

ISOLAMENTO E PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE AMOSTRAS DE *ESCHERICHIA COLI* OBTIDAS DE CARNE COMERCIALIZADA NO MUNICÍPIO DE PETROLINA, PE

COSTA, F.R.L.¹; PEIXOTO, R.M.²; SÁ, M.C.A.¹; KREWER, C.C.⁵; MABONI, F.³; COSTA, M.M.⁵

Resumo

Amostras de carnes comercializadas em Petrolina foram submetidas a análise, para avaliar a presença da *Escherichia coli*, uma bactéria gram negativa, associada a diversas infecções nos seres humanos e nos animais. Utilizou-se 51 amostras de carnes adquiridas em feiras livres, supermercados e frigoríficos do município de Petrolina-PE. Para isolamento, uma quantidade de cerca de 10 g de cada amostra foi semeada em placas de agar Mac Conkey. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C, quando se realizou avaliação do crescimento microbiano. As colônias bacterianas com morfologia característica de *E. coli* foram submetidas à coloração de Gram e provas bioquímicas. O perfil de fímbrias e toxinas foi determinado pela técnica de PCR multiplex. Foi avaliado também, o padrão de sensibilidades dos isolados, pelo método de difusão em disco. Foram avaliados os seguintes antimicrobianos: ceftriaxona, gentamicina, lincomicina, sulfazotrim, norfloxacin, penicilina, nitrofurantoina, tetraciclina, ampicilina, oxacilina, ciprofloxacina, nalidixico, eritromicina, rifamicina, amicacina. Os resultados demonstraram que das 51 amostras analisadas nesse estudo, 35 (68,62%) foram positivas para *E. coli*. Uma amostra foi positiva para enterotoxina LT. Este trabalho mostra o isolamento de amostras de *E. coli*, a partir de alimentos de origem cárnea. Salienta-se para a presença de um fator de patogenicidade em uma das amostras, bem como para a resistência dos isolados a lincomicina, penicilina, oxacilina, eritromicina, rifamicina e tetraciclina.

Palavras - chave: *Escherichia coli*, carnes, coliformes fecais, PCR multiplex, sensibilidade antimicrobiana.

¹ Discente do curso de Zootecnia, Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF) - Rodovia BR 407, Km 12 – Lote 543 – Projeto de Irrigação Senador Nilo Coelho, s/nº, C1. CEP 56300-990 – Petrolina – PE, Brasil.

² Estudante do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), CEP 56300-990 - Petrolina-PE, Brazil.
e-mail: rodolfo_peixoto@yahoo.com.br

³ Estudante do Curso de Medicina Veterinária, UFSM

⁵ Professor - UNIVASF – Rodovia BR 407, Km 12 – Lote 543 – Projeto de Irrigação Senador Nilo Coelho, s/nº, C1. CEP 56300-990 – Petrolina – PE, Brasil.

ISOLATION AND SUSCEPTIBILITY TO ANTIMICROBIAL DRUGS OF *ESCHERICHIA COLI* SAMPLES OBTAINED OF MEAT IN PETROLINA, PE

Abstract

The present work analyze meat samples to evaluate the *Escherichia coli* presence, an gram negative bacteria, associated with several infections in human and animal. Fifty one meat samples from public markets, markets and slaughtered houses form Petrolina County were analyzed. Aliquots of 10 g were streaked in Mac Conkey agar using a sterile swab and loop. The plates were incubated at 37°C for 48 hours, when were evaluated the bacterial growth. The typical *E. coli* colonies were submitted to Gram Stain and biochemical tests. The fimbrial and toxins patterns were determined by multiplex PCR. The susceptibility to antimicrobial drugs was also determined by disc diffusion test. We evaluated: ceftriaxone, gentamicin, lincomycin, sulfazotrim, norfloxacin, penicilin G, nitrofurantoin, tetraciline, ampicilin, oxacilin, ciprofloxacin, nalidixic acid, erythromycin, rifamycin and amikacin. The results demonstrated that from 51 meat samples analyzed, 35 (68,62%) were positive to *E. coli*. One isolated carried LT toxin gene. We stress the potential of one isolate to causing disease in human, as well as to high resistance of isolates to antimicrobial drugs, specially lincomycin, penicillin G, oxacilin e tetraciline.

