

RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS DE ENTEROCOCCUS COM POTENCIAL PARA USO TECNOLÓGICO ISOLADOS DE LEITE ORGÂNICO CRU

Vanessa Luiza da Cunha¹

Jaqueline de Oliveira²

Marjory Xavier Rodrigues³

Cátia Tavares dos Passos⁴

Resumo:

A investigação da resistência a antibióticos em *Enterococcus* se tornou relevante, devido a sua importância em processos tecnológicos, e pela possibilidade da transferência horizontal destes genes. Logo, o objetivo deste trabalho foi verificar o potencial de virulência de *Enterococcus* isolados de leite orgânico cru, com potencial para uso tecnológico na área de alimentos, quanto a resistência a diferentes tipos de antibióticos. Bactérias ácido láticas (BALs) foram isoladas de leite orgânico cru e até o momento 33 cepas foram identificadas como *Enterococcus* por testes bioquímicos e pelo DNA 16S ribossomal. A susceptibilidade a diferentes tipos de antibiótico foi testada de acordo com o método proposto pela Clinical and Laboratory Standards Institute (Manual, 2013) utilizando os antibióticos: Cloranfenicol 30µg (CLO), Eritromicina 15µg (ERI), Ampicilina 10µg (AMP), Ciprofloxacina 5µg (CIP), Teicoplanina 30µg (TEC), Norfloxacin 10µg (NOR), Tetraciclina 30µg (TET), Vancomicina 30µg (VAN) e Penicilina G10U (PEN), incubadas a 35°C/24h. Os resultados mostraram que os isolados apresentaram maior índice de resistência à PEN, sendo que 69,70% das cepas foram resistentes ao antibiótico em questão. Apenas 60,60% dos isolados apresentaram resistência à pelo menos um dos antibióticos testados, e nenhum isolado foi totalmente resistente aos antibióticos VAN, TET, ERI e CLO. Além disso todas as cepas foram sensíveis a pelo menos 3 antibióticos testados. Com base no exposto, concluiu-se que foram identificadas cepas sensíveis a todos os antibióticos testados, havendo a necessidade da investigação da existência de genes de resistência, afim de que sejam futuramente considerados seguros e utilizados na produção de alimentos.

Palavras-chave: resistência a antibiótico; bactéria ácido láctica. DNA 16S ribossomal

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

**RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS DE ENTEROCOCCUS COM POTENCIAL PARA USO
TECNOLÓGICO ISOLADOS DE LEITE ORGÂNICO CRU**

¹ Aluno de graduação. vanessaluizacunha@gmail.com. Autor principal

² Aluno de graduação. catitta.passos@gmail.com. Co-autor

³ Docente. cunhaleticialo@gmail.com. Co-autor

⁴ Docente. catia.passos@uffs.edu.br. Orientador



RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS DE *ENTEROCOCCUS* COM POTENCIAL PARA USO TECNOLÓGICO ISOLADOS DE LEITE ORGÂNICO CRU

1. INTRODUÇÃO

O leite é um produto de origem animal, com alto valor nutricional, indicado para ser consumido por crianças e adultos. Devido a busca por alimentos de maior qualidade houve uma crescente preocupação por parte dos consumidores, aumentando a busca por alimentos orgânicos, em diferentes países (RIBEIRO, et al.2009). A expressão: alimento orgânico, é designada a alimentos de origem vegetal ou animal que não possuem em sua composição final fertilizantes ou qualquer outra droga, que contenha vestígios, que sejam nocivos à saúde do consumidor (RIBEIRO, et al.2009).

No leite são encontrados diferentes microrganismos como as bactérias ácido lácticas (BALs) que correspondem de 20-30% do total de bactérias contidas nesse produto (DELAVENTE et al., 2012). Muitas das BALs são identificadas como seguras para a produção de alimentos, porém há algumas que são patogênicas, responsáveis por causar doenças infecciosas em seres humanos e por espalhar genes de resistência a antibióticos como os *Enterococcus* (JANS et al., 2012, DELAVENTE et al., 2012).

