

RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM AMOSTRAS DE *Salmonella* HADAR ISOLADAS DE CARCAÇAS DE FRANGO

ZIMERMANN, F.C.*¹; PINHEIRO, D.¹; CESCO, M.A.O.¹; GUAYBA, J.¹;
BORSOI, A.¹; BORGES FORTES, F.B.²; DAL MOLIN, J.¹; CAMILOTTI, E.¹;
MORAES, H.L.S.¹; NASCIMENTO, V.P.¹;

RESUMO

O gênero *Salmonella* aparece como um dos principais agentes isolados em surtos de toxinfecções alimentares. O sorovar Hadar merece especial atenção, pois tem sido freqüentemente isolado de aves e produtos de origem avícola no Brasil. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a resistência a antimicrobianos (florfenicol, amoxicilina, tetraciclina, ampicilina, lincomicina, sulfa-trimetoprim, neomicina, estreptomicina, gentamicina, norfloxacina, ciprofloxacina, ceftiofur, eritromicina e enrofloxacina) em amostras de *Salmonella* Hadar (SH), isoladas de cortes de frango no estado do Rio Grande do Sul. Foram testadas 33 amostras de SH, que estavam estocadas na bacterioteca do CDPA-UFRGS, as quais foram reativadas em caldo cérebro-coração, passadas para caldo tetrato e estriadas em ágar verde-brilhante e xilose lisina desoxicolato, a partir dos quais uma colônia isolada, característica de *Salmonella* foi selecionada, estriada em ágar cérebro-coração (BHA). Para realização dos antibiogramas, foram colhidas colônias isoladas do ágar BHA, e estas diluídas em solução salina 0,85%, procurando obter uma turbidez semelhante à escala de McFarland 0,5. A partir desta diluição foram semeados 150 µL em placas de ágar Müller Hinton com auxílio de alça de Drigalski, e, após, os discos impregnados com antimicrobianos foram distribuídos sobre o ágar. As placas foram incubadas a 37°C e a leitura do diâmetro dos halos foi feita após 18-20 h de incubação. As amostras foram confirmadas para o gênero através da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) pela presença do gene *invA*. Foram testadas 33 amostras e todas apresentaram resistência a, pelo menos, uma droga. Dessas amostras, 100% foram sensíveis a ciprofloxacina e sulfa-trimetoprim. Para neomicina e estreptomicina, mais de 60% das amostras apresentaram resistência intermediária e 100% das amostras foram resistentes a lincomicina e a eritromicina. Um alto percentual de resistência à tetraciclina (67% das amostras) também foi verificado. Estes resultados reforçam a necessidade de um controle cada vez mais rígido no uso de antimicrobianos em animais de produção.

INTRODUÇÃO

Segurança alimentar é um dos pontos-chave na manutenção da saúde das populações. Tanto países desenvolvidos quanto em desenvolvimento são alvo de estatísticas dramáticas quanto ao número de vítimas acometidas por doenças transmitidas por alimentos contaminados. Dentre as causas de contaminações, bactérias como *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli*

(1)- Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária – CDPA/UFRGS (2)- Av. Bento Gonçalves, nº8824, Agronomia, CEP 91540-510, Porto Alegre - RS

(2) Médica veterinária, Mestre em Ciências Veterinárias, com Ênfase em Sanidade Avícola;
Correspondente: Francielli C. Zimmermann, telefone: (51) 81004589, e-mail:

O157 e *Listeria monocytogenes* são as principais responsáveis por doenças de origem alimentar em seres humanos, levando a óbitos especialmente ao acometer jovens, idosos e/ou pessoas imunodeprimidas. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que mais de 2.000.000 de pessoas morram por diarreia no mundo a cada ano.

O gênero *Salmonella* é um dos principais causadores de doença de origem alimentar no mundo. Estas bactérias são geralmente transmitidas aos humanos através do consumo de alimentos contaminados, principalmente carne, ovos e leite. Mesmo com esta forte relação dos produtos avícolas com salmonela, a carne de frango passou a ser uma das maiores fontes protéicas consumidas no mundo. O Brasil é atualmente o maior exportador e terceiro maior produtor mundial de frangos de corte. Dados publicados pela Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Frangos (ABEF) demonstraram que no ano de 2007 o Brasil produziu 10,2 milhões de toneladas de carne de frango, perdendo apenas para os EUA (16,2 milhões toneladas) e para a China (11,5 milhões de toneladas). Neste contingente é que se encontra a produção avícola nacional e sua responsabilidade na manutenção da segurança alimentar.

O Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Instrução Normativa/SAD nº3 de 09/01/2002, preconiza que plantéis de bisavós e avós sejam livres de *Salmonella* Typhimurium, *S. Enteritidis*, *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*. Os plantéis de matrizes devem ser livres de *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* e livres ou que estejam sob controle a *S. Typhimurium* e a *S. Enteritidis*. Segundo o PNSA, a portaria nº 8 de 23/11/1995 preconiza que carnes positivas para salmonela são impróprias para consumo.

Segundo banco de dados da OMS (anos 2000 a 2002), *S. Enteritidis*, seguida da *S. Typhimurium* são os sorovares mais prevalentes no mundo. *Salmonella* Hadar, aparece com 2% de prevalência no continente europeu e vem sendo detectada em vários países desde seu primeiro relato em 1954, em Israel. Em 1987 e 1988, foi o segundo sorovar mais prevalente em humanos e, em 1990, o sorovar mais prevalente em aves no Canadá (19,5 %) (DESMIT et al., 1998). Em 2005, na Espanha, mais de 200 casos de salmonelose em humanos foram provocados pelo sorovar Hadar, transmitido pelo consumo de carne de frango (EUROSURVEILLANCE, 2005). No Brasil, mais especificamente no estado do Rio grande do Sul, Nascimento et al. (1996), verificaram *S. Hadar* como a segunda salmonela mais prevalente (26%), inferior apenas a *S. Enteritidis* (51%).

A *S. Hadar*, da mesma forma que *Enteritidis* e *Typhimurium*, pertence ao grupo das salmonelas paratíficas ou zoonóticas, porém, diferente destas, *S. Hadar*, não é considerada pelo *European Union Zoonosis Council Directive* 92/117/EEC como um sorotipo invasivo, no entanto, não há uma delimitação clara entre sorotipos invasivos e não invasivos de salmonella. O sorovar Hadar já foi isolado de órgãos de aves, o que sugere uma característica invasiva ao mesmo (DESMIT et al., 1998). O presente trabalho teve como objetivo avaliar a resistência a antimicrobianos em amostras de *Salmonella* Hadar (SH) isoladas de cortes de frango no estado do Rio Grande do Sul.

MATERIAL E MÉTODO

O experimento foi realizado nas dependências do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária – CDPA – da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS - durante os meses de junho e julho de 2008. Foram testadas 33 amostras de *Salmonella* Hadar isoladas de carcaças de frangos, previamente identificadas no Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, RJ). A *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como cepa de referência. As amostras foram reativadas em caldo cérebro-coração, incubadas a 37 °C por 18-24h, e então passadas para caldo tetrionato, que foi colocado em banho-maria a 42 °C por 18-24h. Após, as amostras foram estriadas em ágar verde-brilhante (BGN) e xlose lisina desoxicolato (XLD) e incubadas novamente a 37 °C por 18-24h, para confirmação da bactéria através das características das colônias. Posteriormente, uma colônia isolada de cada amostra foi estriada em ágar cérebro-coração (BHA) e incubada a 37 °C por 18-24h. Para realização do antibiograma, foram colhidas colônias isoladas do ágar BHA, e diluídas em solução salina 0,85% de acordo com a escala de McFarland 0,5. A partir desta diluição foram semeados 150 µL em placas de ágar Müller Hinton com diâmetro de 12 cm, com auxílio de alça de Drigalski. Após, os discos impregnados com antimicrobianos foram distribuídos sobre este, sendo que esta etapa foi realizada em capela de fluxo laminar vertical. As placas foram incubadas a 37 °C e a leitura do diâmetro dos halos foi feita entre 18-20 h de incubação. Os antimicrobianos testados foram: florfenicol, amoxicilina, tetraciclina, ampicilina, lincomicina, sulfa-trimetoprim, neomicina, estreptomicina, gentamicina, norfloxacin, ciprofloxacina, ceftiofur, eritromicina, enrofloxacin. As amostras foram analisadas para a detecção do gene *invA*, proposto como o padrão internacional para a detecção molecular de salmonelas, através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Para o PCR foi utilizada uma alíquota de caldo BHI, o qual havia sido previamente inoculado com 3 a 5 colônias características de salmonela, retiradas do ágar BGN. A extração de DNA foi feita a partir deste BHI inoculado, segundo método de Guo et al. (2000), adaptado. A técnica do PCR foi realizada segundo Oliveira et al. (2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das amostras testadas, 100% foram sensíveis a sulfa-trimetoprim e ciprofloxacina. Quanto as demais quinolonas testadas, 96% e 80% das amostras também foram sensíveis a enrofloxacin e norfloxacin, respectivamente. Para neomicina e estreptomicina, mais de 60% das amostras apresentaram resistência intermediária e 100% das amostras foram resistentes a lincomicina e a eritromicina. Um alto percentual de resistência à tetraciclina (67% das amostras) também foi verificado. Todas as amostras apresentaram resistência a, pelo menos, um antimicrobiano, como mostra em detalhes a Tabela 1.

