

RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *Listeria monocytogenes* ISOLADAS DE DIFERENTES CORTES BOVINOS

MANTILLA, S.P.S.¹; KASNOWSKI, M.C.¹; ALMEIDA, G. S.²; OLIVEIRA, L.A.T.³; FRANCO, R. M.³

Resumo

A utilização de antimicrobianos gerou grande otimismo em relação à prevenção e ao tratamento dos processos infecciosos. Entretanto, o uso exagerado e nem sempre criterioso dos mesmos trouxe dificuldades, sendo a maior delas representada pela progressiva resistência bacteriana aos fármacos. As bactérias podem ser classificadas em sensíveis, intermediárias e resistentes aos antimicrobianos. A resistência bacteriana pode ser natural ou adquirida. A primeira corresponde a uma característica da espécie bacteriana, e a adquirida, à característica de uma ou mais amostras da espécie, sendo que aquisição de resistência por uma célula bacteriana sensível é decorrente de uma alteração genética. A *L. monocytogenes* é um patógeno que pode ser transmitido via ingestão de alimentos contaminados. Esta bactéria demonstra resistência a alguns antimicrobianos utilizados na medicina humana, sendo um perigo em potencial para os consumidores. Neste experimento foram testadas 25 cepas de *L. monocytogenes* oriundas de dois cortes bovinos muito consumidos no Brasil: alcatra e acém, frente à antibióticos (Penicilina G, Oxacilina, Vancomicina, Eritromicina, Clindamicina, Cefalotina, Ampicilina, Gentamicina, Tetraciclina e Cefoxitina) objetivando verificar a ocorrência de estirpes resistentes aos mesmos. Todas as cepas foram resistentes a cefoxitina, ampicilina e oxacilina, representando um problema para a saúde coletiva, principalmente para os indivíduos com alguma deficiência imunológica.

Palavras chave: resistência bacteriana, carne bovina, patógeno

Introdução

A carne bovina é considerada um alimento de origem animal com elevado teor de proteínas de alto valor biológico, sendo sua comercialização de grande importância para o ganho de capital em nível nacional e internacional.

A água e os alimentos estão entre os principais veículos de disseminação dos microrganismos emergentes e o uso indiscriminado de antibióticos, particularmente nos alimentos de origem animal, tem favorecido a seleção de linhagens cada vez mais resistentes e, portanto, de difícil tratamento médico.

O uso excessivo de antibióticos no tratamento de animais doentes e/ou como medida profilática em animais produtores de alimentos e promotores de crescimento vem acelerando a emergência da resistência bacteriana a

¹ Aluna de Doutorado do curso de Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal (POA) da Universidade Federal Fluminense (UFF)

² Aluno de Graduação em Medicina Veterinária da UFF

³ Médico Veterinário, Doutor, Professor do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFF

antimicrobianos. Tal prática é muito comum, o que favorece a presença de resíduos de antibióticos nos alimentos e conseqüentemente a seleção de bactérias resistentes, que podem ser transferidas aos humanos comprometendo uma possível antibioticoterapia (MENG et al., 1998).

Considera-se como um fator agravante a microbiota natural e/ou contaminante da carne bovina constituída por *Listeria* spp. A *L. monocytogenes* é um patógeno emergente capaz de ocasionar meningite e provocar abortos através da ingestão de alimentos contaminados, que não foram submetidos ao tratamento térmico adequado na eliminação de bactérias.

O gênero *Listeria* apresenta susceptibilidade uniforme aos antibióticos contra bactérias Gram positivas (CASTRO, 1989). Os antimicrobianos mais indicados no tratamento da listeriose são: ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol e eritromicina (CASTRO, 1989). Marth (1988) relata que a maioria das cepas desse microrganismo é sensível à tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina e cefalotina.

Alguns autores citam que a *Listeria* spp. pode ser refratária aos mecanismos bactericidas de muitos antibióticos, por ser intracelular e usar esse mecanismo para multiplicar-se e proteger-se, visto que os antimicrobianos se encontram no fluido extracelular e poucos são os agentes que podem penetrar, acumular e alcançar o citossol das células (CRESPO et al., 2003).

