento de micro-organismos e a atividade enzimática são os principais fatores limitantes da vida útil, frequentemente prolongada com a proteção das embalagens e aplicações de agentes descontaminantes (VENTURINI; SARCINELLI; SILVA, 2007).

A carne quando está fresca serve como excelente substrato para o desenvolvimento de micro-organismos e vermes, causando também intoxicações químicas, através de resíduos de aditivos. Por isso, o local de abate e manipulação da carne deve seguir as normas higiênicas (VENTURINI; SARCINELLI; SILVA, 2007).

A sanitização da carcaça pode ser incluída, como operação de rotina, no processo de abate de animais para consumo humano, no sentido de eliminar, ou pelo menos reduzir a incidência desses contaminantes. É importante ressaltar que alguns micro-organismos que aderem à carcaça, durante o abate, podem ser removidos após lavagem com água potável ou sanitização. Para sanitização de animais abatidos, usa-se ácido acético e láctico, pois estes apresentam baixa toxicidade para os humanos e alto para os micro-organismos. Esses ácidos podem aumentar a vida e prateleira da carne de frango. Para desinfecção das superfícies utilizadas no abate, recomenda-se o uso de hipoclorito de sódio e quaternário de amônia (VENTURINI; SARCINELLI; SILVA, 2007).

O aparecimento de cepas de *E. coli*, de origens variadas, multirresistentes aos antibióticos, foi relatado em diversos países (SAENZ *et al.*, 2004).

A carne suína é rica em nutrientes essenciais, sendo a proteína de origem animal mais consumida no mundo, contribuindo para obtenção de alimentação balanceada. Possui sabor e maciez característicos, além de ser fonte de vitaminas e minerais (VENTURINI; SARCINELLI; SILVA, 2007).

Atualmente, a qualidade da carne representa uma das principais preocupações, especialmente para consumidores mais exigentes. De modo geral, pode-se dizer que a qualidade da carne e da carcaça depende da interação de fatores intrínsecos e extrínsecos.

Como qualquer produto de origem animal, a carne suína pode servir de substrato para o desenvolvimento de vários micro-organismos, como também condutor de intoxicações químicas, resíduos de defensivos, de hormônios e aditivos intencionais. Todas as etapas do abate devem ser realizadas de forma higiênica e rápida, pois determinam a qualidade microbiológica da matéria prima.

3.4 ANTIMICROBIANOS

Antimicrobiano é qualquer substância de origem natural, semi-sintéticos ou sintéticos que, em concentrações *in vivo*, elimina ou inibe o crescimento de micro-organismos, interagindo com um alvo específico (CODEX, 2008).

A atuação dos antibióticos ocorre através da inibição de processos essenciais à multiplicação da célula bacteriana e, em última instância, a sua sobrevivência. Podem ser classificados em diferentes grupos em função da sua estrutura alvo na célula bacteriana, diferenciando-se em inibidores da membrana citoplasmática, inibidores da síntese de ácidos nucleicos, da síntese proteica ou da síntese da parede celular (MURRAY; ROSENTHAL; PEALLER, 2005).

Os primeiros estudos reportando resistência datam da década de 50. Kitamoto *et al.* (1965), estudando cepas de *Shigella* isoladas em 1955, de casos de disenteria bacilar no Japão, constataram resistência à estreptomicina, sulfadiazina, tetraciclina e cloranfenicol.

Mesmo em países como a Islândia, onde antimicrobianos são terminantemente proibidos como promotores de crescimento, há relatos de cepas de *E. coli* multirresistentes isoladas de animais (THORSTEINSDOTTIR, *et al.*, 2010).

O uso de agentes antimicrobianos nos alimentos para animais é mais claramente associado à resistência antimicrobiana em cepas de *Salmonella* e *Campylobacter* isoladas de humanos, mas também pode estar envolvido na resistência entre enterococos, *E. coli* e outras bactérias (ÂNGULO; NARGUND; CHILLER, 2004).

No que se refere especificamente à *Escherichia coli* comensal de animais é resistente à maioria dos agentes antimicrobianos comumente utilizados, como a tetraciclina, sulfametoxazole, ampicilina, estreptomicina e carbenicilina (ARTENCIO, 2007).

Tem sido relatado que estirpes de *E. coli* que colonizam o trato intestinal de frangos são capazes de ser transmitidas aos humanos através do contato íntimo, podendo, inclusive, ser isoladas de amostras fecais humanas

(MESSIER, *et al.*, 1993). A resistência dos micro-organismos aos antimicrobianos é um problema global de saúde pública que é impactado pelo uso de antimicrobianos em humanos e não-humanos. O aparecimento contínuo, o desenvolvimento e a disseminação de organismos patogênicos resistentes aos antimicrobianos são motivo de preocupação crescente. O envolvimento da Organização Mundial da Saúde (OMS) na contenção da resistência antimicrobiana, devido ao uso não-humano de antimicrobianos remonta à década de 1990 (WHO, 2010).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

