



PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.

**Perfil de suscetibilidade antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp.
isoladas de granjas avícolas**

Liliane Pinheiro¹, Roberta Torres de Melo^{1,2}, Eliane Pereira Mendonça^{1,2}, Letícia Ríspoli Coelho^{1,2}, Guilherme Paz Monteiro¹, Daise Aparecida Rossi^{1,2}

¹Laboratório de Biotecnologia Animal e Aplicada - Universidade Federal de Uberlândia, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Uberlândia, Brasil.

Resumo

Há uma crescente preocupação com o aumento da resistência antimicrobiana em microrganismos patogênicos transmitidos por alimentos. Dentre eles, se destacam as bactérias do gênero *Salmonella*, principais agentes etiológicos de surtos de infecção alimentar. Foram analisados 37 isolados de *Salmonella* spp. provenientes de granjas avícolas de Uberlândia, MG, Brasil, objetivando avaliar o seu perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos. A susceptibilidade foi determinada pelo método de difusão em discos utilizando 14 antimicrobianos. As amostras apresentaram, de forma geral, sensibilidade à maioria dos antimicrobianos testados. Entretanto, as cepas demonstraram resistência à penicilina G (100%) e à tetraciclina (29,73%). Treze amostras (35,14%) apresentaram padrão de multi-resistência, com resistência a dois ou mais antimicrobianos testados, sendo a resistência à tetraciclina e penicilina as mais

observadas (29,73%). Uma amostra mostrou-se resistente a sete dos 14 antimicrobianos testados. Os resultados obtidos permitem concluir que apesar das cepas em sua maioria serem sensíveis aos antimicrobianos testados, há a emergência de cepas multi-resistentes, o que requer uma vigilância constante nos plantéis avícolas.

Palavras-chave: *Salmonella* spp, antimicrobianos, resistência.

Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* spp. strains isolated from poultry farms

Abstract

Currently there is a growing concern about increasing antimicrobial resistance in pathogenic microorganisms transmitted by food. Among them, stand out bacteria from the genus *Salmonella*, the main etiologic agents of outbreaks of foodborne diseases. We analyzed 37 samples of *Salmonella* from poultry farms in Uberlândia, MG, Brazil, to evaluate the profile of antimicrobial susceptibility. The model of susceptibility was determined by disc diffusion using 14 antibiotics. The samples had, in general, sensitivity to most antibiotics tested. However, some strains showed a tendency toward resistance to penicillin G (100%) and tetracycline (29.73%). Thirteen samples (35,14%) showed multidrug resistance to two or more antimicrobials, and resistance to tetracycline and penicillin the most prevalent (29.73%). One sample was resistant to seven of the 14 tested antibiotics. The results support the conclusion that despite the strains mostly present a profile of high sensitivity to the antibiotics tested, showing the emergence of multidrug-resistant strains, which requires constant vigilance in poultry production.

Keywords: *Salmonella* spp, antimicrobial, resistance.

1. Introdução

As bactérias podem ser classificadas como sensíveis ou resistentes aos antimicrobianos, sendo resistentes aquelas que crescem, *in vitro*, nas

concentrações utilizadas usualmente médias que os antimicrobianos atingem no sangue quando administrados via oral e sensíveis aquelas que não crescem nestas concentrações (TRABULSI et al., 2000).

Os antibióticos têm sido usados de forma satisfatória em medicina humana e veterinária nos últimos sessenta anos. No entanto, atualmente, a resistência aos antimicrobianos tornou-se uma importante questão de saúde pública e segurança dos alimentos, com o surgimento de muitas espécies de patógenos resistentes (MAURER, 2008).

A resistência natural corresponde a uma característica da espécie, sendo neste caso, toda uma população resistente. Já a resistência adquirida é resultante de alterações genéticas, como mutações e recombinações gênicas, e ao contrário da resistência natural, é encontrada em apenas uma parcela da população variando de acordo com o local de isolamento e com a intensidade do uso de antimicrobianos (TRABULSI et al., 2005).