O objetivo deste estudo foi observar a ocorrência de cepas de *Listeria monocytogenes* oriundas de dois cortes bovinos bastante consumidos no Brasil resistentes a diversos antimicrobianos.

Material e Métodos

Foram obtidas 30 amostras de carne bovina do corte acém e 30 amostras do corte alcatra em estabelecimentos comerciais incluindo supermercados e açougues em áreas de diferentes níveis sociais do município de Niterói e Rio de Janeiro, RJ. As análises bacteriológicas foram realizadas no Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal, da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense (UFF). Após o isolamento e identificação, os cultivos foram testados quanto à sensibilidade aos antimicrobianos, segundo o método recomendado por NCCLS (2003), tido como o mais preciso.

As cepas isoladas, biotipificadas e sorotipadas, em estoque, foram mantidas em meio ambiente durante 30 minutos, sendo, após este tempo semeadas em ágar tripticase de soja com 0,6% de extrato de levedura e incubadas a 30°C por 24 horas. Os subcultivos crescidos foram homogeneizados em água destilada esterilizada, padronizando-se a suspensão para uma turvação igual ao padrão número um da escala de Mc Farland: 1 mL de cloreto de bário (BaCl₂) a 1% + 99mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 1% (0,36N) que corresponde a 3,8x10⁸ microrganismos por mililitro. Placas contendo ágar Müeller Hinton, após serem retiradas da geladeira, foram incubadas a 37°C durante 1 hora antes da semeadura e mantidas em temperatura ambiente por 3 a 5 horas, sendo repicadas utilizando-se um "swab" esterilizado embebido com o inóculo, para o espalhamento homogêneo na superfície do meio.

Após a absorção do inóculo por alguns minutos, foram colocados os disco contendo diferentes antimicrobianos com auxílio de uma pinça previamente flambada e resfriada. Após a colocação dos discos, as placas foram incubadas a 30°C durante 24 horas.

Neste estudo foram utilizados os seguintes antimicrobianos: Penicilina G, Oxacilina, Vancomicina, Eritromicina, Clindamicina, Cefalotina, Ampicilina, Gentamicina, Tetraciclina e Cefoxitina.

O resultado foi determinado a partir da mensuração do tamanho da zona de inibição com um halômetro e na classificação das cepas em sensíveis, moderadamente sensíveis, intermediárias ou resistentes de acordo com o diâmetro da zona padrão estabelecida na tabela para cada antimicrobiano.

Resultados e Discussão

A maioria das cepas apresentou resistência aos antimicrobianos testados. Todas as 25 cepas de *L. monocytogenes* foram resistentes a cefoxitina, ampicilina e oxaciclina. Sendo que as pertencentes ao sorogrupo 4b demonstraram resistência aos mesmos antimicrobianos e também à gentamicina, clindamicina e cefalotina. Em relação aos outros antibióticos testados, as cepas apresentaram resistência à gentamicina (96%), clindamicina (88%), penicilina (92%), vancomicina (60%), eritromicina (96%), cefalotina (92%) e tetraciclina (92%).

Das três cepas de *L. monocytogenes* 1/2 c testadas, somente uma foi sensível à tetraciclina (33,3%), uma à vancomicina (33,3%) e duas à cefalotina (66,7%). Das estirpes 1/2b, uma mostrou sensibilidade intermediária a gentamicina e outra foi sensível a gentamicina. Das 3 *L. monocytogenes* 4b oriundas do acém, duas foram sensíveis à penicilina e vancomicina e uma à tetraciclina e eritromicina. Das 16 cepas de *L. monocytogenes* 4b isoladas da alcatra, sete foram sensíveis a vancomicina e três intermediárias a clindamicina. Estes resultados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1- Resultado do antibiograma realizados nas cepas de *L. monocytogenes* isoladas de acém e alcatra bovina.