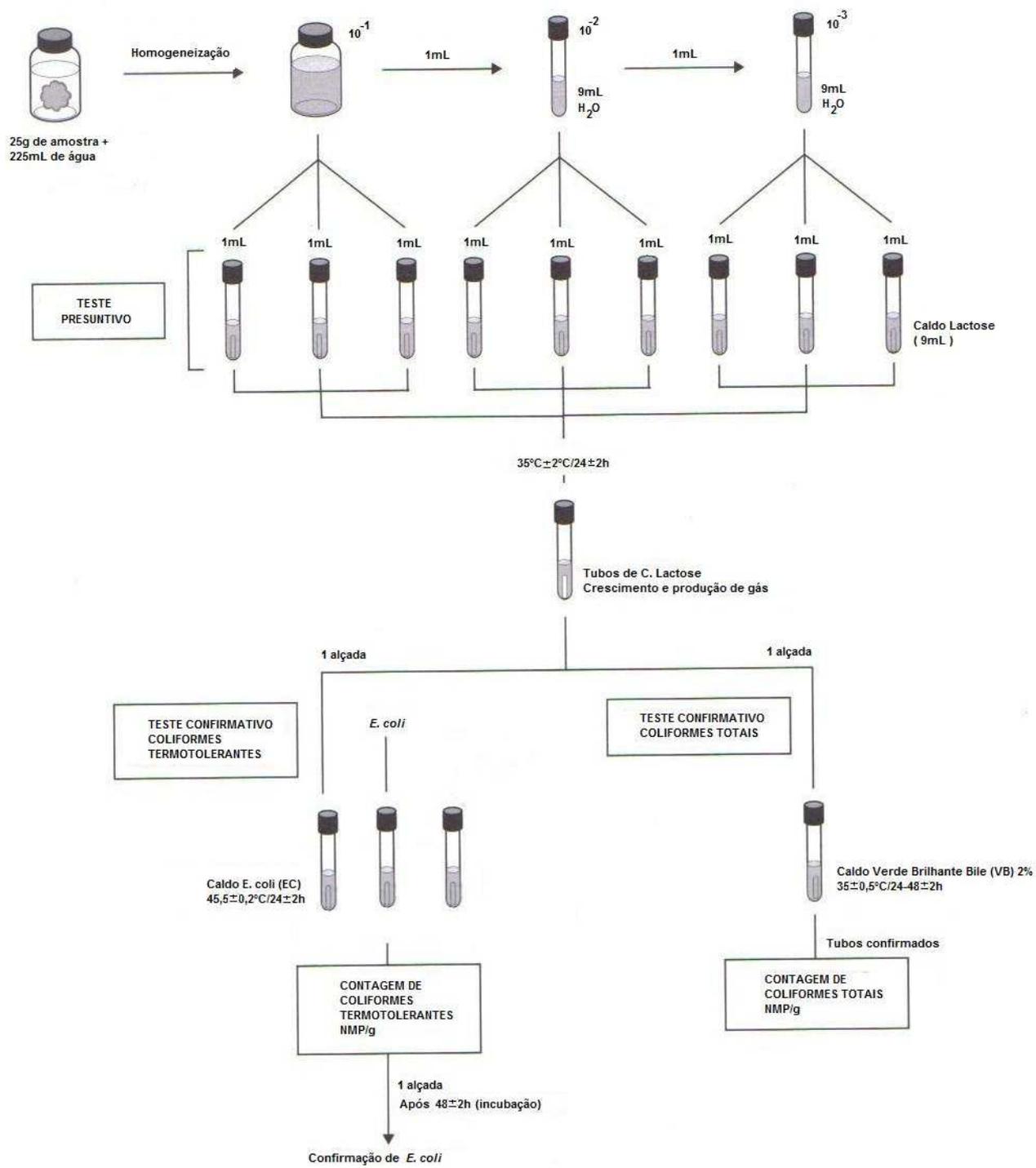
4.1 ISOLADOS DE *E. COLI*

As amostras de *E. coli* utilizadas neste trabalho foram isoladas de carne de frango, carne suína e queijo Minas frescal. As amostras foram identificadas fenotipicamente quanto ao gênero e espécie, segundo esquema descrito por Silva, 2007 (Figura 1).

As amostras foram armazenadas em tubo criogênico com glicerol e mantidas em freezer a -20°C.

4.2 REATIVAÇÃO DOS ISOLADOS

No momento do uso, os tubos criogênicos foram descongelados em refrigeração e uma alçada da amostra foi transferida para caldo LB (Luria Bertani). A cultura foi incubada a 37°C por 18-24 h. Transcorrido este período, uma alíquota da cultura foi semeada em ágar LB e incubada nas mesmas condições. A cultura proveniente deste cultivo foi utilizada para os testes de sensibilidade a antimicrobianos.



