



PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE ISOLADOS DE *Escherichia coli* POSITIVA PARA GENE *iss* EM FRANGOS DE CORTE NA IDADE DE ABATE

Patrícia Maria Rocha Gonçalves¹; Virginia Léo de Almeida Pereira²; Rita de Cássia Figueira Silva³; Luiz Antônio Trindade de Oliveira², Elmiro Rosendo Nascimento²

¹ Médica Veterinária Autônoma (patriciamrg@gmail.com)

² Professor Doutor da Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil

² Pesquisadora da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro

Recebido em: 06/10/2012 – Aprovado em: 15/11/2012 – Publicado em: 30/11/2012

RESUMO

No setor avícola, um dos objetivos do uso de antimicrobianos seria a redução das perdas ocasionadas por infecções por *Escherichia coli* e outras bactérias nas aves. Os sorotipos de *E. coli* associados a doenças nas aves não afetam o homem, porém o problema está no fato da *E. coli* poder tornar-se resistente a antimicrobianos utilizados na terapêutica de algumas doenças. O objetivo do presente estudo foi avaliar o perfil de resistência antimicrobiana de *E. coli* patogênicas isoladas de sacos aéreos e traquéias de frangos de corte ao abate. Dos 120 frangos estudados, em apenas dois não houve isolamento de *E. coli*. Das aves *E. coli* positivas, 17,8% (21/118) dos isolados foram de sacos aéreos, 16,1% (19/118) das traquéias e 66,1% (78/118) dos sacos aéreos e traquéias. Todos os isolados de *E. coli* foram submetidos confirmação da sua patogenicidade pela detecção do gene *iss* por PCR, sendo 12 isolados positivos. A resistência das *E. coli iss* positivas a antimicrobianos foi verificada e todas se apresentaram resistentes a 14 dos 20 antimicrobianos testados. Os 12 isolados positivos apresentaram resistência a antimicrobianos de uso no tratamento de enfermidades em frangos de corte, os quais podem permitir o surgimento de resistência cruzada com outras enterobactérias, representando um risco de seleção de cepas patogênicas para aves assim como para seres humanos.

PALAVRAS-CHAVES: frango, microbiologia, sensibilidade

PROFILE OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF *Escherichia coli iss* GENE POSITIVE FROM BROILER AT AGE OF SLAUGHTER

ABSTRACT

In the field of poultry science, antimicrobials have been used in the reduction of economic losses caused by *Escherichia coli*, as well as other bacteria. *E. coli* serotypes associated to avian colibacillosis do not infect humans, but might become resistant to antimicrobials used in diseases therapy. The objective of this work was to evaluate the antimicrobials resistance profiles of pathogenic *E. coli* isolated from the air sac and trachea of broilers at slaughter time. Out of the 120 studied broilers, from only two there was no *E. coli* isolation. From the *E. coli* positive birds, 17.8% (21/118) came from the air sac, 16.1% (19/118) from the trachea, and 66.1% (78/118) from both air sac and trachea. All *E. coli* isolates were subjected to

pathogenicity confirmation by PCR *iss* gene detection, but only 12 were positive. The *E. coli iss* positive isolates were subjected to antimicrobial sensitivity tests, and all of them were resistant to 14 of the 20 antimicrobials employed. These 12 *E.coli* isolates were found to be resistant to antimicrobials used in the treatment of broiler bacterial diseases, which by crossing of resistance between enterobacteria, represent a risk of selecting pathogenic strains to birds as well as to humans.

KEYWORDS: broiler, microbiology, sensibility

INTRODUÇÃO

Um dos grandes interesses na área de saúde pública é a existência de bactérias que colonizam os animais domésticos e que são resistentes a antimicrobianos. A utilização incorreta de antibióticos na medicina humana, o seu uso na alimentação animal com objetivos terapêuticos, profiláticos ou de promoção de crescimento são os principais responsáveis pela resistência aos antibióticos em bactérias patogênicas para o homem. Por sua vez, essas bactérias resistentes podem ser transferidas dos animais para seres humanos, principalmente em indivíduos que trabalham diretamente com os animais ou na indústria de processamento tecnológico de produtos de origem animal (BARTON, 2000; PARSONNET & KASS,1987).