Em vários países, incluindo o Brasil, são realizados simpósios e debates com o intuito de detectar as possíveis causas do aumento da resistência bacteriana às drogas e propor soluções para retardar ou mesmo cessar este avanço. Nesse sentido, são também estabelecidas redes de vigilância para monitorar a resistência antimicrobiana de espécies patogênicas transmitidas por alimentos. O que se tem comprovado por meio dessas redes é que, recentemente, tem havido um rápido aumento na incidência da resistência bacteriana aos antimicrobianos (MENEZES et al., 2004).

Dentre os microrganismos em que se tem observado aumento da resistência, há preocupação com aqueles que podem causar toxinfecções alimentares ou DTAs (Doenças Transmitidas por Alimentos). Levantamentos epidemiológicos realizados em vários países situam as salmonelas entre os agentes patogênicos mais freqüentemente encontrados em surtos de toxinfecção de origem alimentar, tanto em países desenvolvidos, como em desenvolvimento (ÁVILA; GALLO, 1996).

As salmonelas pertencem à família *Enterobacteriaceae* que é composta por bastonetes Gram negativos, não esporulados e anaeróbios facultativos.

Nesta família estão incluídas as bactérias que compõem o grupo dos coliformes, que também estão relacionados com contaminação alimentar, sendo considerados como bioindicadores de condições higiênico-sanitárias insatisfatórias (SILVA et al., 2001).

Neste contexto, as aves situam-se como um dos principais veículos de transmissão das salmonelas podendo propagá-las a outras espécies animais, inclusive ao homem, com relativa facilidade (SILVA; DUARTE, 2002). Além disso, muitas aves são portadoras assintomáticas, o que dificulta o controle e favorece a transmissão deste patógeno, exigindo monitoramento constante dos plantéis.

O aparecimento de cepas de salmonelas resistentes aos antimicrobianos tem se tornado uma preocupação para a saúde pública e, traçar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana dessas cepas é uma medida importante para monitoramento e posterior controle. Desta forma, objetivou-se com este trabalho determinar em cepas de *Salmonella* spp. isoladas de granjas avícolas o seu perfil de susceptibilidade a diferentes antimicrobianos.

2. Materiais e Métodos

2.1 – Obtenção das amostras e escolha dos antibióticos

As cepas de *Salmonella* spp. utilizadas nesse estudo foram cedidas por um laboratório credenciado da rede privada, totalizando 37 amostras provenientes de fígado, baço e tonsilas cecais. As cepas foram reativadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion), incubadas a 37°C/24h. Em seguida foi transferida uma alçada de cada amostra para placas de ágar XLD (Xylose Lysine Desoxycholate) pela técnica de estriamento por esgotamento para obtenção de colônias puras para a realização do antibiograma.

Os antibióticos selecionados para o estudo foram: gentamicina (10µg), cloranfenicol (30µg), fosfomicina (200µg), amicacina (30µg), sulfazotrim (25µg), cefazolina (30µg), imipinem (10µg), cefalotina (30µg), ampicilina

(10µg), tobramicina (10µg), ciprofloxacina (5µg), ceftazidime (30µg), tetraciclina (30µg) e penicilina G (10µg).

2.2 – Análises microbiológicas

As análises foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (LABIO-UFU).

Para verificar o perfil de susceptibilidade das cepas de *Salmonella* spp. aos diferentes antimicrobianos foi utilizada a técnica de difusão em discos proposta por Bauer et al. (1966), Oplustil et al. (2000) e Filho (2001) conforme protocolo preconizado pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2000).

As amostras foram analisadas em duplicata, sendo considerada como medida do halo de inibição a média entre as duas leituras. Foram transferidas três colônias puras de cada amostra para tubos contendo 2mL de caldo BHI com incubação a 37°C/24h. Em seguida foi transferido 0,2 mL para tubos contendo 2,0 mL de caldo Mueller-Hinton, que foram incubados a 37°C por 2 a 5 horas até atingir uma turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland.