Continua

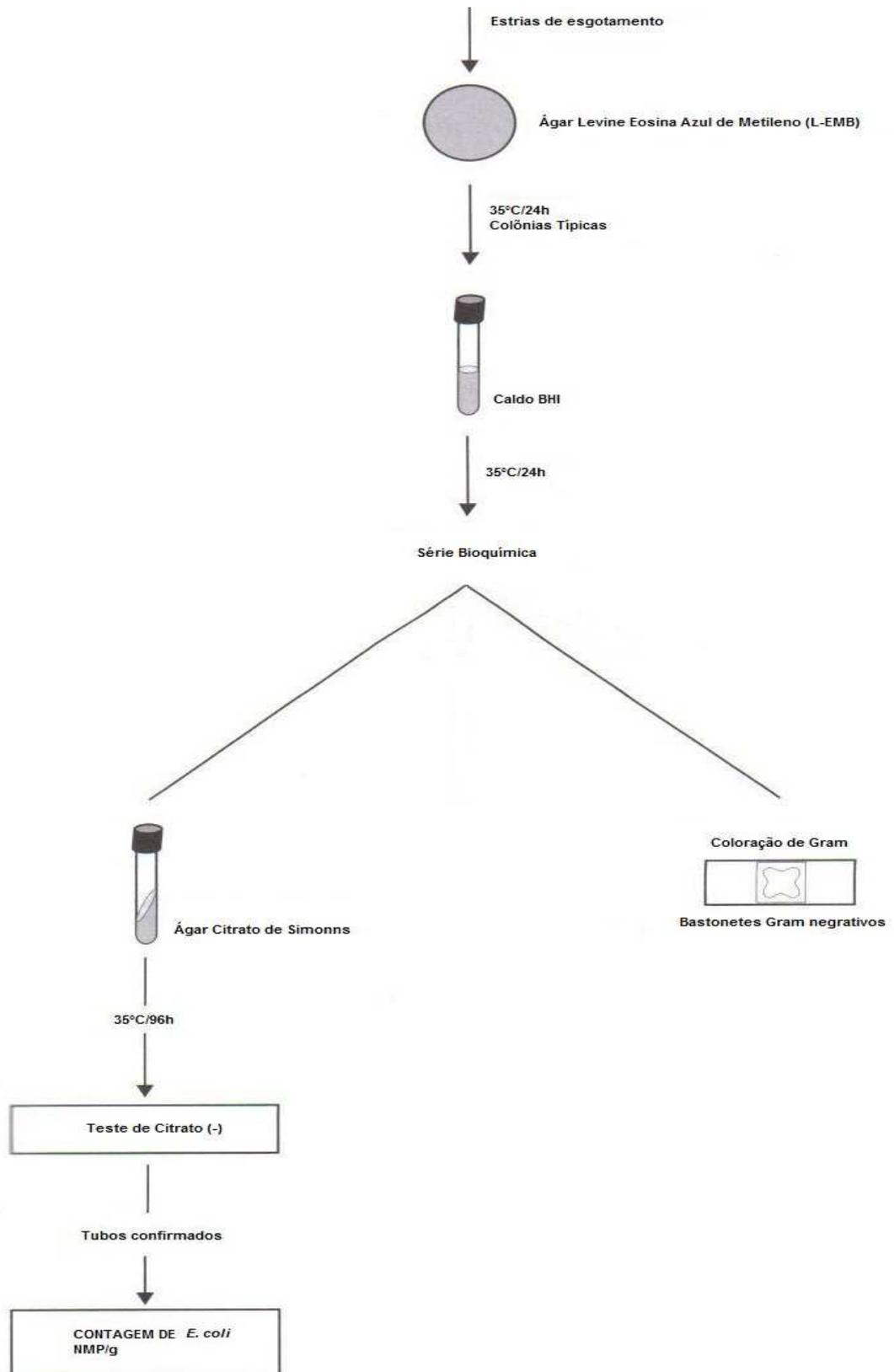


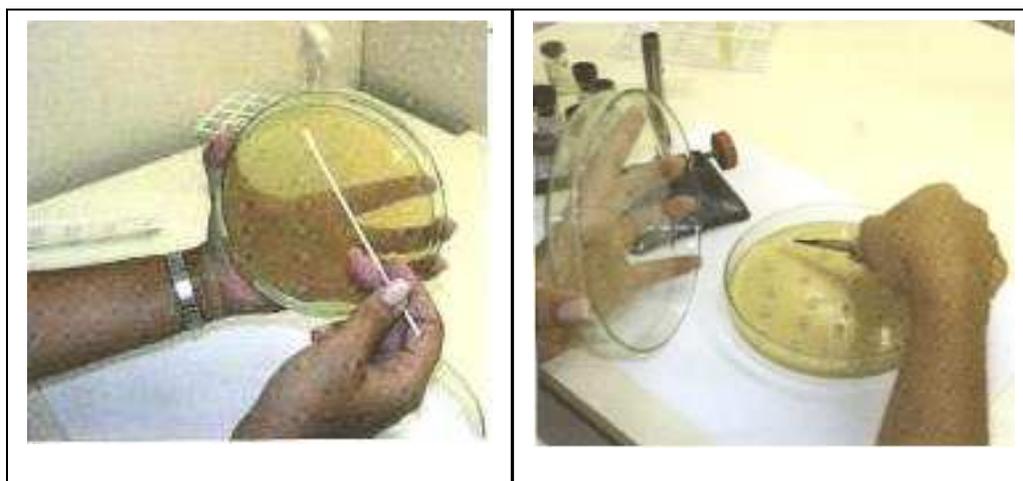
Figura 1: Esquema de análise de coliformes totais e termotolerantes em alimentos pelo método do NMP.
Fonte: SILVA, 2007

4.3 TESTE DE DIFUSÃO EM DISCO

Os isolados previamente reativados foram semeados em caldo Mueller-Hinton (MH) e incubados a 37°C até atingir turvação correspondente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml). O inóculo em ágar MH foi realizado por método de espalhamento em superfície, com auxílio de um suab. Um palito de polietileno estéril de +/- 15 cm com algodão numa das extremidades foi inserido na cultura e em seguida foi passado em zigue-zague em três direções distintas na superfície de ágar MH. Sob o inóculo foram depositados os discos de antibióticos impregnados com o agente antimicrobiano (figura 2).