No setor avícola, um dos objetivos do uso de antibióticos seria a redução das perdas ocasionadas pela infecção por *Escherichia coli* nas aves. Os sorotipos de *E.coli* associados à colibacilose das aves não afetam seres humanos. Entretanto, o problema está no fato da bactéria tornar-se resistente a antimicrobianos usados na terapêutica de algumas doenças e esta resistência ser transferida para outros membros da família Enterobacteriaceae, dificultando o tratamento das enfermidades causadas por estas bactérias, tanto no homem quanto nos animais (ALLAN *et al.*, 1993; BLANCO *et al.*; 1997; BREMNER, 1981).

O uso inadequado de antimicrobianos é considerado o fator mais importante para a seleção e disseminação de bactérias resistentes aos mesmos. Em criações de frangos de corte, quando utilizados como promotores de crescimento, os antimicrobianos selecionam bactérias resistentes na microbiota intestinal das aves e estas apresentam nas fezes proporções elevadas destas bactérias. Durante o abate das aves, cepas resistentes do trato intestinal podem contaminar as carcaças e a carne de frango pode ser contaminada por *E. coli* multiresistentes. A *E. coli* aviária resistente pode infectar pessoas diretamente ou por meio de alimentos, colonizar o trato intestinal e contribuir com genes de resistência para a microbiota endógena humana (BARTON, 2000; PARSONNET & KASS,1987; VAN DEN BOGAARD, 2001).

A legislação brasileira preconiza algumas medidas em relação ao uso dos antimicrobianos. O período de carência ou de retirada dos antimicrobianos deve ser em conformidade com a forma, a fórmula e a via de administração do produto, devendo constar na bula, sempre que o antimicrobiano seja indicado para animais cujos derivados e subprodutos sejam destinados ao consumo humano (BRASIL, 1997). A Portaria nº 193 de 1998 considera a importância do uso adequado dos agentes antimicrobianos em medicina veterinária, no tratamento e na prevenção de doenças, visando à segurança para saúde pública (BRASIL, 1998).

A *E. coli*, normalmente encontrada no trato intestinal de aves, apresenta cepas que possuem fatores de virulência que as tornam patogênicas. Os mecanismos de virulência identificados em cepas de *E.coli* patogênica para aves (APEC) necessitam de maiores estudos, para se compreender melhor a patogênese

das enfermidades causadas por *E.coli* (DHO-MOULIN & FAIRBROTHER, 1999). A identificação dos fatores de virulência, que pode ser realizada por métodos de biologia molecular, como a PCR, auxilia a compreensão dos mecanismos de patogenicidade da *E. coli* e favorece o desenvolvimento de métodos de diagnóstico, controle, prevenção e tratamento de enfermidades.

Dentre os mecanismos de virulência encontrados em APEC, a resistência aos efeitos bactericidas do soro, mediada pelo gene *iss*, apresenta-se como um relevante mecanismo, apesar de não ser o único utilizado por essas bactérias para alcançar os órgãos internos das aves e causar uma infecção (MELLATA *et al.*, 2003). O gene *iss* foi encontrado como um dos mais freqüentes em isolados de *E. coli* de aves com colibacilose, apesar de vários genes de virulência estarem envolvidos na sua patogênese (DELICATO *et al.*, 2003; HORNE *et al.*, 2000).