	<i>L. monocytogenes</i> - número de cepas R,S ou I/ Total de cepas isoladas e (%)			
Antibióticos	Acém sorotipo 4 b	Acém sorotipo 1/2 c	Alcatra sorotipo 1/2 b	Alcatra sorotipo 4 b
Gentamicina	3R/3 (100)	3R/3 (100)	1S/3 (33,3) 1I/3 (33,3) 1I/3 (33,3)	16R/16 (100)
Cefoxitina	3R/3 (100)	3R/3 (100)	3R/3 (100)	16R/16 (100)
Ampicilina	3R/3 (100)	3R/3 (100)	3R/3 (100)	16R/16 (100)
Clindamicina	3R/3 (100)	3R/3 (100)	3R/3 (100)	3I/16 (18,7) 13R/16 (81,2)
Oxaciclina	3R/3 (100)	3R/3 (100)	3R/3 (100)	16R/16 (100)
Penicilina	1R/3 (33,3) 2S/3 (66,7)	3R/3 (100)	3R/3 (100)	16R/16 (100)
Vancomicina	1R/3 (33,3) 2S/3 (66,7)	2R/3 (66,7) 1S/3 (33,3)	3R/3 (100)	7S/16 (43,7) 9R/16 (56,2)

Eritromicina	2R/3 (66,7) 1S/3 (33,3)	3R/3 (100)	3R/3 (100)	16R/16 (100)
Cefalotina	3R/3 (100)	1R/3 (33,3) 2S/3 (66,7)	3R/3 (100)	16R/16 (100)
Tetraciclina	2R/3 (66,7) 1S/3 (33,3)	2R/3 (66,7) 1S/3 (33,3)	3R/3 (100)	16R/16 (100)

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é um tema amplamente pesquisado por diversos autores, devido a grande importância desta condição para a saúde pública. À medida que os antimicrobianos vão sendo utilizados indiscriminadamente, aumenta-se o número de bactérias resistentes às drogas mais usadas na terapia humana. Todas as cepas de *L. monocytogenes* isoladas nesta pesquisa apresentaram-se resistentes aos antimicrobianos: cefoxitina, oxaciclina e inclusive a ampicilina, que é uma das drogas mais indicadas para o tratamento da listeriose segundo Jay (2005) e Castro (1989).

Os resultados do presente estudo divergem dos citados na literatura, que indicam geralmente sensibilidade a ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina e cefalotina (SEELIGER; JONES, 1996; MARTH, 1988; CASTRO, 1989). É de se esperar que diferentes cepas, ou mesmo cepas idênticas, isoladas de locais (países) diferentes, provavelmente tenham comportamento diferente frente aos antibióticos usados, o que explicaria a diversificação de resultados encontrados na literatura.

Gonçalves (1998) obteve resultados similares aos obtidos nesta dissertação, visto que cepas de *Listeria* spp. resistentes a tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina, ampicilina e cefoxitina foram isoladas a partir de cortes de frango congelados.

Araújo (1998) também descreveu cepas de *L. monocytogenes* resistentes aos antimicrobianos cefoxitina, cefalotina, clindamicina e amicacina. Yucel et al. (2005) isolaram espécies de *Listeria*, oriundas de carne bovina e produtos cárneos, resistentes a ampicilina e cefalotina. Por outro lado, Wong et al (1990) verificaram em seus isolados um número maior de cepas susceptíveis aos antibióticos testados, principalmente a ampicilina, clorafenicol, eritromicina, gentamicina e penicilina.

Também encontrou-se no presente trabalho cepas desta mesma espécie resistentes à outros antibióticos indicados no tratamento da listeriose humana, como por exemplo, tetraciclina e cefalotina, aos quais 92% das cepas demonstraram resistência, e 96% apresentaram-se resistentes à eritromicina. Estes resultados discordam dos citados por Marth (1988) o qual relata que a maioria das cepas de *L. monocytogenes* é sensível a estes antimicrobianos. Talvez as cepas já tenham adquirido resistência da década de 80 para a atual.

Em relação à penicilina, 92% das cepas de *L. monocytogenes* foram resistentes a este antibiótico, corroborando com os resultados obtidos por Hansen et al. (2005), pois estes pesquisadores observaram que todas as cepas de *L. monocytogenes* isoladas a partir de pacientes, foram sensíveis à penicilina e a ampicilina.