Os isolados foram submetidos à avaliação frente aos antimicrobianos ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol, amoxicilina, ciprofloxacina, gentamicina, norfloxacina, estreptomicina, vancomicina, eritromicina, amicanina, nalidíxico, imipenemo, teicoplanina, imipene e penicilina, utilizando protocolo recomendado pelo NCCLS (2000).

As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e o halo de inibição foi medido e avaliado em tabela de sensibilidade.



A

B

Figura 2. Em (A) Semeadura em ágar Mueller-Hinton com um palito de poliuretano estéreo; em (B) Deposição dos discos com antimicrobianos.

Fonte: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAABm1IAL/analises-fisico-quimicas-bacteriologicas-mel?part=7>

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PERFIS DE SUSCEPTIBILIDADE

Neste estudo foram testadas 61 cepas de *E. coli*, sendo 30 (49,18%) isoladas de carne de frango, 14 (22,95%) de carne suína e 17 (27,87%) de queijo minas frescal.

A determinação da sensibilidade dos isolados de *E. coli*, seguiu o protocolo recomendado pelo NCCLS (2000). O halo de inibição foi mensurado com auxílio de régua milimétrica e o resultado confrontado na tabela de inibição da NCCLS e conforme mostrado na figura 3.

Quatro (13,33%) isolados de *E. coli* provenientes de carne de frango apresentaram resistência aos 12 antimicrobianos testados. Nas amostras de carne suína, 10 (71,43%) isolados apresentaram resistência a pelo menos 3 antimicrobianos e 2 (11,76%) isolados provenientes de amostras de queijo minas frescal apresentaram resistência a pelo menos 1 antimicrobiano testado.

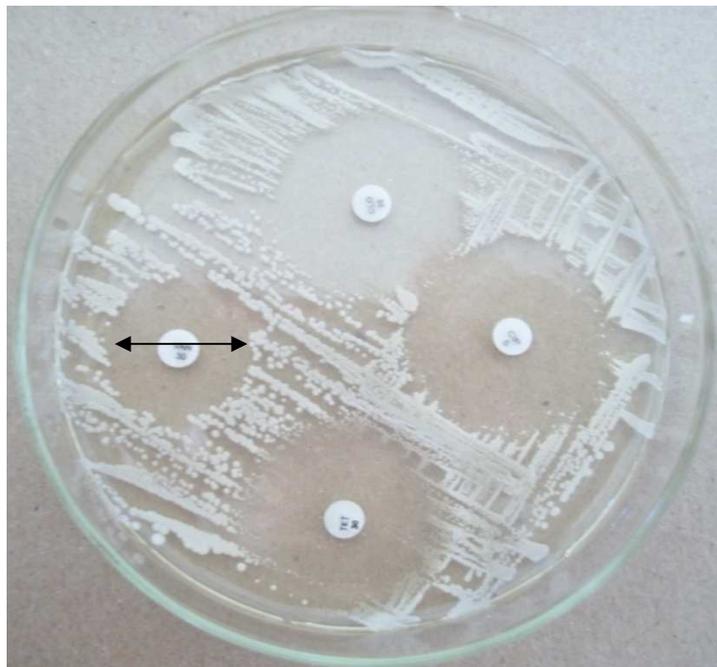


Figura 3. Colônia típica *E coli* inoculada em ágar Mueller Hinton adicionado de discos antimicrobianos. A seta indica halo de inibição causada pelo antibiótico.

Fonte: autoria própria

Agente antimicrobiano	Conteúdo do disco (µg) ^a	Pontos de corte do diâmetro de zona (mm mais próximo) ^a		
		S	I	R
Meticilina	5	≥ 14	10-13	≤ 9
Oxacilina	1	≥ 13	11-12	≤ 10
Cefoxitina	30	≥ 22	—	≤ 21
Vancomicina	—	—	—	—
Teicoplanina	30	≥ 14	11-13	≤ 10

Figura 4. Parte da tabela do teste de sensibilidade a antimicrobianos. Valores em mm para definir sensibilidade, resistência intermediária e resistência a agentes antimicrobianos específicos.

Fonte: Zurita, Mejia e Guzman-Branco. 2010.

Os perfis de sensibilidade e resistência antimicrobiana das 30 cepas de *E. coli* isoladas de carne de frango encontram-se na Tabela 1. O perfil de resistência em ordem decrescente ficou distribuído da seguinte forma: 93,33% das cepas foram resistentes à ciprofloxacina, 90% à tetraciclina, 83,33% à eritromicina, 80% a norfloxacina, 66,67% à vancomicina, 60% à estreptomicina, 50% à coranfenicol, 46,67% à penicilina, 43,33 à teicoplanina 36,67% à gentamicina e 26,67% à imipenem e ampicilina.

