

SENSIBILIDADE À ANTIMICROBIANOS DE CEPAS DE *Enterococcus faecalis* ISOLADAS DE LEITE CRU

BÁRBARA PONZILACQUA¹; JOÃO LUÍZ ZANI²

¹Graduanda em Medicina Veterinária UFPel – bponzilacqua@hotmail.com

² Professor do Departamento de Veterinária Preventiva UFPel – jluizzani@ig.com.br

1. INTRODUÇÃO

A produção de leite bovino é atualmente praticada em todo o território nacional, em mais de 1,3 milhões de propriedades rurais (CEPEA, 2011), sendo a maioria de mão de obra familiar. A renda está baseada no que as indústrias beneficiadoras pagam pelo litro, e a diferença de preço está na qualidade e no volume de leite que é produzido.

É um alimento completo que pode fornecer diversos nutrientes, dentre eles proteínas, carboidratos, vitaminas, sais minerais. O leite cru de boa qualidade pode oferecer um bom diferencial no rendimento industrial e gerar diversos derivados (CASTRO et al., 2014).

Por ser um componente de importante papel na alimentação humana também é alvo de muitas pesquisas relacionadas com sua qualidade nutricional e microbiológica (RIBEIRO JUNIOR, et al., 2014). O mercado consumidor demonstra interesse por alimentos seguros, e o leite cru da forma como é produzido atualmente no país não atende a todas essas exigências (IBGE, 2012).

A contaminação bacteriana é um dos principais problemas da indústria de laticínios. Uma fonte de contaminação expressiva é a própria unidade produtora de leite que muitas vezes apresenta baixos índices zootécnicos (OHI et al., 2010).

O gênero *Enterococcus* pertence a um grupo heterogêneo e bastante complexo de microrganismos que inclui por volta de 30 espécies distintas (TEIXEIRA et al., 2007). Fazem parte da microbiota gastrointestinal dos mamíferos e podem ser encontrados no meio ambiente, na água, em plantas e alimentos.

Quando no meio ambiente são capazes de colonizar diversos nichos em condições hostis. O *Enterococcus faecalis* está amplamente distribuído e é importante na ecologia da microbiota do leite e seus derivados (GELSOMINO et al., 2002).

São considerados patógenos oportunistas especialmente em hospedeiros imunossuprimidos. Algumas características marcantes das estirpes têm levantado amplo interesse nas últimas décadas, dentre elas a alta incidência de cepas multirresistentes a antibióticos e termotolerantes, sendo capazes de resistir à pasteurização.

A utilização indiscriminada de antibióticos tem promovido um alto número de microrganismos resistentes aos princípios ativos, caracterizando um problema de saúde pública (MOREIRA, 2008). Sendo assim o emprego do antibiograma se torna importante para cepas resistentes e na indicação tratamentos efetivos.

O presente trabalho teve por objetivo analisar a atividade antimicrobiana, dos principais antibióticos utilizados no combate a espécie *E. faecalis*, das cepas isoladas de leite cru.

2. METODOLOGIA

Foram utilizadas 13 cepas de *Enterococcus faecalis* isoladas de amostras de

leite provenientes de tanques de refrigeração de propriedades leiteiras da região sul do Rio Grande do Sul. A caracterização microbiológica foi realizada através do cultivo em meio ágar seletivo de Slanetz and Bartley, e posteriormente análise bioquímica segundo COLMAN & BALL (1984).

Após a identificação as estirpes foram estocadas à temperatura inferior a -10°C em caldo enriquecedor BHI (Brain-Heart Infusion acrescido de glicerina), compondo a bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia e Saúde Populacional da Faculdade de Veterinária/UFPel. Para o presente estudo foram semeadas em meio de cultura ágar-sangue, contendo 5% de sangue ovino desfibrinado, e incubadas por 24 horas em estufa bacteriológica a 37°C.

Após o crescimento foram preparadas suspensões bacterianas em solução salina 0,85% estéril, até atingirem a turbidez da escala padrão 0,5 de McFarland. Esta porção foi semeada com o auxílio de "swabs" esterilizados em placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton afim de que o crescimento fosse uniforme em toda a superfície da placa.

A susceptibilidade aos antimicrobianos foi avaliada através do teste de disco difusão em ágar. Sobre os meios semeados foram colocados discos de papel contendo os seguintes antibióticos: Ampicilina (10µg), Ciprofloxacina (5µg), Eritromicina (15µg), Imipenem (10µg), Nitrofurantoína (30µg), Norfloxacina (10µg), Vancomicina (30µg), Polimixina B (300µg), Tetraciclina (30µg), Cloranfenicol (30µg). Após incubação por 24 horas em estufa bacteriológica a 37°C os diâmetros de inibição foram interpretados segundo recomendações do CLSI (2014).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 13 estirpes de *E. faecalis* estudadas foram submetidas ao teste de susceptibilidade frente a dez antibióticos usualmente utilizados na clínica. Na Tabela 1 estão representados os resultados dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos utilizados.

Todas as cepas se apresentaram sensíveis a nove dos dez antimicrobianos testados. E apenas a polimixina B (300µg) se demonstrou não eficiente na inibição de halo de crescimento.

A maioria das amostras apresentou resultados de sensibilidade a vários antimicrobianos testados: 100% frente ampicilina, imipenem, nitrofurantoína, vancomicina e cloranfenicol; 92,3% frente a norfloxacina e tetraciclina; 69,23% frente a ciprofloxacina e eritromicina.

