

RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM CEPAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE LEITE PASTEURIZADO

AMANDA CRISTINA DE OLIVEIRA CRUVINEL¹
LARYSSA FREITAS RIBEIRO²

RESUMO

O leite e seus derivados são alimentos de grandes valores nutricionais oferecidos a população, mas também uma grande fonte de contaminação por bactérias. Além disso, o uso indiscriminado de antimicrobianos na pecuária leiteira vem sendo preocupante, causando resistência a diversos microrganismos a diferentes antibióticos. Sabendo disso, o objetivo do presente estudo foi investigar a resistência dos antimicrobianos em amostras de *E.coli* isoladas de leite pasteurizado, comprados em supermercados da cidade de Monte Carmelo, Minas Gerais. Todos os isolados foram sensíveis à Tetraciclina e ao Cloranfenicol. Apenas um isolado teve resistência intermediária com a Ciprofloxacina e outro isolado com relação à Ceftazidima. Todos isolados foram resistentes aos antibióticos Oxacilina e Penicilina. Conclui-se que o leite pasteurizado apresentou isolados resistentes à importantes antimicrobianos, inclusive de uso humano, representando, assim, um risco à saúde humana.

Palavras-chave: Bactérias; Qualidade de leite; Saúde pública;

ABSTRACT

Milk and its derivatives have great nutritional value, but they are also a major source of bacteria contamination. Furthermore, the indiscriminate use of antimicrobials in dairy farming has been a concern, causing resistance in different microorganisms to different antibiotics. So, the objective of the present study was to investigate antimicrobial resistance in samples of *E.coli* isolated from pasteurized milk, purchased in supermarkets in the city of Monte Carmelo, Minas Gerais. All isolates were sensitive to Tetracycline and Chloramphenicol. Only one isolate had intermediate resistance to Ciprofloxacin and another isolate to Ceftazidime. All isolates were resistant to Oxacillin and Penicillin antibiotics. It is concluded that pasteurized milk presented isolates resistant to important antimicrobials, including those for human use, thus representing a risk to human health.

Keywords: Bacteria; Milk quality; Public health;

INTRODUÇÃO

O uso exacerbado de antibióticos em bovinos lactantes vem sendo cada vez maior. Uma vez feita o uso de antibiótico errado na medicina veterinária seja ele por via oral,

¹ Graduanda do curso de Medicina Veterinária pelo Centro Universitário Mário Palmério- UNIFUCAMP. (amandacruvinel@unifucamp.edu.br)

² Professora orientadora, graduada em Medicina Veterinária, mestre e doutora em Medicina Veterinária (Universidade Estadual Paulista - UNESP/Jaboticabal-SP). Professora de Medicina Veterinária (Centro Universitário Mário Palmério - UNIFUCAMP/Monte Carmelo-MG) (laryssaribeiro84@gmail.com)

intramuscular, na dieta, intramamária, pela pele ou intrauterina pode haver resultados de resíduos no leite. A presença desses resíduos pode sortir efeitos tóxicos diretamente no consumidor, como alergia em uma pessoa hipersensível; e também indiretamente pela indução de cepas bacterianas. (STOLKER & BRINKMAN, 2005).

O setor de produção de leite exerce enorme importância econômica e social por ser um gerador de empregos. Mesmo as pequenas propriedades rurais, muitas vezes familiares, possuem grande relevância social tanto pelo número de famílias envolvidas quanto pelo volume de leite produzido. Muitos agricultores sobrevivem integralmente da renda gerada pela atividade leiteira (CARVALHO; OLIVEIRA, 2006). Sobre isso, a Federação das Indústrias do Estado de São Paulo (2016) projeta, para 2026, uma produção de 44,4 milhões de toneladas de leite, crescimento médio de 2,4% ao ano.

Isso porque o leite é um dos alimentos mais ricos em nutrientes. Entretanto, também é um grande veículo de transmissão de patógenos veiculados na ingestão de alimentos por *Escherichia coli*. (OLTRAMARI *et al.*, 2012). São importantes causas de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) e transmissão de zoonoses os contaminantes de origem exógena, como a *Escherichia coli*. Portanto, há uma grande preocupação em impedir que esses microrganismos estejam associados à matéria-prima e se multipliquem no alimento (GERMANO; GERMANO, 2008).