Após ser alcançada a densidade desejada, o inóculo foi semeado em placa de ágar Mueller-Hinton, com o auxílio de um *swab* estéril. Após rápida secagem, com o auxílio de uma pinça estéril, foram espalhados os discos de antimicrobianos.

As placas foram incubadas em posição invertida a 37°C/20 horas. Após incubação, foram medidos os comprimentos dos halos e a média das duas leituras foi comparada a uma tabela para determinação do perfil de susceptibilidade das cepas em sensível, intermediário ou resistente.

As amostras que demonstraram resistência ou sensibilidade intermediária à tetraciclina foram submetidas ao teste da concentração inibitória mínima, utilizando o método de diluição em ágar, proposto por Filho (2001). Foram utilizadas as seguintes concentrações de tetraciclina: 1,25µg,

2,5µg, 5µg, 10µg, 20µg e 40µg. A tetracilina é um dos antibióticos mais empregados para o tratamento de infecções por *Salmonella* e foi amplamente utilizada como promotor de crescimento em plantéis avícolas, porém, atualmente, o seu uso não é mais autorizado.

A análise dos dados foi realizada de forma descritiva, calculando as porcentagens de isolados suscetíveis ou resistentes aos antibióticos testados e comparando os resultados obtidos aos disponíveis na literatura.

3. Resultados e Discussão

Os padrões de sensibilidade aos diferentes antimicrobianos podem ser observados na Tabela 1. Os isolados apresentaram alto índice de sensibilidade aos diferentes antimicrobianos testados (Figura 1). Das 37 amostras de *Salmonella* spp., 24 (68,96%) foram sensíveis ou apresentaram resistência intermediária a 13 dos 14 antibióticos testados, com exceção da penicilina, para a qual todas as amostras demonstraram resistência.

Em relação a penicilina, 100% das amostras foram resistentes, concordando com estudos realizados por Bau et al. (2001), que analisaram 124 cepas de *Salmonella enteritidis*, *S. anatum* e *S. enterica*, isoladas de produtos de frangos. Em 280 sorovares de *Salmonella* isolados de carcaça de frango e peru, todas as cepas foram resistentes à bacitracina e penicilina (PALMEIRA, 2008).

Cepas de salmonelas não-tifóides isoladas em todo o mundo têm demonstrado resistência aos betalactâmicos, provavelmente, relacionada à produção de β -lactamases, enzimas que inativam tais antibióticos antes que estes atinjam o seu sítio de atuação. Amostras de salmonelas resistentes à penicilina foram encontradas também na Coreia em um estudo com isolados de carcaças de frango (CHANG, 2001)

Tabela 1. Suscetibilidade aos antimicrobianos de 37 cepas de *Salmonella* spp. isoladas de granjas avícolas da cidade de Uberlândia, MG.

Antimicrobiano	Sensível N (%)	Intermediário N (%)	Resistente N (%)
Gentamicina	37 (100)	0	0
Cloranfenicol	37 (100)	0	0
Fosfomicina	36 (97,3)	1 (2,7%)	0
Amicacina	21 (56,76)	12 (32,43%)	4 (10,81%)
Sulfazotrim	36 (97,3)	0	1 (2,7%)
Cefazolina	36 (97,3)	0	1 (2,7%)
Imipinem	34 (91,9)	2 (5,4%)	1 (2,7%)
Cefalotina	28 (75,67)	7 (18,91)	2 (5,4%)
Ampicilina	36 (97,3)	0	1 (2,7%)
Tobramicina	37 (100)	0	0
Ciprofloxacina	30 (81,08)	3 (8,10)	4 (10,82%)
Ceftazidina	34 (91,9)	1 (2,7)	2 (5,4%)
Tetraciclina	19 (51,35)	7 (18,91)	11(29,72%)
Penicilina	0	0	37 (100)

N(%) – número de amostras e porcentagem em relação ao total de identificados como *Salmonella* spp.