Keywords: meat, *Escherichia coli*, fecal coliforms, multiplex PCR, antimicrobial susceptibility

INTRODUÇÃO

A diarréia ocasionada por *Escherichia coli* compromete tanto a saúde humana como a dos animais. A enfermidade pode ser ocasionada por cepas enterotoxigênicas de *E.coli* (ETEC), as quais precisam se aderir à mucosa intestinal por meio de fímbrias e produzir uma ou mais enterotoxinas (LT, Sta, STb), que levam ao desenvolvimento de diarréia e desidratação, podendo resultar na morte dos animais. Os tipos de fímbrias bacterianas comumente associadas com essa doença são F4, F5, F6 e F41 (DEAN-NYSTROM et al.,1997). Nos humanos, a colibacilose ocorre pela ingestão de bactérias nos alimentos contaminados particularmente pelas fezes dos animais (GYLES e THOEN, 1993). *E.coli* enteropatogênica (EPEC) também pode ocasionar diversas infecções associadas à má absorção de nutrientes no homem (TENG et al.,2004).

A importância clínica destas bactérias tem sido relatada em outras espécies animais, como ruminantes, cães e macacos (BEAUDRY et al.,1996; NAKAZATO et al.,2004). Outra enfermidade ocasionada por *E.coli* enterohemorrágica (EHEC) é a síndrome hemolítica urêmica, que afeta principalmente idosos e crianças levando a várias alterações renais que podem provocar a morte. Diversas infecções fatais associadas ao consumo de alimentos contaminados têm sido relatadas (HART et al.,2004; LUKASOVA et al.,2004). Os produtos cárneos podem tanto ser contaminados na sua origem pela presença das fezes dos animais, como pela manipulação durante o seu preparo (JOHNSON et al., 2005).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a presença, o perfil de patogenicidade e de suscetibilidade aos antimicrobianos de amostras de *E. coli* obtidas de

produtos cárneos comercializados em estabelecimentos do município de Petrolina-PE.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal, no Campus da Fazenda Experimental da UNIVASF. Foram utilizadas 51 amostras de carne adquiridas em feiras livres, supermercados e frigoríficos do município de Petrolina-PE, as quais foram armazenadas em sacos plásticos individuais, identificadas e acondicionadas em isopor contendo gelo reciclado (4°C) até o processamento. No laboratório, foi utilizada uma quantidade de cerca de 10 g de cada amostra para semeadura em placas de agar MacConkey com o auxílio de *swab* estéril e alça de platina. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C, quando se realizou avaliação do crescimento microbiano. As colônias bacterianas com morfologia característica de *E. coli* foram submetidas à coloração de Gram e provas bioquímicas descritas por Quinn et al (1994) que incluem teste de oxidase, fermentação de açúcares, produção de enxofre, avaliação da motilidade, produção de gás e de ácido sulfídrico em meio TSI (Triple Sugar Iron).

O teste de sensibilidade dos isolados foi realizado pelo método de difusão em disco Kirby-Bauer modificado, a partir de uma turvação microbiana na escala 0,5 de Mac Farland em caldo Muller Hinton (BAUER et al., 1966). Essa cultura foi transferida com auxílio de *swab* estéril para placas de ágar Mueller Hinton, onde foram aplicados os discos contendo antimicrobianos: ceftriaxona (30mcg), gentamicina (10cmg), lincomicina (2mcg), sulfazotrim (25mcg), norfloxacin (10mcg), penicilina (10U.I), nitorfurantoína (300mcg), tetraciclina (30mcg), ampicilina (10mcg), oxacilina (1mcg), ciprofloxacina (5mcg), ácido nalidíxico (30mcg), eritromicina (15mcg), rifamicina (30mcg) e amicacina (30mcg). As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C, e em seguida foi realizada a leitura dos resultados.