Tabela 1: Leitura dos antibiogramas para as amostras de *Salmonella* Hadar isoladas de carcaças de frangos.

Antimicrobianos	R (%)	I (%)	S (%)
Florfenicol	3.04%	6.06%	90.90%
Amoxicilina	3.03%	3.03%	93.94%
Ampicilina	18.18%	9.09%	72.73%
Lincomicina	100%	0	0
Sulfa+Trimetoprin	0	0	100%
Neomicina	0	60.60%	39.40%
Estreptomicina	15.15%	57.58%	27.27%
Gentamicina	0	3.03%	96.97%
Norfloxacina	6.06%	12.13%	81.81%
Ciprofloxacina	0	0	100%
Ceftiofur	18.18%	21.22%	60.60%
Eritromicina	100%	0	0
Erofloxacina	0	3.03%	96.97%
Tetraciclina	66.67%	3.03%	30.30%

R= Resistente, I= Intermediário, S= Sensível.

Com relação ao PCR foi verificada a presença de bandas específicas compatíveis com o gene *invA* (284 pares de bases) em todas as 33 amostras de *Samonella* Hadar testadas (Figura 1).

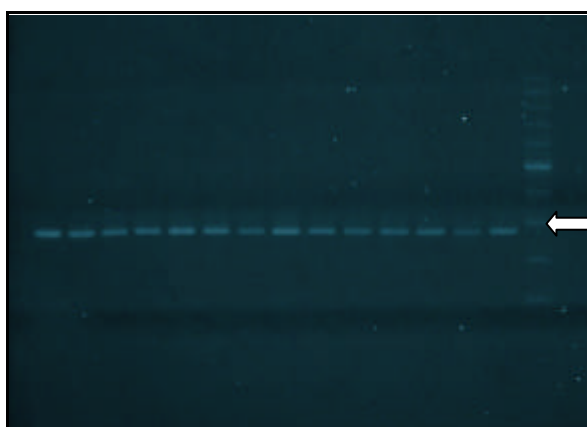


Figura1: Imagem do gel de agarose. Bandas compatíveis com gene *invA* dos isolados de *S.* Hadar (284 pares de bases). A seta indica 300 pares de base do marcador de peso molecular.

O uso terapêutico de antimicrobianos constitui um importante papel na prevenção da disseminação de doenças entre os animais, tratamento de animais enfermos, promoção de crescimento e prevenção na transmissão de agentes zoonóticos. Desde o descobrimento da aplicabilidade dos antimicrobianos em animais de produção, seu uso tornou-se comum (CDC,

2004). No entanto, a utilização indiscriminada de antimicrobianos nas medicinas humana e veterinária tem causado sérios problemas com implicações econômicas, políticas e sociais, tanto em países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento, dificultando a terapêutica e sendo atualmente um dos maiores problemas de saúde pública (RODRIGUES & FONSECA, 2006).