O gene *iss* está localizado em um plasmídio conjugativo R, com um tamanho aproximado de 100 kilobases, juntamente com outros genes de virulência e de resistência a antimicrobianos. Este plasmídio pode ser transferido, por conjugação, para outras bactérias avirulentas, inclusive outras *E. coli* (JOHNSON *et al.*, 2002; JOHNSON *et al.*, 2004)

O objetivo do presente estudo foi avaliar o perfil de resistência antimicrobiana de *E. coli* positivas para o gene *iss* pela PCR, isoladas de sacos aéreos e traquéias de frangos de corte ao abate.

METODOLOGIA

Foram investigados 120 frangos de corte da linhagem Cobb, em idade de abate, de um estabelecimento avícola no Estado do Rio de Janeiro. Os frangos foram necropsiados e em seguida foi feita a coleta de suabes de sacos aéreos e traquéias em Caldo BHI para enriquecimento. Após o crescimento, foi feito o plaqueamento para isolamento das colônias de *E. coli* em Agar MacConkey. Todos os isolados provenientes de traquéias foram identificados bioquimicamente pelo teste do Indol, do Vermelho de Metila, de Voges-Proskauer e do Citrato - teste do IMViC (KORNACKI & JOHNSON, 2001). Os isolados de sacos aéreos, foram identificados bioquimicamente por meio do sistema API 20E (bioMérieux SA França) para identificação de enterobactérias.

Todas as amostras de *E.coli* isoladas foram submetidas à PCR específica para detecção do gene *iss*. Para isso, 1 mL de cultivo puro de *E. coli*, após centrifugações, foi submetido a bloco térmico a 95° C por 10 minutos em volume de 20 µl de água Milli-Q para a extração do DNA. A amplificação foi feita em termociclador por 30 ciclos de 94° C por um minuto, 61° C por um minuto e 72° C por dois minutos, em reação com volume de 50 µl: 21 µl de água Milli-Q, 10 µl de tampão 10X, 5 µl de MgCl₂, 5 µl de dNTP mix (0,25 mM de cada), 1 µl (100pmol) do primer 5'- GTG GCG AAA ACT AGT AAA ACA GC 3', 1 µl (100pmol) do primer (GeneLink-USA) 5'- CGC CTC GGG GTG GAT AA 3', 2 µl (2U) de Taq DNA polimerase e 5 µl de DNA em água Milli-Q (DELICATO *et al.*, 2003; HORNE *et al.*, 2000). Os produtos amplificados (amplicons) foram submetidos a eletroforese a 94V em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídio e visualizados em transiluminador com luz ultra-violeta. Para auxiliar a visualização dos amplicons de 760 pares de base (pb) foi utilizado o marcador Ladder 100pb (PB-L Productos Bio-Lógicos).

As cepas de *E.coli* positivas para o gene *iss* foram submetidas ao teste de susceptibilidade antimicrobiana pelo método de difusão em discos (BAUER *et al.*, 1966). Os seguintes antibióticos foram testados: amicacina, ampicilina,

aztreonam, ceftadizima, ciprofloxacina, clindamicina, cloranfenicol, cefotaxima, eritromicina, ácido nalidíxico, nitrofurantoína, norfloxacina, oxacilina, pefloxacina, penicilina, ácido pipemídico, sulfametoxazol/trimetoprim, teicoplanina, tetraciclina e vancomicina. Quatro a cinco colônias isoladas foram transferidas para tubos contendo 5 mL de Caldo Mueller-Hinton (Merck) formando uma suspensão de acordo com a turbidez padrão correspondente a 0,5 da escala de Mac Farland. Um suabe estéril foi mergulhado no tubo e inoculado, por estriamento, na superfície total da placa de cultura com Agar Mueller-Hinton. Os discos de papel com os antimicrobianos foram dispostos sobre a superfície do ágar e as placas incubadas a 37° C por 24 horas. A leitura foi realizada medindo o diâmetro, em milímetros, dos halos de inibição de crescimento das colônias bacterianas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 120 frangos estudados, em apenas dois não houve isolamento de *E.coli* de sacos aéreos ou traquéias. Dos 118 isolados positivos de *E.coli*, 17,8% (21/118) foram de sacos aéreos, 16,1% (19/118) de traquéia e 66,1% (78/118) de sacos aéreos e traquéia.