A presença de genes de virulência (*stb*, *sta*, *LT*, *Stx*, *F4*, *F5*, *F6*) nos isolados de *E. coli* foi realizada pelo método de reação em cadeia da polimerase (PCR) conforme Costa et al. (2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 51 amostras analisadas nesse estudo, 35 (68,62%) foram positivas para pesquisa de *E. coli*. Após a semeadura das amostras de carne em agar MacConkey, foi observado crescimento de colônias mucóides de coloração rosada lactose positiva, que quando submetidas à coloração de Gram, revelaram-se bacilos gram negativos. Nas provas bioquímicas, esses microrganismos mostraram-se negativos para presença de oxidase e foram capazes de fermentar a glicose no meio de GOF, bem como de produzir gás, mas não ácido sulfídrico no meio de TSI. Esses resultados permitiram a caracterização dos isolados de *Escherichia coli* conforme características bioquímicas descritas por Quinn et al (1994).

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos apontou a alta sensibilidade dos isolados ao ciprofloxacina, gentamicina, sulfazotrin, nitrofurantoína, ácido nalidíxico, amicacina e cefotriaxona. Por outro lado os isolados mostraram

resistência a lincomicina, penicilina, eritromicina, rifamicina e oxacilina (Figura 1). Estudo realizado na Suíça com *E.coli* VETEC, tem apontado para grande resistência as tetraciclina, sulfonamidas e estreptomicina usadas indiscriminadamente na alimentação de suínos no país (STEPHAN e SCUMACHER, 2001). Mesmos achados foram obtidos em amostras de animais submetidos ao abate em Portugal (PENA et al., 2004).

Uma amostra foi positiva para LT. Nenhum outro gene de virulência avaliado foi identificado nas demais amostras, o que não indica que esses isolados não sejam patogênicos, uma vez que existem outros fatores de virulência para *E. coli* que não foram avaliados nesse estudo. Para o desenvolvimento da enfermidade, as bactérias precisam aderir-se a mucosa intestinal e produzir uma ou mais enterotoxinas denominadas LT, STa e STb (cujo mecanismo de ação ainda não é bem claro), que levam ao desenvolvimento de diarreia e desidratação, podendo resultar na morte dos animais. Os tipos de fímbrias comumente associados com a doença nos animais domésticos são K88 (F4), K99 (F5), 987P (F6), F41 e F18 (HENTON e HUNTER, 1994; DEAN-NYSTROM et al., 1997; GYLES e FAIRBROTHER, 2006).

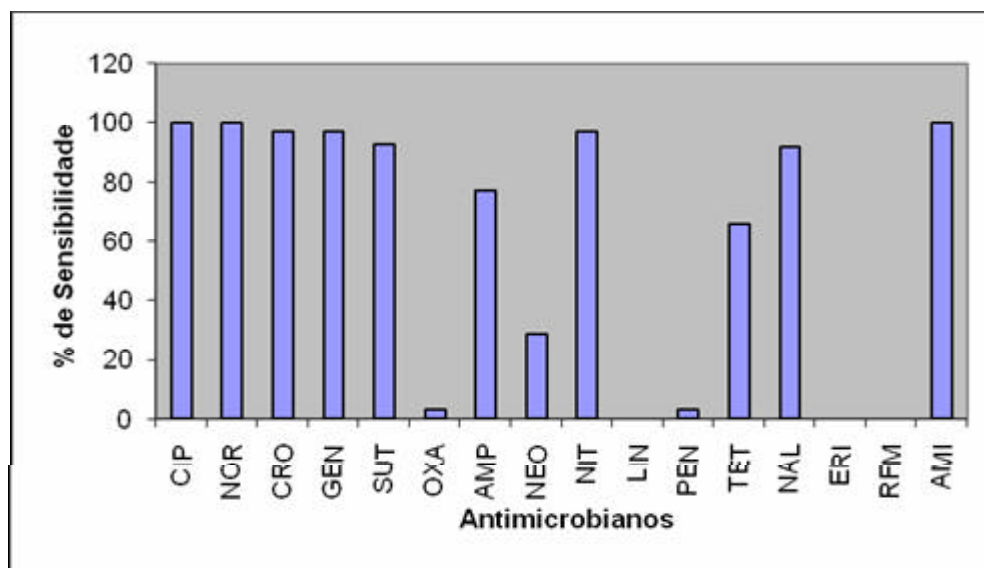


Figura 1. Percentual de sensibilidade aos antimicrobianos de isolados de *E. coli*. Onde: CIP (ciprofloxacina); NOR (norfloxacina); CRO (ceftriaxona); GEN (gentamicina); SUT (sulfazotrim); OXA (oxacilina); AMP (ampicilina); NEO (neomicina); NIT (nitrofurantoína); LIN (lincomicina); PEN (penicilina,) TET (tetraciclina,); NAL (ácido nalidíxico); ERI (eritromicina); RFM (rifamicina) e AMI (amicacina)