Esses dados discordam de FRACALANZA (2007) que encontrou 100% de cepas de *E. faecalis* sensíveis a tetraciclina. Contudo o mesmo trabalho relata que entre as quinolonas testadas a susceptibilidade frente à norfloxacina foi maior que a encontrada para ciprofloxacina, resultado também encontrado no presente estudo.

O isolamento de *Enterococcus* resistentes à vancomicina veem sendo relatado com alta frequência no Brasil (OLIVEIRA *et al.*, 2001). Neste trabalho todas as amostras se mostraram sensíveis ao antimicrobiano concordando com PINTO *et al.* (2011).

A eritromicina apresentou amostras com sensibilidade intermediária demonstrando um possível potencial de resistência. Resultados semelhantes para antibióticos do grupo dos macrolídeos foram obtidos por LOPES (2000), mas no caso o princípio ativo testado foi a claritromicina que apresenta de 2 a 4 vezes mais ação sobre as Gram positivas.

A resistência a antibióticos pode favorecer processos infecciosos ou mesmo complicá-los em casos de bactеремia. As amostras analisadas no presente estudo

não representaram resultados alarmantes frente a susceptibilidade das estirpes aos princípios ativos.

Tabela 1. Resultados, em porcentagem, da sensibilidade e resistência aos antimicrobianos de 13 amostras de *Enterococcus faecalis* isoladas de leite bovino de UPLs no município de Canguçu, RS.

Antimicrobianos µg	Número amostras (%)		
	Sensível	Intermediário	Resistente
Ampicilina 10	100	0	0
Ciprofloxacina 5	69,2	30,7	0
Eritromicina 15	69,2	30,7	0
Imipenem 10	100	0	0
Nitrofurantoína 300	100	0	0
Norfloxacina 10	92,3	7,7	0
Vancomicina 30	100	0	0
Polimixina B 30	0	0	100
Tetraciclina 30	92,3	7,7	0
Cloranfenicol 30	100	0	0

Com relação ao resultado encontrado para as polimixinas pode ser explicado através do mecanismo de ação ao qual esses antibióticos atuam. Eles interagem com a molécula de polissacarídeo da membrana externa das bactérias Gram negativas e são incapazes de penetrar na parede celular das Gram positivas, característica da *E. faecalis* (VERONESI & FOCACCIA, 2005).

4. CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos no experimento, concluir-se que as cepas de *E. faecalis* isoladas de leite cru de propriedades do município de Canguçu não apresentam resistência aos antibióticos mais utilizados na clínica. Os princípios ativos com maior ação sobre as estirpes foram ampicilina, imipenem, nitrofurantoína, vancomicina e cloranfenicol.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CASTRO, K.A. et al. Efeito da contagem de células somáticas sobre a qualidade dos queijos prato e mussarela. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v.8, n.1, p.1237-1250, 2014.

CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA – CEPEA/USP. **Desenvolvimento metodológico e cálculo do PIB das cadeias produtivas do algodão, cana-de-açúcar, soja, pecuária de corte e leite no Brasil.** Piracicaba, 2011. Disponível em: <http://www.cepea.esalq.usp.br/pibpec/PIB_Cadeias_relatorio2009_10.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2015.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE – CLSI / NCCLS Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved Standard M07 – A9 vol. 34 n.1, 2014. **Clinical and Laboratory Standard Institute**. Wayne, Pa, USA.

COLMAN, G. & BALL, L. C. Identification of streptococci in a medical laboratory. **Journal Applied Bacteriology**, v. 57, n.1, p. 01-14, 1984.

FRACALANZZA, S. A. P. **Identificação, resistência a antimicrobianos e caracterização molecular de Enterococcus isolados de alimentos.** 158p. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2007.

GELSONIMO, R., VANCANNEYT, M., COGAN, T. M., CONDON, S. & SWINGS, J. Source of enterococci in a farmhouse raw milk cheese. **Applied Environmental Microbiology**, v.68, p.3560–3565, 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Pesquisa trimestral do leite.** Rio de Janeiro, 2012.

LOPES, H.V. **Novos antibióticos na prática hospitalar e ambulatorial.** São Paulo, Ed. Office, 2000.

MOREIRA, M.A.S.; FERREIRA, A.B.; TRINDADE, T.F.S.L.; REIS, A.L.O.; MORAES, C.A. Resistência a antimicrobianos dependente do sistema de efluxo multidrogas em Escherichia coli isoladas de leite mastítico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n. 6, p. 1307-1314, 2008.

OHI, M. et al. **Princípios básicos para a produção de leite bovino.** Curitiba: UFPR, 2010. 144p.

OLIVEIRA, G.A. et al.; Enterococcus sp: Importância Clínica, Fatores de Virulência, Resistência aos antimicrobianos e Diagnóstico Laboratorial. **Laes & Haes**, v.22, n.131, p.88-112, junho/julho 2001.

PINTO, W.A. et al.,. Ocorrência de Enterococcus faecalis em infecções pukpares e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v.9, n.2, p.273-280, ago/dez. 2011.

RIBEIRO JUNIOR, J.C. et al. Influência de boas práticas de higiene de ordenha na qualidade microbiológica do leite cru refrigerado. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.69, n.6, p.395-404, nov/dez, 2014.

TEIXEIRA, L. M., CARVALHO, G.M.S & FACKLAM, R. R. *Enterococcus*. P.430 – 442. In: Murray, P. R., Baron, J. E., Jorgensen, J. H., Landry, L. M. & Pfaller, M. A. (Eds.) *Manual of Clinical Microbiology*, 9 ed., v.1, **American Society for Microbiology**, Washington, DC, 2007.

VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia.** 3^a ed. São Paulo: Ed Atheneu; 2005.