Tabela 1. Perfil de sensibilidade e resistência antimicrobiana das cepas de *Escherichia coli* isoladas de carne de frango.

Antimicrobiano	Resistente (%)	Sensível (%)	Intermediário (%)
GENTAMICINA	36,67	63,34	0
ESTREPTOMICINA	60	33,34	6,67
CIPROFLOXACINA	93,33	3,33	3,33
NORFLOXACINA	80	10	10
VANCOMICINA	66,67	13,3	20
TEICOPLANINA	43,33	23,33	33,33
ERITROMICINA	83,33	0	16,67
TETRACICLINA	90	3,33	6,66
CLORANFENICOL	50	40	10
PENICILINA	46,67	53,34	0
IMIPENEM	26,67	73,33	0
AMPICILINA	26,67	73,33	0

Dos isolados de *E. coli* 73% foram susceptíveis aos antibióticos imipenem e ampicilina e 63,34% foram sensíveis ao gentamicina. Por outro lado, os resultados de sensibilidade ao antibiótico ciprofloxacina demonstram ser o de menor eficiência contra o crescimento e evolução de cepas de *E. coli*. Dos isolados analisados, todos apresentaram resistência a mais de três antimicrobianos, demonstrando assim serem multirresistentes.

Estes achados são semelhantes àqueles reportados por Martins *et al.* (2003), que avaliaram 124 cepas de *E. coli* isoladas de alimentos de origem animal no estado do Ceará e constataram multirresistência em 63% delas, resultados similares também foram encontrados por Jouini *et al.* (2009) entre *E. coli* provenientes de alimentos de origem animal.

Os perfis de sensibilidade e resistência antimicrobiana das 14 cepas de *Escherichia coli* isoladas de carne suína encontram-se na Tabela 2. O perfil de resistência em ordem decrescente ficou distribuído da seguinte forma: 78,57%

das cepas foram resistentes à eritromicina, 71,42% à gentamicina, 64,28% à vancomicina, 57,14 % à tetraciclina.

Tabela 2. Perfil de sensibilidade e resistência antimicrobiana das cepas de *Escherichia coli* isoladas de carne suína.

Antimicrobiano	Resistente (%)	Sensível (%)	Intermediário (%)
GENTAMICINA	71,42	21,43	7,14
ESTREPTOMICINA	0	100	0
CIPROFLOXACINA	0	100	0
NORFLOXACINA	0	100	0
VANCOMICINA	64,28	35,71	0
TEICOPLANINA	0	100	0
ERITROMICINA	78,57	14,28	7,14
TETRACICLINA	57,14	28,57	14,28
CLORANFENICOL	0	100	0
PENICILINA	0	100	0
IMIPENEM	0	100	0
AMPICILINA	0	100	0

Os antimicrobianos estreptomicina, ciprofloxacina, norfloxacina, teicoplanina, cloranfenicol, penicilina, imipenen e ampicilina se mostraram eficazes contra as cepas de *E. coli* isoladas de carne suína. Do total de antibióticos, 4 (28,57%) se mostraram com sensibilidade intermediária aos antimicrobianos gentamicina, eritromicina e tetraciclina.

Por outro lado, os resultados do antibiótico eritromicina demonstra ser o de menor eficiência contra o crescimento e evolução de cepas de *E. coli*. Dos isolados analisados, dez amostras (71,42%) apresentaram resistência a mais de três antimicrobianos, demonstrando assim serem multirresistentes.

Em estudo semelhante, realizado por Jakobsen *et al.* (2010) na Dinamarca, o perfil de resistência às tetraciclina foi mais acentuado entre

cepas de alimentos do que clínicas. Neste país a tetraciclina é muito utilizada principalmente nas criações de suínos (VIEIRA, *et al.*, 2009).

Os perfis de sensibilidade e resistência antimicrobiana das 17 cepas de *E. coli* isoladas de amostras de queijo minas frescal analisadas encontram-se na Tabela 3. O perfil de resistência ao antibiograma se apresentou da seguinte forma: 5,88% eritromicina, tetraciclina e amoxicilina.

Tabela 3: Perfil de sensibilidade e resistência antimicrobiana das cepas de *Escherichia coli* isoladas de queijo minas frescal.

Antimicrobiano	Resistente (%)	Sensível (%)	Intermediário (%)
CLORANFENICOL	0	100	0
GENTAMICINA	0	100	0
ERITROMICINA	5,88	35,29	58,82
CIPROFLOXACINA	0	100	0
TETRACICLINA	5,88	88,23	5,88
AMICANINO	0	100	0
NORFLOXACINA	0	100	0
IMIPENEM	0	100	0
AMPICILINA	0	94,12	5,88
AMOXICILINA	5,88	94,12	0
NALIDÍXICO	0	100	0

Em um estudo semelhante realizado por Campos *et al.* (2006) de *E. coli* isolados de queijo Minas Frescal, observou-se resistência (4,0%) à ampicilina, ao sulfametoxazol trimetoprim e à tetraciclina e susceptibilidade aos demais antibióticos. Em relação ao leite cru, maior resistência (18,2%) foi encontrada para tetraciclina, sendo que nenhum isolado apresentou resistência à ciprofloxacina e à gentamicina.