CONCLUSÕES

Este trabalho mostra o isolamento de amostras de *E. coli*, a partir de alimentos de origem cárnea. Salienta-se para a presença de um fator de patogenicidade em uma das amostras, bem como para a alta resistência dos isolados à lincomicina, penicilina, oxacilina, eritromicina e rifamicina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, p.493-496, 1966.

BEAUDRY, M., ZHU, C., FAIRBROTHER, J.M., HAREL, J. Genotyping and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from dogs manifesting attaching and effacing lesions. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 144-48, 1996.

COSTA, M.M. et al. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, v.26, n.1, p.5-8, 2006.

DEAN-NYSTROM, E.A., BURKHARDT, D., BOSWORTH, B.T., WELTER, M.W. Presence of F 18ac (2134P) fimbriae on 4P- *E.coli* isolates from weaned pigs with diarrhea. In: **Veterinary Clinicals of North America: Food Animal Practice.**, v.16, n. 1, p. 175-185, 2000. v. 9, p. 77-79, 1997.

GYLES, C.L., THOEN, C.O. **Pathogenesis of bacterial infections in animals.** 2 ed. Ames: Iowa State University Press, 1993, 331p.

GYLES, C.L.; FAIRBROTHER, J.M. In: GYLES, C.L.; PRESCOTT, J.F.; SONGER, J.G.; THOEN, C.O. Pathogenesis of bacterial infections in animals. Ames: Iowa State University Press, 2006. p.193-223.

HART, W.S.; HEUZENROEDER, M.W. & BARTON, M.D. Antimicrobial resistance in *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* and enterococci associated with pigs in Australia. **Journal of Veterinary Medical Infectious Diseases and Veterinary Public Health B**, 51:216-221, 2004.

HENTON, M.M., HUNTER, P. E.coli infections In: COETZER, J.A.W., THOMSOM, G.R., TUSTIN, R.C. **Infectious diseases of livestock.** 1 ed. Oxford University Press, 1994, p. 1085-1099.

JONHSON, J.R., KUKWSKI, M.A., MITH, K., OBRYAN, T.T., TATINI, S. Antimicrobial-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in retail foods. **Journal of Infectious Diseases.** v. 191, p. 1040-9, 2005.

LUKASOVA, J., ABRAHAM, B., CUPAKOVA, S. Occurrence of *Escherichia coli* O157 in raw material and food in Czech Republic. **Journal of Veterinary Medicine.** v. 51, 77-81, 2004.

NAKAZATO, G. et al. Attaching and effacing *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil: characteristics and serotypic relationship to human enteropathogenic *E. coli* (EPEC). **Veterinary Microbiology**, v.101, n.4, p.269-277, 2004.

PENA, A., SERRANO, C., REU, C., BAETA, L., CALDERON, V., SILVEIRA, I., SOUSA, J.C., PEIXE, L. Antibiotic residues in edible tissues and antibiotic

resistance of faecal *Escherichia coli* in pigs from Portugal. **Food Additive Contamination**, v. 21, p. 749-755, 2004.

QUINN, P.J., CARTER, M.E., MARKEY, B., CARTER, G.R. **Clinical Veterinary Microbiology**. WOLFE, 1994, 648p.

STEPHAN, R., SCHUMACHER, S. Resistance patterns of non O157 shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from animals, food and asymptomatic human carriers in Switzerland. **Letters in Applied Microbiology**, v.32, p.114-117, 2001.

TENG, L.J., HSUEH, P.R., LIAW, S.H., HO, S.H., TSAI, J.C. Geneti detection of dierrheagenic *Escherichia coli* isolated from children with sporadic diirrhea. **Journal of Microbiology Immunology Infection**, v. 37, p. 327-34, 2004.