As 37 amostras analisadas (100%) mostraram sensibilidade a gentamicina, cloranfenicol e tobramicina, 36 (97,3%) à fosfomicina, sulfazotrim, cefazolina e ampicilina e 34 (91,89%) mostraram sensibilidade aos antibióticos imipinem e ceftazidina. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Vieira et al. (2004) que analisaram a presença e susceptibilidade de *Vibrio* spp. e *Salmonella* spp. em caranguejos da espécie *Ucides cordatus* comercializados em Fortaleza-CE no período de fevereiro a maio de 2003.

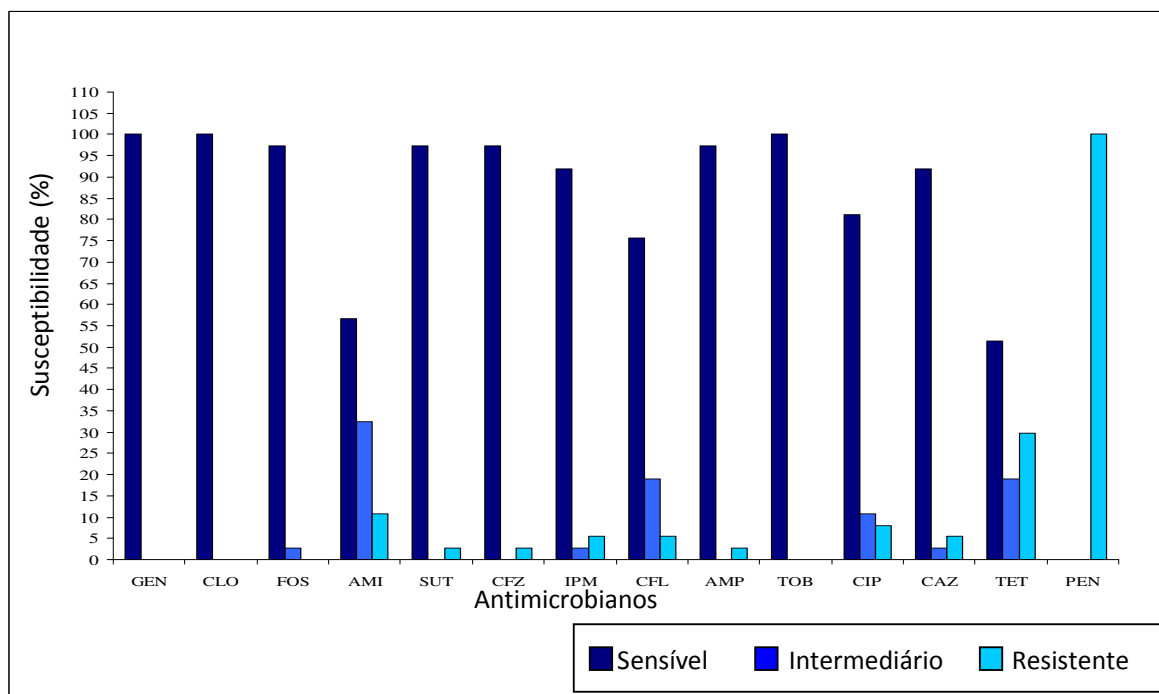


Figura 1: Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp. isoladas de granjas avícolas em Uberlândia, MG, frente a diferentes antimicrobianos.

Dentre as 37 amostras testadas, 13 (35,14%) apresentaram multiresistência a dois ou mais dos 14 antibióticos testados (Figura 2), sendo a resistência à tetraciclina e penicilina a mais comumente encontrada (29,73%).