A maioria dos isolados de *E. coli* foi susceptível à cloranfenicol, gentamicina, ciprofloxacina, amicanino, nirfloxacina, imipene, nalidixico, todos apresentando 100% de eficiência. A amoxicilina e ampicilina apresentaram 94,12% de eficiência. Algumas amostras apresentaram resistência intermediária ao antibiograma Eritromicina (58,82%), tetraciclina e amoxicilina (5,88%).

Dos isolados analisados, apenas uma cepa apresentou resistência a dois antimicrobianos, demonstrando assim serem sensíveis.

Pelo teste de sensibilidade a antimicrobianos, pode-se observar que *E. coli* provenientes de amostras de carne de frango e carne suína apresentaram elevada resistência a diversos antibióticos, e salienta que cinco colônias obtidas de carne de frango apresentaram resistência a todos os antibióticos testados.

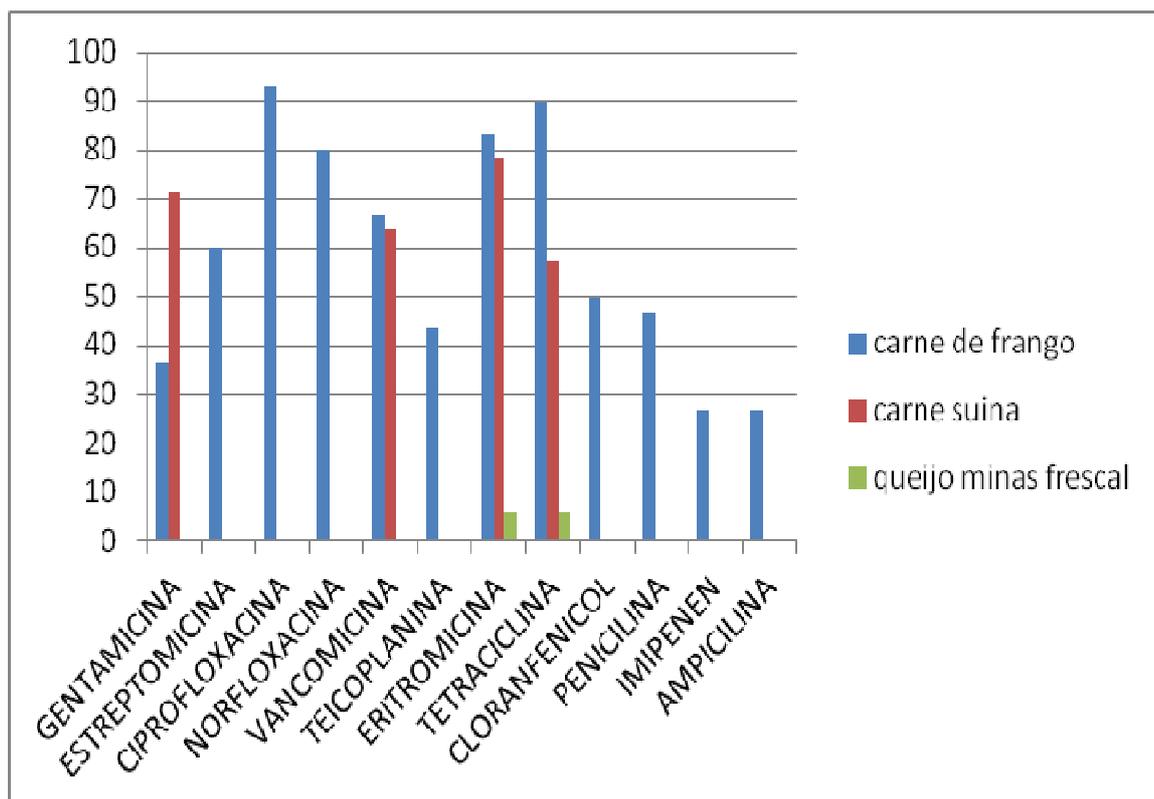


Figura 5. Gráfico do perfil de resistência aos antimicrobianos cepas de *Escherichia coli* isoladas de alimentos.
Fonte: autoria própria

Segundo Sena (2000), a elevada resistência múltipla a antibióticos representa um risco potencial à saúde pública e pode dificultar o tratamento de doenças, agravando quadros clínicos potencialmente curáveis. Esse aparecimento de bactérias resistentes a antibióticos também pode ser considerado como manifestação natural regida pelo princípio evolutivo da adaptação genética de organismos a mudanças no seu meio ambiente. Como o tempo de duplicação das bactérias pode ser de apenas 20 minutos, existe a possibilidade de serem produzidas muitas gerações em apenas algumas horas, havendo, portanto, inúmeras oportunidades de adaptação evolutiva (SILVEIRA; NOME; GESSER, 2006).

As amostras de *E. coli* isoladas de alimentos estão em consonância com os achados de Jakobsen *et al.* (2010) onde isolados clínicos de *E. coli* apresentaram maior percentual de resistência para ampicilina, trimetoprim/sulfametoxazol e tetraciclina, nesta ordem.