As BALs possibilitam a produção de alimentos com diferentes características, além de alguns gêneros serem utilizados em processos biotecnológicos (MATTOS, 2008; MCMULLEN, STILES, 1996), como na produção de ácido lático e plásticos, por fermentação, utilizando fontes renováveis. (ADNAN & TAN, 2007). No entanto, os *Enterococcus* normalmente apresentam resistência a diferentes classes de antibióticos devido a possibilidade da transferência horizontal destes genes, sendo a vancomicina a de maior relevância (LEAVIS et al, 2006). Portanto, o objetivo do presente trabalho foi verificar o potencial de virulência de *Enterococcus* isolados de leite orgânico cru, com potencial para uso tecnológico na área de alimentos, quanto a resistência a diferentes tipos de antibióticos.

2. METODOLOGIA

As bactérias utilizadas neste trabalho foram isoladas de leite orgânico cru, dos municípios de Laranjeiras do Sul e Rio Bonito do Iguçu, ambas no estado do Paraná/Brasil, no período de inverno de 2015 e no verão de 2016, sendo até o momento, 33 cepas identificadas como *Enterococcus* por testes bioquímicos e que apresentaram potencial tecnológico em testes anteriores de: proteólise, produção de diacetil, capacidade antagonista, capacidade autolítica, produção de exopolissacarídeo, capacidade de acidificação de leite (dados não apresentados). Estes foram identificados pelo DNA 16S ribossomal, seguindo metodologia proposta por Rodrigues et al (2016) e as amostras purificadas foram sequenciadas pela empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS). As sequências fasta foram comparadas com as sequências estocadas no GenBank utilizando o sistema Blast (BLAST, 2017).

A susceptibilidade a diferentes tipos de antibiótico foi testada de acordo com o método proposto pela Clinical and Laboratory Standards Institute (Manual, 2013). Os isolados foram crescidos em agar Mueller-Hinton e incubados a 35°C/18-48h. A cultura foi suspensa em água peptonada estéril 0,1%, a fim de atingir a leitura de 0,5

na escala de McFarland (10^8 organismos. mL⁻¹). As placas de Mueller-Hinton foram inoculadas com a utilização de um swab e dispostos sobre estas, 10 diferentes antibióticos: Cloranfenicol 30 µg, Eritromicina 15 µg, Ampicilina 10 µg, Ciprofloxacina 5 µg, Teicoplanina 30 µg, Norfloxacin 10 µg, Tetraciclina 30 µg, Vancomicina 30 µg e Penicilina G10U e incubadas a 35°C/24h. O diâmetro dos halos de inibição formados foram medidos com auxílio de um paquímetro digital e expressos em mm, e classificados de acordo com os critérios de suscetibilidade do CLSI.

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

Das 33 cepas identificadas até o momento, 32 foram identificadas como *Enterococcus durans* e 1 como *Enterococcus galinarum*. A interpretação da leitura dos halos de inibição obtidos está apresentada na Tabela 1.

Como pode ser observado, os isolados apresentaram maior índice de resistência à penicilina, pois dos 33 isolados, somente 10 foram sensíveis à este antibiótico. Desta forma, 69,70% das cepas foram resistentes ao antibiótico em questão. Pizauro et al. (2014) ao avaliarem microrganismos, de diversos gêneros, isolados de leite de búfalas observaram alta resistência à penicilina, neomicina e sulfametoxazol/trimetoprim e presença de cepas resistentes a múltiplos fármacos. Os autores relacionaram estes fatos com o uso e a dose indiscriminados, à amplitude de aplicação e à duração do uso do antimicrobiano.

Outro fator importante a ser considerado é que, por se tratar de um alimento orgânico apenas 60,6% dos isolados apresentaram resistência à pelo menos um dos antibióticos testados. Este valor é inferior aos obtidos por Porto et al., (2016), que das 53 cepas de *Enterococcus*, isoladas de queijo artesanal testadas, 75,5% foram resistentes a pelo menos um dos nove antibióticos testados. Outro ponto positivo do presente estudo, é que todos os isolados foram sensíveis a tetraciclina, enquanto que no trabalho de Porto et al, 92,46%. Além disso, a cepa de *E.galinarum* e as BALs 61,136,142,157,158, 159, 196, 202 e 280 foram sensíveis a todos antibióticos testados, representando 30,30% dos isolados, valor superior ao de Porto et al, que foi de 24,53%.