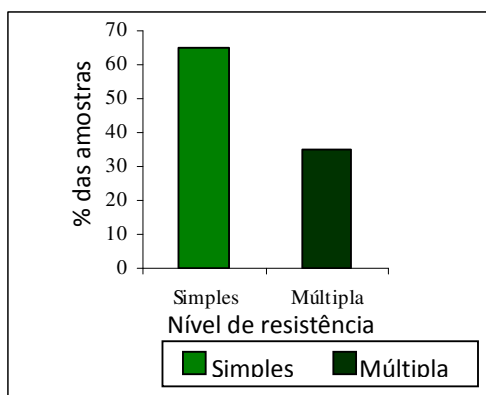


Figura 2: Nível de resistência (simples ou múltipla) de cepas de *Salmonella* spp. isoladas de granjas avícolas em Uberlândia, MG.

O aumento da incidência de estirpes de *Samonella* spp resistentes às tetraciclinas tem sido relatado em várias regiões do mundo. Neste trabalho,

das 37 amostras analisadas 11 (29,73%) apresentaram resistência, o que corresponde a 84,62% das amostras que apresentaram algum tipo de resistência. Além disso, outras sete amostras (18,92%) apresentaram uma resistência intermediária a este antibiótico demonstrando assim uma clara tendência à resistência para esta droga.

As tetraciclinas estão entre os antibióticos utilizados para o tratamento de salmoneloses tanto em humanos como em animais de criação, e esses resultados podem ser um indício de que o uso indiscriminado desse antimicrobiano em plantéis e hospitais pode estar selecionando os microrganismos resistentes. Resultados similares foram relatados em estudos realizados por Johnson et al. (2005), que descrevem resistência a tetraciclina em cepas de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos de origem animal no Canadá, o mesmo ocorrendo em isolados de humanos e suínos nos Estados Unidos (GEBREYES; THAKUR, 2005).

A tendência de resistência a tetraciclina é confirmada pelos resultados obtidos na concentração inibitória mínima (CIM) para este antimicrobiano, que variou de 2,5µg a 40µg/mL (Tabela 2). Duas das amostras testadas mantiveram seu crescimento mesmo na concentração de 40µg/mL, demonstrando a alta tolerância do isolado a altas concentrações deste antimicrobiano. Essa constatação é preocupante, visto que a transmissão desses patógenos entre os animais nos plantéis é facilitada pelas condições de criação. Segundo pesquisadores, essa resistência à tetraciclina pode estar relacionada ao desenvolvimento de mecanismo de efluxo da droga para o meio, o que impede que ela atue no microrganismo, sendo esse fato muito comum em casos de resistência a este antimicrobiano em bactérias entéricas (KYAW, 2005).

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM) frente à tetraciclina (30µg) de amostras de *Salmonella* spp isoladas de granjas avícolas da cidade de Uberlândia, MG.

Amostras	Concentração Inibitória Mínima (CIM - µg)					
	1,25	2,5	5,0	10,0	20,0	40,0
19	+	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+	+
21	+	+	+	+	+	-
24	+	+	+	+	+	-
25	+	+	+	-		
26	+	+	+	-		
27	+	+	-			
28	+	-				
29	+	+	-			
30	+	+	+	-		
31	+	+	+	-		
32	+	+	-			
33	+	-				
34	+	+	-			
35	+	-				
36	+	-				
37	+	-				

+ : amostras que cresceram nesta concentração

- : amostras que não cresceram nesta concentração (CIM)

Quatro (10,81%) das 37 amostras testadas apresentaram-se resistentes e 12 (32,43%) resistência intermediária à amicacina. Este resultado demonstra uma tendência para a redução da sensibilidade a este antibiótico. A resistência à amicacina, no entanto, não apareceu nas cepas de forma isolada, quando presente, foi em associação a outros antibióticos, como ciprofloxacina, tetraciclina e penicilina.