O queijo minas frescal por ter um preço acessível e ser de fácil fabricação, é um produto amplamente consumido em diversas regiões do Brasil (SABIONI; HIROOKA; SOUZA, 1998). A pecuária de leite, associada à fabricação artesanal de queijos com venda direta ao consumidor em feiras livres, é comum em diversas regiões do país. Entretanto, na maioria das vezes, estes produtos são elaborados a partir de leite sem qualquer tratamento térmico, com condições higiênico-sanitárias duvidosas, o que leva à produção de um derivado de qualidade inferior, senão potencialmente capaz de comprometer a saúde de seus consumidores (SILVA, 1998).

Os possíveis defeitos encontrados nestes produtos estão relacionados diretamente com a qualidade físico-química da matéria-prima utilizada, bem como a má higiene do local onde está sendo fabricado o queijo, a manipulação inadequada e a permanência do produto, desde a produção até sua comercialização, em temperaturas que suportam o desenvolvimento de micro-organismos prejudiciais à saúde do homem, sendo, portanto, um problema de Saúde Pública (BARROS, et al., 2004).

6. CONCLUSÕES

As cepas de *E. coli* isoladas de carne de frango apresentaram altos percentuais de resistência aos antimicrobianos. A maioria das cepas foi resistente a metade dos 12 antimicrobianos testados. Dentre as cepas resistentes, houve prevalência de resistência à ciprofloxacina, eritromicina, tetraciclina, norfloxacina, vancomicina, estreptomicina as cepas oriundas de alimentos, essa prevalência foi maior para tetraciclina.

As cepas isoladas de carne suína apresentaram resistência a 4 antimicrobianos dos 12 testados. Os que apresentaram maior resistência foram a eritromicina, gentamicina, vancomicina e tetraciclina. Apesar de a maioria das cepas ter sido sensíveis aos antimicrobianos testados, observou-se, entre as resistentes, percentuais elevados de multirresistência.

As bactérias encontradas em queijo Minas frescal apresentaram resultados satisfatórios, apenas 3 dos 11 antimicrobianos testados apresentaram resistência aos antimicrobianos, sendo o percentual de 5,88% para eritromicina, tetraciclina e amoxicilina. Apesar de haver 58,82% das cepas com sensibilidade intermediária para eritromicina, podemos observar dentre as resistentes, baixos percentuais de resistência.

Avaliando os resultados de todas as cepas de *E. coli* testadas, independentemente da origem das mesmas, a eritromicina e a tetraciclina apresentaram resistência em todas as amostras.

REFERÊNCIAS

ABREU, L. R. **Tecnologia de leite e derivados**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1999. p. 215-216.

ANDRADE, N. J. de *et al.* Controle de doenças de origem alimentar no processamento de alimentos. In: ANDRADE, N. J. de. **Higiene na Indústria de Alimentos**. São Paulo: Varela, 2008. p. 226-269.

ÂNGULO, F. J.; NARGUND, V. N.; CHILLER, T. C. Evidence of an association between use of anti-microbial agents in food animals and anti-microbial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v. 51, n. 8-9, p. 374-379, Nov. 2004.

ARAÚJO, V.S. *et al.* Occurrence of Staphylococcus and enteropathogens in soft cheese 23 commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**. v.92, n.6, p.1172-1177, 2002.

ARTENCIO, J. O. **Perfil de resistência a antimicrobianos de amostras de Escherichia coli de origem aviária isoladas no estado do rio grande do sul**. 2007. 51 f. Programa de Pós-graduação em ciências veterinárias Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2007.

BARROS, P.C.O.G. *et al.* Avaliação da qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado no município do Rio de Janeiro, RJ. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.18, n.122, p.32-37, Julho, 2004.

CAMPOS, M. R. H. *et al.* caracterização fenotípica pelo antibiograma de cepas de *Escherichia coli* isoladas de manipuladores, de leite cru e de queijo “Minas Frescal” em um laticínio de Goiás, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.4, p.1221-1227, jul-ago, 2006.

CDC. Centers for Diseases Control and Prevention. **Foodborne Illness**, 2010. Disponível em <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/foodborne_infections_g.htm>. Acesso em: 05 dez 2014.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Report Of The Second Session Of The Codex Ad Hoc Intergovernmental Task Force On Antimicrobial Resistance**. ALINORM 09/32/42. 32ª Ed. Seoul, Republic of Korea, October

2008.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microrganismos Patogênicos de Importância em Alimentos. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. p. 33-81.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. 3. ed. São Paulo: Manole, 2008.

HOFFMANN, F. L.; SILVA, J. V.; VINTURIM; T. M. Qualidade microbiológica de queijos tipo “Minas frescal”, vendidos em feiras livres na região de São José do Rio Preto, SP. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 96, p. 69 - 76, may. 2002.

JAKOBSEN, L. *et al.* *Escherichia coli* isolates from broiler chicken meat, broiler chickens, pork, and pigs share phylogroups and antimicrobial resistance with community-dwelling humans and patients with urinary tract infection. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 05, p. 537-547, 2010.