Todas as amostras de *E.coli* foram avaliadas pela PCR para detecção do gene *iss* e 12 foram positivas, sendo nove dos sacos aéreos e três das traquéias. Essas amostras foram submetidas ao antibiograma e exibiram resistência a 14 dos 20 antimicrobianos testados, sendo todas as amostras sensíveis a amicacina e ao aztreonam e resistentes a ampicilina, clindamicina, eritromicina, penicilina, tetraciclina, vancomicina e teicoplanina (QUADRO 1).

No presente trabalho, foi encontrada uma grande proporção de *E.coli* de origem aviária resistentes aos antimicrobianos testados, corroborando o já observado por outros autores (YANG *et al.*, 2004). O aumento da resistência bacteriana é uma questão que vem gerando algumas medidas a serem adotadas pelos criadores com o intuito de minimizar este preocupante problema de saúde pública (BARTON, 2000; VAN DEN BOGAARD, 2001). Cepas patogênicas (gene *iss*) resistentes a norfloxacina (83,3%) e a tetraciclina (95%) foram relatadas (BLANCO *et al.*, 1997; CARDOSO *et al.*, 2002). Em relação a eritromicina, já foram observados percentuais de resistência de 98% e 100%, resultados semelhantes ao do presente estudo (ALLAN *et al.*, 1993; PEIGHAMBARI *et al.*, 1995).

A presença da resistência à tetraciclina e à ampicilina encontrada nas cepas de APEC isoladas neste estudo, onde o gene *iss* estava presente, corrobora resultados anteriores (JONHSON *et al.*, 2002). Este resultado serve de alerta, pois o uso de tetraciclina ou ampicilina nas criações de frangos poderia ocasionar uma seleção de bactérias resistentes a antimicrobianos dificultando o tratamento das doenças das aves (JONHSON *et al.*, 2004).

Também foram encontradas cepas resistentes ao cloranfenicol, à penicilina, à tetraciclina e à sulfametoxazol/trimetoprim. O uso destes antimicrobianos é vetado pela legislação brasileira como aditivos alimentares, promotores de crescimento ou como conservantes de alimentos para animais (BRASIL, 1998) e a resistência pode ser explicada pelo uso abusivo desses antimicrobianos antes de 1998 ou pelo seu uso indevido.

O nível observado de resistência aos antimicrobianos nas cepas de *E. coli* testadas demonstra a real necessidade do seu uso correto, em criações de frangos de corte, com o objetivo de tratar possíveis infecções pela *E. coli* nas aves. Todavia, o problema do aumento da resistência bacteriana vem gerando algumas medidas a serem adotadas pelos criadores com o intuito de minimizar este preocupante

problema de saúde pública, ou seja, o surgimento de resistência cruzada de *E. coli* aviária com patógenos entéricos dos seres humanos (BARTON, 2000; VAN DEN BOGAARD, 2001).

QUADRO 1. Resistência e sensibilidade das cepas de *E.coli* isoladas de sacos aéreos e traquéias de frangos de corte para antimicrobianos utilizados no antibiograma.