Uma das causas mais agravantes para o uso de antimicrobianos vem sendo as mastites, em que, na maioria dos casos, existe o uso incoerente dos medicamentos e também não se respeita o período de carência (COSTA *et al.*; 1999). O leite, quando há presença de resíduos de antibióticos, é considerado adulterado e impróprio para consumo humano (RUELA *et al.* 2005). Para que isso não ocorra, deve ser respeitado o período de carência de cada droga, para que não ocorra a presença de resíduos no leite (BRITO *et al.*; 2005).

Ainda, com o uso indiscriminado e errado de antibióticos, pode-se observar que existem bactérias que são resistentes, gerando assim uma grande preocupação aos produtores rurais e também aos laticínios que industrializa e comercializa este alimento para todo país. Essa situação se agrava quando há a chance de disseminação das bactérias para a população como contaminantes de alimentos (Dambrosio *et al.*, 2007). No Brasil, por exemplo, foram coletadas 260 amostras de leite pasteurizado em diferentes laticínios comerciais e foram encontrados 47 isolados de *E. coli*, com altos níveis de resistência a agentes antimicrobianos como ampicilina (19,2%), cefalotina (18,9%) e tetraciclina (17,1%) (ZANELLA *et al.*, 2010).

Diante desse contexto, este trabalho tem como objetivo investigar a resistência dos antimicrobianos em amostras de *E. coli* isoladas no leite pasteurizado.

MATERIAS E MÉTODOS

O estudo foi realizado com quatro amostras de leite pasteurizado. As amostras foram adquiridas em supermercados da cidade de Monte Carmelo, Minas Gerais. Imediatamente após a compra, as amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo blocos de gelo e encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Mário Palmério (UNIFUCAMP), onde foram submetidas às análises.

- Preparo das diluições das amostras (APHA, 2001)

De cada leite, asepticamente, 25 mL foram colocados em frascos contendo 225 mL de água peptonada a 0,1%, esterilizada. A mistura foi homogeneizada, obtendo-se a diluição inicial de 10^{-1} . Após esse processo, foram realizadas diluições decimais até 10^{-3} utilizando-se o mesmo diluente.

- Identificação de *Escherichia coli*

Foram depositados 0,1 mL de cada diluição, em placas de ágar Mac Conkey. Após a homogeneização, as placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas. Após esse tempo, 3 colônias características de *Escherichia coli* foram coletadas e passadas para o caldo BHI.

- Teste de susceptibilidade a antimicrobianos

Com o auxílio de um suabe estéril, as culturas foram semeadas em placas contendo ágar Mueller-Hinton e, após a secagem da superfície do meio, foram colocados discos contendo os antimicrobianos (BAUER et al., 1996). As placas foram acondicionadas em estufa a 37°C por 24h. Os antimicrobianos testados foram: Cloranfenicol (30 mcg), Penicilina (10 UI), Ceftazidima (30 mcg), Ciprofloxacina (5 mcg), Oxacilina (1 mcg), Tetraciclina (30 mcg).

Após o período de incubação, os halos de inibição da multiplicação bacteriana foram mensurados com o auxílio de uma régua milimetrada. Os halos foram comparados com os intervalos estabelecidos pelo CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE 2007).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo isolou três colônias de *E. coli* de três amostras de leite e apenas uma colônia de uma amostra dos leites. Sendo assim, obtiveram-se um total de 10 isolados de *E. coli*.

São importantes causas de DTAs e transmissão de zoonoses os os microrganismos como *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Brucella abortus*, *Staphylococcus aureus*, entre outros. Portanto, a grande preocupação é impedir que esses microrganismos estejam associados à matéria-prima e se multipliquem no alimento (GERMANO; GERMANO, 2008). Por isso, a importância de uma pasteurização efetiva e controle de qualidade do processo de pasteurização.