JOUINI, A. *et al.* Detection of multiple-antimicrobial resistance and characterization of the implicated genes in *Escherichia coli* isolates from foods of animal origin in Tunis. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 5, p. 1082-1088, may. 2009.

KITAMOTO, O. *et al.* Drug-sensitivity of *Shigella* strain isolated in 1955. **Journal Japan Association Infectious Disease**, v. 30, p.403-404, 1965.

KNIGHT, P., Hemorrhagic *Escherichia coli*: the danger increases. **American Society for Microbiology News**. v. 59, n. 5, p. 247-250, 1993

KOTTWITZ, L. B. M.; GUIMARÃES, I. M. Avaliação microbiológica de queijos Coloniais produzidos no Estado do Paraná. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.17, n.114/115, p.77-80, 2003.

LANDGRAF, M. Microrganismos Indicadores. In: FRANCO, Bernadette D. G. M., LANDGRAF, Mariza. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 27-31.

MARTINS, S. C. S. *et al.* “Screening” de linhagens de *Escherichia coli* multiresistentes a antibióticos, em alimentos de origem animal, no estado do Ceará, Brasil. **Higiene Alimentar**, v.17, n. 104/105, p. 71-76, jan/fev, 2003.

MESSIER, S. *et al.* Focal Dermatitis and Cellulitis in Broiler Chickens: **Bacteriological and Pathological Findings.** *Avian Disease*, v.37, p.839-844, 1993.

MOREIRA, M. A. S. *et al.* Resistência a antimicrobianos dependente do sistema de efluxo multidrogas em *Escherichia coli* isoladas de leite mastítico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 6, p.1307-1314, dez. 2008.

MULETA, D.; ASHENAFI, M. *Salmonella*, *Shigella* and growth potential of other food-borne pathogens in Ethiopian street vended foods. **East African Medical Journal**, Kenya, v. 78, n. 11, p.576-580, 2001.

MURRAY, P.; ROSENTHAL, K.; PEALLER, M. **Medical Microbiology**. 3. ed. Elsevier Mosby, USA. 2005 .

MUTUKUMIRA, A. N. *et al.*, Chemical and microbiological quality of raw Milk produced by smallholder farmers in Zimbabwe. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 9, p. 984 - 987, set. 1996.

NATARO, J. P. KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Rev.** 142-201, 1998.

SABIONI, G.J.; HIROOKA, Y. E.; SOUZA, R.L.M. Intoxicação alimentar por queijo minas contaminado com *Staphylococcus aureus* . **Revista da Saúde Pública**, São Paulo, v.22, n.5, out. 1998.

SAENZ, Y. *et al.* Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 48, n. 10, p. 3996–4001, Oct. 2004.

SENA, M.J. **Perfil epidemiológico, resistência a antibióticos e aos conservantes nisina e sistema lactoperoxidase de Staphylococcus sp. isolado de queijos coalho comercializados em Recife/PE.** 2000. 75 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

SILVA, N. *et al.* Contagem de Coliformes Totais, Coliformes Termotolerantes e *Escherichia coli*. In: _____. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 3 ed. São Paulo: Varela, 2007a. p. 119 – 135.

SILVEIRA, G.P.; NOME, F.; GESSER, J.C.; SÁ, M.M. Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 844-855, 2006.

SILVEIRA, I. A. CARVALHO, E. P. TEIXEIRA, D. Influência de microrganismos psicrotróficos sobre a qualidade do leite refrigerado. Uma revisão. **Higiene Alimentar**. v.12. n. 55. p. 21-28. mai/jun. 1998.

SILVA, C.A.M. Avaliação da qualidade microbiológica de queijo minas frescal consumido na cidade do Rio de Janeiro. In: **Congresso brasileiro de ciências e tecnologia de alimentos**, 17, Fortaleza. Anais. Fortaleza, p.134, 1998.

SILVA, F. F. P.; SANTOS, M. A. A.; SCHMIDT, V. Resistência a antimicrobianos de *Escherichia coli* isolada de dejetos suínos em esterqueiras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 3, p. 762-765, jun. 2008.

THORSTEINSDOTTIR, T. R. *et al.* Prevalence and genetic relatedness of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolated from animals, foods and humans in Iceland. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, n. 3, p. 189-196, May. 2010.

VENTURINI, K. S.; SARCINELLI, M. F.; SILVA, L. C. Características da Carne de Frango. **Boletim Técnico**. Espírito Santo, Ago. 2007.

VENTURINI, K. S.; SARCINELLI, M. F.; SILVA, L. C. Características da Carne suína. **Boletim Técnico**. Espírito Santo, Ago. 2007.

VIEIRA, A. R. *et al.* Association between tetracycline consumption and tetracycline resistance in *Escherichia coli* from healthy danish slaughter pigs. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 1, p. 99-109, 2009.

ZURITA^I, Jeannete; MEJÍA^{II}, Carlos; GUZMÁN-BLANCO, Manuel. Diagnóstico e teste de sensibilidade para *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina na América Latina. **Braz J. Infect. Dis.**, v.14 supl. 2, Salvador, Dez. 2010.

WHO. World Health Organization. **Foodborne Disease**, 2010. Disponível em

<http://www.who.int/foodsafety/foodborne_disease/en/> Acesso em: 08 nov. 2013.