A resistência de todos os isolados de *S. Hadar* a lincomicina e a eritromicina já era esperada, pois esses antimicrobianos têm atuação principalmente sobre bactérias Gram positivas. Já a alta resistência a tetraciclina (67% das amostras) pode estar associada ao uso indiscriminado desse antimicrobiano, mesmo após a proibição do seu uso nas rações animais, esse antimicrobiano de amplo espectro é extensivamente utilizado na avicultura (ITO, et al. 2005). Apesar dessa problemática, poucos estudos foram realizados para a determinação do perfil de resistência antimicrobiana de *Salmonella* Hadar isoladas de carcaças de frango. Em alguns desses trabalhos, assim como no presente, pode-se verificar a multi-resistência a antimicrobianos em um número considerável de amostras de *S. Hadar*. Ribeiro et al. (2006), constatou resistência à estreptomicina, sulfazotrim e tetraciclina em todas as amostras de *S. Hadar* isoladas de carcaças. Resistência à tetraciclina, foi alta no presente trabalho (67%) e foi também verificada em isolados do mesmo sorovar em carcaças de perus (FAKHR et al., 2006) assim como em carcaças de frangos (SANTOS et al., 2000). Martinez et al. (2005), verificaram a presença de genes de resistência a tetraciclina em 38% das amostras de *S. Hadar* avaliadas. Os dados de multi-resistência da *S. Hadar* a antimicrobianos observados na literatura e os resultados obtidos neste trabalho reforçam a necessidade de um controle cada vez mais rígido no uso de antimicrobianos, não só em animais de produção, mas em todas as classes que deles fazem uso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEF, 2008. Disponível em: URL<[http:// www.abef.com.br](http://www.abef.com.br)> acesso em agosto de 2008.

CDC, 2004. Disponível em: <URL: <http://www.cdc.gov>> acesso em maio de 2004.

DESMIDT, M.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK, F. Serological and bacteriological observations on experimental infection with *Salmonella* hadar in chickens. **Veterinary Microbiology**, v.60, n.2-4, p.259-269, 1998.

EUROSURVEILLANCE e- Alert. Over 2000 cases so far in *Salmonella* Hadar outbreak in Spain associated with consumption of pre-cooked chicken. Disponível em <URL: [http:// www.salmonellablog.com/Archives/002275.html](http://www.salmonellablog.com/Archives/002275.html)> Acesso: mar. 2006.

FAKHR, M.K. et al. Molecular characterization and antibiotic resistance profiling of *Salmonella* isolated from retail turkey meat products. **Foodborne Pathogens and Disease**. v.3, n.4, p.366-374, 2006.

GUO, X. et al. PCR detection of *Salmonella enterica* serotype Montevideo in and on raw tomatoes using primers derived from *hliA*. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 5248-5252, 2000.

ITO, N.M.K. et al. Antimicrobianos: usos preventivos e curativos na avicultura. In: PALERMO-NETO, J.; SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L. **Farmacologia aplicada à avicultura**. 1.ed, São Paulo: Roca, 2005, p.115-147.

MARTINEZ, N. et al. Genetic basis of antimicrobial drug resistance in clinical isolates of *Salmonella enterica* serotype hadar from a Spanish region. **Microbial Drug Resistance-Mechanisms Epidemiology and Disease**. v.12, n.2, p185-193, 2005.

OLIVEIRA, S. D. et al. Detection of virulence genes in *Salmonella* Enteritidis isolates from different sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, supl. 1, p. 123-124, 2003

OMS, 2008. Disponível em URL< <http://www.who.int/en/> > acesso em agosto de 2008.

RIBEIRO, A.R. et al. Resistência antimicrobiana em *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Hadar isoladas de carcaças de frango. **Arquivos do Instituto Biológico**. v.73, n.3, p.357-360, 2006.

RODRIGUES, D.P.; FONSCECA, E.L. Resistência antimicrobiana. **Manual de procedimentos para determinação da susceptibilidade antimicrobiana em enterobactérias**. Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ – Laboratório de Referência Nacional de Cólera e Outras Enteroinfecções bacterianas LRNCEB/LABENT. 2006.

SANTOS, D.M.S. et al. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.20, n.1, 2000.