A presença de *E. coli* nos alimentos é utilizada para indicar a possibilidade de contaminação fecal e a presença de outras bactérias enteropatogênicas. Entretanto, alguns grupos de *E. coli* são patogênicos e podem ser transmitidos por alimentos. Assim, mesmo em quantidades reduzidas, podem tornar-se significativas, em especial quando as condições do meio no qual se encontram permitem sua multiplicação (FRANCO; LANDGRAF, 2002), como acontece com o leite e seus derivados.

Os diferentes grupos de *E. coli* diarreio gênicas podem estar presentes em derivados de leite, como reportado no México por Canizalez-Roman et al. (2013). De um total de 669 produtos de laticínios analisados, detectou-se 2,84% de *E. coli* diarreio gênicas e, entre essas, 68,42% EPEC, 10,52% EAEC, 15,78% STEC e 5,26% ETEC.

No presente estudo, todos os isolados foram sensíveis à Tetraciclina e ao Cloranfenicol. Apenas um isolado teve resistência intermediária com a Ciprofloxacina e outro isolado com relação à Ceftazidima. Todos isolados foram resistentes aos antibióticos Oxacilina e Penicilina.

Alimentos de origem animal servem como fonte de patógenos resistentes a antimicrobianos que podem, direta ou indiretamente, resultar em infecções por microrganismos resistentes em humanos (BARBOSA; JORGE; UENO; 2007). No Estado do Paraná, Brasil, por exemplo, 260 amostras de leite pasteurizado foram coletadas em diferentes estabelecimentos comerciais e foram encontrados 47 isolados de *E. coli*, com altos níveis de resistência a agentes antimicrobianos como ampicilina (19,2%), cefalotina (18,9%) e tetraciclina (17,1%) (ZANELLA et al., 2010). Um outro estudo, também no Brasil, mostrou que os grupos beta-lactâmicos são os antimicrobianos mais usados no tratamento para

infecções em gado leiteiro, representando 38,22% do total de todos os antibióticos, seguidos pelos aminoglicosídeos (25,19%) e pela tetraciclina (15,41%) (NETTO et al., 2005).

A resistência das bactérias aos antibióticos, como o ocorrido com o presente estudo, se tornou um grande problema de saúde pública, pois os microrganismos se tornam reservatórios de genes resistentes (DAMBROSIO et al.; 2007).

Inúmeras pesquisas que são feitas em bactérias isoladas de alimentos revelam resistências a antibióticos de uso humano, o que se torna alarmante, pois pode ser uma forma de disseminar a resistência, na população, com a contaminação de alimentos (DAMBROSIO ET AL; 2007). E, dentre as bactérias que são isoladas e demonstra mais resistência, podemos citar a *E.coli* a qual vem agravar sérios riscos a saúde humana podendo ser de maior frequência em idosos e crianças (MARTINEZ; TRABULSI,2008).

Contudo, uma qualidade boa de leite condiz a inúmeros gestores e não só a quem venda, mas sim principalmente a quem compre. Um leite com qualidade baixa pode trazer inúmeros riscos a saúde humana, e também prejuízos a empresa fabricante (SOUZA ET AL. 2009). Por isso é primordial a garantia de qualidade ainda na produção primária, pois a falta de ações corretas nessa etapa compromete o resultado final do produto.

CONCLUSÃO

Isolados de *E. coli* de leite pasteurizado foram resistentes à importantes antimicrobianos de uso humano, como Oxacilina e Penicilina, apesar de terem sido sensíveis a antimicrobianos como Cloranfenicol.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O leite pasteurizado apresentou isolados de *E. coli* e, com resistência à antimicrobianos de importância em saúde humana, como Oxacilina e Penicilina, demonstrando, assim, ser um risco à saúde humana. Sugere-se que outros estudos sejam realizados para verificar a presença de *E. coli* patogênicas em leite pasteurizado, assim como a avaliação dos isolados com relação à resistência antimicrobiana a fim de evitar problemas de saúde pública.

REFERÊNCIAS

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Committee on Microbiological for foods. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4 ed. Washington: American Public Health Association, 2001. 676p.