Sete (18,92%) e nove (24,32%) das amostras apresentaram resistência ou resistência intermediária à ciprofloxacina e à cefalotina, respectivamente. Surtos causados por *Salmonella* resistentes à ciprofloxacina foram relatados na Inglaterra e país de Gales (TRELFAH et al., 1997). Neste estudo, o autor relata que os isolados de humanos tanto na comunidade como em hospitais, no período de 1994 a 1996 apresentaram um aumento exponencial na resistência a este antibiótico. O autor correlaciona esse aumento na resistência com o licenciamento desde 1993 da enrofloxacin, aparentada com a ciprofloxacina, para o tratamento e profilaxia em bovinos e aves. O aumento

na prevalência de espécimes resistentes à ciprofloxacina é um problema de saúde pública, já que esse antimicrobiano é uma das drogas de escolha para a terapêutica de *Salmonella* invasiva no homem.

Resultados semelhantes quanto à diminuição da sensibilidade à ciprofloxacina foram encontrados também em um estudo realizado com cepas de *Salmonella* Hadar isoladas de humanos na Inglaterra no ano de 1994, no qual foi demonstrado um expressivo aumento na resistência das cepas a este antimicrobiano (ISLI, 2000). Esses resultados contradizem aqueles encontrados por Tsai e Hsiang (2005) nos quais as cepas de *Salmonella* spp. isoladas de patos em fazendas em Taiwan entre 2000 e 2001, foram altamente sensíveis a estes antibióticos.

Apesar da maioria dos isolados analisados serem sensíveis a todos ou a maioria dos antibióticos testados, uma das amostras analisadas apresentou multiresistência a sete antibióticos, ou seja, a 50% das drogas testadas, sendo elas: sulfazotrim, cefazolina, imipinem, cefalotina, ampicilina, ceftazidina e penicilina. Esse resultado é preocupante e pode representar uma tendência emergente nesses patógenos à resistência aos antimicrobianos.

Considerando a proximidade com que as aves são criadas, um microrganismo multi-resistente e, portanto, adaptado, pode infectar um grande número de animais e o homem. As aves acometidas por salmonelas paratíficas, na maioria das vezes são assintomáticas. Dessa forma, passam a albergar esses agentes e se tornam fontes potenciais de infecção para humanos, pois o patógeno pode ser carregado até a indústria de alimentos (NAGARAJA, et al., 1991; BARROW, 1993).

O problema com relação à resistência antimicrobiana é mais grave quando se considera que as drogas normalmente utilizadas como promotoras de crescimento são muitas vezes, as mesmas utilizadas na terapêutica das salmoneloses. Exemplos são as tetraciclinas e penicilinas, que neste estudo apresentaram um alto índice de resistência, o que permite inferir que o uso inadequado destes antimicrobianos, provavelmente, tem provocado a seleção de cepas resistentes.

4. Conclusão

A maioria dos espécimes estudados apresentou sensibilidade à grande parte dos antibióticos testados com tendência à resistência a drogas como a tetraciclina e a penicilina G. Essa análise indica a necessidade de vigilância constante na emergência da resistência aos antimicrobianos em plantéis avícolas.

5. Referências

ÁVILA, C. R.; GALLO, C. R. Pesquisa de *Salmonella* spp. em leite cru, leite pasteurizado tipo c e queijo "minas frescal" comercializados no município de Piracicaba – SP. **Sci. Agric.**, v. 53, n.1, p.159-163, 1996.

BARROW, P. A. Salmonella control – past, present and future. **Avian Pathol.** v.22, p.651-669, 1993.

BAÚ, A. C.; CARVALHAL, J. B.; ALEIXO, J. A. G. Prevalência de *Salmonella* em produtos de frangos e ovos de galinha comercializados em pelotas, RS, Brasil. **Cien. Rural**, v.31, n. 2, 2001.

BAUER, A. W.; KIRB, W. M. M.; SHERRIS, J. C. Antibiotic susceptibility test by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 45, n.4, p. 493-496, 1996.