Todas as cepas (100% dos isolados testados) foram resistentes a dois ou mais antimicrobianos, sendo que 92% destas cepas multiresistentes apresentaram resistência a penicilina. Prazak et al. (2002) encontraram resultados muito parecidos, onde 95% das cepas de *L. monocytogenes* oriundas de amostras de repolho, do meio ambiente e de água foram

resistentes a dois ou mais antimicrobianos, e 85% destas foram resistentes à penicilina. Antunes et al. (2002) também isolaram cepas de *L. monocytogenes*, a partir de carcaças de frango, com múltipla resistência antimicrobiana em 74% das amostras analisadas.

Conclusões

A existência de cepas de *L. monocytogenes* resistentes aos antimicrobianos utilizados rotineiramente no tratamento da listeriose representa um problema para a saúde coletiva, principalmente para os indivíduos que fazem parte do grupo de risco, que são aqueles com deficiência imunológica. A confirmação da múltipla resistência deste patógeno serve como alerta para os produtores de carne bovina e à população em geral devido ao risco de resistência antimicrobiana que este alimento pode representar para o consumidor, prejudicando a terapêutica de doenças humanas de difícil tratamento.

Referências Bibliográficas

ANTUNES, P.; REU, C.; SOUSA, J. C.; PESTANA, N.; PEIXE, L. Incidence and susceptibility to antimicrobial agents of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* isolated from poultry carcasses in Porto, Portugal. *Journal of Food Protection*. v. 65, n. 12, p. 1888-1893, 2002.

ARAÚJO, P. C. C. *Listeria monocytogenes: Ocorrência, verificação da eficiência de dois meios de plaqueamento, sorovares predominantes e sensibilidade aos antimicrobianos de cepas isoladas em produtos de carne de peru comercializados na cidade de Niterói-RJ-Brasil*. Niterói, RJ, 1998. 90 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal Fluminense, UFF. Niterói, RJ, 1998.

CASTRO, A. F. P. *Listeria*. In: TRABULSI, L. R. *Microbiologia*. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 1989. 386 p. cap. 26, p. 131-132.

CRESPO, M. P., et. al. Aislamiento de *Listeria monocytogenes* em um Hospital de tercer nível. Disponível em <<http://www.colombiamedica.univalle.edu.co/vol30no2/listeria.html>> Acesso em agosto 2006.

GONÇALVES, P. M. R. *Isolamento e identificação de Listeria spp. a partir de amostras de cortes de peito de frango congelados: avaliação de metodologias e fatores interferentes*. Niterói, RJ, 1998. 111 f. Dissertação (Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal). Universidade Federal Fluminense, UFF. Niterói, RJ, 1998.

HANSEN, J. M. et al. Antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* in Denmark 1958-2001. *APMIS*. v. 113, p. 31-36, 2005.

JAY, J. M. Listerioses de origem animal. In: *Microbiologia de alimentos*. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p., cap. 25, p. 517-542

MARTH, E. H. Disease characteristic of *Listeria monocytogenes*. *Food Technology*, v. 42, n. 51, p. 165-168, 1988.

MENG, J.; et. al. Antibiotic Resistance of *Escherichia coli* O157:H7 and O157:NM isolated from Animals, Food, and Humans. *Journal of Food Protection*. V.61, n.11, p.1511-1514.1998.

NCCLS. *Performance Standards for Antimicrobial Disc Susceptibility Test*. v. 10, n. 7, abr 2003

PRAZAK, M. A.; MURANO, E. A.; MERCADO, I; ACUFF, G. R. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from various cabbage farms and packing sheds in Texas. *Journal of Food Protection*. v. 65, n. 11, p. 1796-1799, 2002

SEELIGER, H. P. R.; JONES, D. Genus *Listeria*. In: SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S. SHAPE, M. E. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 9 ed. Baltimore: Williams e Wilkins, 1996, v. 2, p. 1235-1245.

YUCEL, N.; CITAK, S.; ONDER, M.. Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria* species in meat products in Ankara, Turkey. *Food Microbiology*. v. 22, p. 2-3, 2005.

WONG, H. C.; CHAO, W.L.; LEE, S.J. Incidence and Characterization of *Listeria monocytogenes* in Food Available in Taiwan. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 56, n. 10, p. 3101-3104, 1990.