BARBOSA, L.; JORGE, A. O. C.; UENO, M. Incidência de Staphylococcus coagulase positiva em leite tipo C e sensibilidade das cepas aos antibióticos. **Revista Higiene Alimentar**. v. 21, n. 148, p. 105 – 109. jan/fev, 2007.

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, n.4, p.493-496, 1996.

BRITO, M. A. V. P.; LANGE, C. C. Resíduos de antibióticos no leite. Comunicado Técnico. n. 44. Juiz de Fora: Embrapa, 2005. p.4.

CANIZALEZ-ROMAN, A., A.; GONZALEZ-NUÑEZ, E.; VIDAL, J.E.; FLORES-VILLASEÑOR, H.; LEÓN-SICAÍROS, N. Prevalence and antibiotic resistance profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from food items in northwestern México. **International Journal of Food Microbiology**, v. 164, n. 1, p. 36-45, 2013.

CARVALHO, G.R.; OLIVEIRA, A. F. de O setor lácteo em perspectiva. Boletim de conjuntura agropecuária. Campinas: **Embrapa Monitoramento por Satélite**, 23 p. Setembro de 2006.

CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute, #45). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacterial Isolated from Animals. 2008.

COSTA, E. O. Uso de antimicrobianos na mastite. In: SPINOSA, H. S., GORNIK, S.L., BERNARDI, M. M. Farmacologia aplicada à medicina veterinária. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.422-433.

DAMBROSIO, A.; LORUSSO, V.; QUAGLI, N.C.; PARISI, A.; LA SALANDRA, G.; VIRGILIO, S.; MULA, G.; LUCIFORA, G.; CELANO, G.V. & NORMANNO, G. *Escherichia coli* O26 in minced beef: Prevalence, characterization and antimicrobial resistance pattern. *Int J Food Microbiol.* 118, 218-222, 2007.

FRANCO, B. D. G. M; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo, Ed. Atheneu, 2002.

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

MARTINEZ, M.B.; TRABULSI & L.R. ENTEROBACTERIACEAE. In: Trabulsi, L.R.; Alterthum, F.. (Org.). *Microbiologia*. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 271-279, 2008.

NETTO, D. P., LOPES, M. O. OLIVEIRA, M. C. S., NUNES, M. P., JUNIOR, M. M., BOSQUIROLI, S. L., BENATTO, A., BENINI, A., BOMBARDELLI, A. L. C., FILHO, D. V., MACHADO, E., BELMONTE, I. L, ALBERTON, PEDROSO, P. P., SCUCATO, E. S. Levantamento dos principais fármacos utilizados no rebanho leiteiro do Estado do Paraná. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, v. 27, n. 1, p. 145-151, 2005.

OLTRAMARI, K., RIOS, M. C., BERGAMASCO, R., MACHISKI JUNIOR, M., NEUMANN ZANELLA, G., MADRONA, G., & GRATON MIKCHA, J. M. (2012). Resistência a Antimicrobianos em *Escherichia coli* isolada de leite pasteurizado. *Revista Tecnológica*, 75-82. <https://doi.org/10.4025/revtecnol.v0i0.14974>

RUELA A. C. I.; LIMA, A. J.; SOUZA, V. C. S.; JUNQUEIRA, G. R. Otimização e validação de método para determinação de resíduos de oxitetraciclina, tetraciclina e clortetraciclina em leite por cromatografia líquida de alta eficiência. *Ciência Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.25, n.1, p.139-146, 2005.

SOUZA, G. N.; LANGE, C. C.; BRITO, J. R. F. Qualidade do leite armazenado em tanques coletivos. (Circular técnica 99). Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2009. 8p.

Resistência antimicrobiana em cepas de *E. coli*

ZANELLA, G. N., MIKCHA, J. M. G., BANDO, E., SIQUEIRA, V. L. D., MACHINSKI M. Occurrence and Antibiotic Resistance of Coliform Bacteria and Antimicrobial Residues in Pasteurized Cow's Milk from Brazil. **Journal of Food Protection**. v. 73, n.9, p. 1684–1687, 2010.