CHANG, Y. H. Prevalence of *Salmonella* spp. in poultry broilers and shell eggs in Korea. **J. Food Protect.**, v.63, n.5, p.655-658, 2000.

FILHO, L. S. **Manual de Microbiologia Clínica**. 2 ed, João Pessoa: Editora Universitária/UFPB, 2001. 247 p.

GEBREYES, W. A; THAKUR, S. Multi-drug resistant *Salmonella enterica* serovar Muenchen from pigs and humans and potential interserovar transfer of antimicrobial resistance. **Antimicrob Agents Chemother.** V. 49, n. 2, p. 503-511, 2005.

ISLI. Salmonella Typhimurium Definitive Type (DT) 104: A Multi-resistant Salmonella. In: **ILSI Europe Report Series**. 2000, 28 p.

JOHNSON, J. M.; RAJIC, A.; MCMULLEN, L. M. Antimicrobial resistance of selected Salmonella isolates from food animals and food in Alberta. **Can Vet J.**, v. 46, n. 2, p. 141- 146, Feb. 2005.

KYAW, C. M. **Antibióticos e quimioterápicos**. Disponível em:
<<http://www.unb.br/ib/cel/microbiologia/antibioticos>>. Acesso em: 05/06/2010.

MAURER, J. J. **Following Drug-Resistant Salmonella through the food chain: A molecular ecology approach**. Disponível em:
<<http://www.ugacfs.org/research/pdfs/ANTIBIOTICRESISTANCE2004.pdf>> 2004 >Acesso em: 08/06/10.

PINHEIRO, L. et al. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp. isoladas de granjas avícolas. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 34, Ed. 139, Art. 941, 2010.

MENEZES, E. A.; MACEDO, F. V. V.; CUNHA, F. A.; ANDRADE, M. S. S.; ROCHA, M. V. A. P. Perfil de infecção e resistência aos antimicrobianos de bacilos Gram-negativos não-fermentadores isolados no Laboratório de Patologia Clínica Dr. Edilson Gurgel, Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza – CE. **RBAC**, v. 36, n. 4, p. 209-212, 2004.

NAGARAJA, K.V.; POMEROY, B. S.; WILLIAMS, J.E. Paratyphoid infections. In: Calnek et al. (eds.) **Diseases of Poultry**. 9 ed. Iowa State University Press, Ames, USA, p.99-130, 1991.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY PERFORMANCE STANDARDS. **Antimicrobial disk susceptibility tests**. Approved Standard M2-A5 NCCLS, Villanova, PA, 1999.

OPLUSTIL, C. P.; ZOCCOLI, C. M.; TOBOUTI, N. R.; SINTO, S. I. **Procedimentos básicos em Microbiologia Clínica**. São Paulo: Sarvier, 2000, 254 p.

PALMEIRA, A. L. B. Prevalência e perfil de resistência aos antimicrobianos dos Sorovares de *Salmonella* sp isoladas de carcaças de frango e peru na Região Sul do Brasil no período de 2004 a 2006. **Acta Scientiae Veterinarie**. v. 36, n. 1, p. 83-84, 2008.

SILVA, E. N.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em aves: retrospectiva no Brasil. **Rev. Bras. Cienc. Avic.** v.4, n.2, 2002.

TRABULSI, R. L.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A, **Microbiologia**, 3 ed, São Paulo: Atheneu, 2000. 586 p.

TSAI, H. J.; HSIANG, P. H. The prevalence and antimicrobial susceptibilities of *Salmonella* and *Campylobacter* in ducks in Taiwan. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 67, n. 1, p. 7-12, 2005.

VIEIRA, R. H. S. F.; LIMA, E. A.; SOUSA, D. B. R.; REIS, E. F.; COSTA, R. G.; RODRIGUES, D. P. *Vibrio* spp. and *Salmonella* spp., presence and susceptibility in crabs *Ucides cordatus*. **Rev. Inst. Med. Trop.** v. 46, n.4, p. 179-182, 2004.