Nenhum isolado foi totalmente resistente à vancomicina, tetraciclina, eritromicina e cloranfenicol. Além disso todas as cepas foram sensíveis a pelo menos 3 antibióticos testados. Riboldi et al. (2009) isolaram *Enterococcus* de diversos alimentos de origem animal e vegetal, na região Sul do Brasil, e somente as cepas isoladas em leite foram, em sua totalidade, susceptíveis a pelo menos um dos antibióticos testados.

A BAL 46 apresentou resistência à 4 antibióticos testados (Penicilina, Teicoplanina, Norfloxacin e Ciprofloxacina) e ficou na faixa intermediária de 2 (Eritromicina e Cloranfenicol). Esta apresentou resistência, mesmo que baixa, no caso dos últimos, à todas as classes de antibióticos testadas. De todos os isolados, nenhum apresentou total resistência à eritromicina, apenas três cepas apresentaram níveis de resistência intermediários, o que é considerado um fator importante, já que a eritromicina pertence à classe dos antibióticos macrolídeos, que são os substitutos mais comuns para indivíduos com alergia à penicilina (PETERS et al, 2003).

Tabela 1: Resistência de *Enterococcus* isolados de leite orgânico cru frente à diferentes antibióticos.

Gênero	BAL	Penicilina	Ampicilina	Vancomicina	Teicoplanina	Tetraciclina	Eritromicina	Norfloxacina	Ciprofloxacina	Cloranfenicol
<i>Enterococcus durans</i>	1	R	S	S	S	S	S	S	S	S
	3	R	S	S	S	S	S	S	S	S
	19	R	S	S	S	S	S	S	S	S
	44	R	S	S	S	S	S	S	S	S
	46	R	S	S	R	S	I	R	R	I
	48	R	R	S	S	S	S	S	S	S
	51	R	S	S	S	S	S	S	S	S
	53	R	S	S	S	S	S	S	S	S
	54	R	S	S	S	S	S	S	S	S
	58	R	S	S	S	S	S	S	S	S
	61	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	69	R	S	S	S	S	S	S	S	S
	136	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	142	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	146	R	S	S	S	S	S	S	S	S
	150	I	S	S	S	S	S	S	S	S
	153	R	S	S	S	S	S	S	S	S
	155	R	S	S	S	S	S	S	S	S
	157	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	158	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	159	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	161	I	S	S	S	S	S	S	S	S
	195	I	S	S	S	S	S	S	S	S
	196	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	202	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	204	R	S	S	S	S	S	S	S	S
	280	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	289	R	S	S	S	S	S	S	S	S
	291	R	S	S	S	S	S	S	S	S
	347	R	S	S	S	S	S	S	S	S
	370	R	S	I	S	S	I	S	S	S
	372	R	I	S	I	S	I	S	I	I
<i>Enterococcus galinarum</i>	66	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Marguet, Vallejo e Olivera (2008) ao avaliarem os fatores de virulência de cepas de *Enterococcus* isolados de queijos ovinos observaram alta sensibilidade à vancomicina e associaram os fenótipos resistentes aos alimentos, especialmente produtos lácteos, à sua manipulação sob condições de higiene precárias em alguns dos pontos críticos do processo de elaboração e ao uso indiscriminado de antibióticos. De acordo com Pérez, Martínez e Zhurbenko (2010), nos Estados Unidos a porcentagem de infecções nosocomiais causadas por *Enterococcus* vancomicina resistente aumentou de 0,3 para 7,9% em apenas 4 anos, sendo que a prevalência de *Enterococcus* resistentes à vancomicina neste país é de aproximadamente 30%.

Por este motivo, a produção de alimentos orgânicos poderá evitar a disseminação de genes de resistência, pois os microrganismos não teriam contato com os antibióticos, pois estes não são utilizados neste tipo de produção. No entanto, além da expressão fenotípica a investigação da existência dos genes de

resistência se faz necessária. Cabe destacar que os resultados aqui apresentados são parciais e a presente pesquisa continua em andamento.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido ao gênero *Enterococcus* apresentar grande número de genes de resistência a antibióticos, seu uso na indústria alimentícia deve ser cauteloso, a fim de evitar a disseminação de características patogênicas, mas o presente trabalho encontrou cepas sensíveis a todos os antibióticos testados, no entanto, há a necessidade da investigação da existência de genes de resistência para que estes possam ser considerados seguros para serem utilizados na produção de alimentos.

5. REFERÊNCIAS

- ADNAN, A.F.M.; TAN, I.K.P. Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential. *Bioresource Technology*, 98, p. 1380-1385, 2007.
- BLAST, 2017. Acesso em 01.10.2017. Disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
- CARR, F.J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 28, n.4, p. 281-370, 2002.
- DELAVEENNE, E. et al. Biodiversity of antifungal lactic acid bacteria isolated from raw milk samples from cow, ewe and goat over one year period. *International Journal of Food Microbiology*, 155, p. 185-190, 2012.
- FRANCIOSI, E. et al. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cow's milk. *International Dairy Journal*, v. 19, p. 3-11, 2009.
- HAMMERUM A.M. Enterococci of animal origin and their significance for public health. *Clinical Microbiology and Infection*. v.18, p.619-25, 2012.
- JANS, C. et al. Lactic acid bacteria diversity of African raw and fermented camel milk products reveals a highly competitive, potentially health threatening predominant microflora. *LWT-Food Science and Technology*, v. 47, p. 371-379, 2012.
- LEAVIS, H.L.; BOTEN M.J.M, WILLEMS, R.J.L. Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*. v. 9, n. 5, p. 454-460, 2006.
- MANUAL DE ANTIBIOGRAMA. Trabalho elaborado pela equipe do Setor Técnico da Laborclin destinado à orientação para execução do antibiograma pela técnica de difusão em disco de Kirby & Bauer. Laborclin. Março, 2013.
- MARGUET, E. R.; VALLEJO, M.; OLIVERA, N. L. Enterococcus aisladas de quesos ovinos Virulence factors of Enterococcus strains isolated R esumen. v. 42, n. 4, p. 543-548, 2008.
- MATTOS, M. R. de. Qualidade do leite cru produzido na região agreste de Pernambuco e atividade antagonista de bactérias ácido lácticas contra Salmonella Enteritidis e Staphylococcus aureus (Tese de Doutorado) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.
- MCMULEEN, L. M; STILES M. Potential for use of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. *Journal of Food Protection (Supplement)*, p. 64-71, 1996.
- PÉREZ, M. D.; MARTÍNEZ, C. R.; ZHURBENKO, R. Aspectos fundamentales sobre el género enterococcus como patógeno de elevada importancia en la actualidad. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiologia*, v. 48, n. 2, p. 147-161, 2010.
- PIZAURO, L. J. L. et al. Prevalence and etiology of buffalo mastitis and milk somatic cell count in dry and rainy seasons in a buffalo herd from Anápolis, São Paulo

State, Brazil. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 66, n. 6, p. 1703–1710, 2014.

PETERS, J. et al. Species distribution and antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from food of animal origin in Germany. International Journal of Food Microbiology, v. 88, p. 311-314, 2003.

PORTO, B. C. et al. Determinantes de virulência em Enterococcus endógenos de queijo artesanal. Revista Ciência Agronômica, v. 47, n. 1, p. 69–76, 2016.

RIBEIRO, et al. Microrganismos Patogênicos, Celularidade e Resíduos de Antimicrobianos no Leite Bovino Produzido no Sistema Orgânico. Pesquisa Veterinária Brasileira. Jan. 2009.

RIBOLDI, G. P. et al. Antimicrobial resistance profile of enterococcus spp isolated from food in southern Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, v. 40, n. 1, p. 125–128, 2009.

RODRIGUES, M. X. et al. The Lactococcus genus as a potential emerging mastitis pathogen group: A report on an outbreak investigation. Journal of Dairy Science, v. 99, n. 12, p. 9864–9874, 2016.

AGRADECIMENTO

CNPQ: Chamada Pública MCTI/CNPq Nº 14/2013 - Universal / Universal 14/2013 - Faixa A.