Antimicrobianos	Número de amostras (%)		
	Resistente	Sensível	Intermediário
Amicacina	0 (0)	12 (100)	0 (0)
Aztreonam	0 (0)	12 (100)	0 (0)
Ampicilina	12 (100)	0 (0)	0 (0)
Clindamicina	12 (100)	0 (0)	0 (0)
Eritromicina	12 (100)	0 (0)	0 (0)
Penicilina	12 (100)	0 (0)	0 (0)
Tetraciclina	12 (100)	0 (0)	0 (0)
Vancomicina	12 (100)	0 (0)	0 (0)
Teicoplanina	12 (100)	0 (0)	0 (0)
Ceftadizima	3 (25)	3 (25)	6 (50)
Ciprofloxacina	10 (83,3)	1 (8,3)	1 (8,3)
Cloranfenicol	3 (25)	6 (50)	3 (25)
Cefotaxima	0 (0)	10 (83,3)	2 (16,7)
Ácido nalidíxico	11 (91,7)	1 (8,3)	0 (0)
Nitrofurantoína	7 (58,3)	3 (25)	2 (16,7)
Norfloxacina	10 (83,3)	2 (16,7)	0 (0)
Oxacilina	10 (83,3)	2 (16,7)	0 (0)
Pefloxacina	11 (91,7)	0 (0)	1 (8,3)
Ácido pipemídico	11 (91,7)	0 (0)	1 (8,3)
Sulfametoxazol/trimetoprim	5 (41,7)	6 (50)	1 (8,3)

CONCLUSÕES

As cepas de *E.coli* encontradas neste estudo foram resistentes a antimicrobianos de uso no tratamento de enfermidades em frangos de corte, o que representa um risco na seleção de cepas patogênicas para as aves e na resistência cruzada com patógenos entéricos dos seres humanos.

A presença do gene *iss* em *E. coli* patogênica, nos frangos aparentemente saudáveis, constitui-se num problema de saúde pública, uma vez que a resistência à tetraciclina e à ampicilina está associada ao mesmo.

As *E. coli* patogênicas aviárias, encontradas neste estudo, foram resistentes a antimicrobianos de uso no tratamento de enfermidades em frangos de corte e de uso proibido pela legislação brasileira em criações de aves para consumo.

AGRADECIMENTOS

À FAPERJ e ao CNPq pelo apoio financeiro

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAN, B.J., VAN DEN HURK, J.V., POTTER, A.A. Characterization of *Escherichia coli* isolated cases of avian colibacillosis. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 57, p. 146-151, 1993.

BARTON, MD. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. **Nutrition Research Reviews**, v,13, p. 279-99, 2000

BAUER, AW, KIRB, W.M.M., SCHERRIS, J.C., TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. **The American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493-96, 1966

BLANCO, J.E., BLANCO, M., MORA, A., BLANCO, J. Prevalence of bacterial resistance to quinolones and other antimicrobials among avian *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens in Spain. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35 n.8, p. 2184-85, 1997.

BRASIL. Portaria n.º 193 de 12 de maio de 1998. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico Para Licenciamento e Renovação de Licença de Antimicrobianos de Uso Veterinário.

BRASIL. Resolução Mercosul n.º 3 de 1997. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento técnico para registro de antimicrobianos de uso veterinário.

BREMNER, AS. **Higiene e Inspeccion de carne de aves**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1981, 209p.

CARDOSO, A.L.S.P., TESSARI, E.N.C., CASTRO, A.G.M., PULICI, S.C.P., ZANATTA, G.F. Prevalência de resistência em amostras de *Escherichia coli* de origem aviária. In: CONFERÊNCIA APINCO 2002 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2002, Campinas, **Anais...Campinas : FACTA**, 2002, p.129.

DELICATO, E.R., BRITO, B.G., GAZIRI, L.C.J., VIDOTTO, M.C. Virulence associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. **Veterinary Microbiology**, v. 94, p. 97-103, 2003.

DHO-MOULIN, M., FAIRBROTHER, J.M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Veterinary Research**, v.30, p. 299-316, 1999.

HORNE, S.M., MCDONOUGH, J.P.; GIDDINGS, C.W.; NOLAN, L.K. Cloning and sequencing of *iss* gene from virulent avian *Escherichia coli*. *Avian diseases*, v. 44, p. 179-184, 2000.

JOHNSON, T.J.; GIDDINGS, C.W., HORNE, S.M., GIBBS, P.S., WOOLEY, R.E., SKYBERG, J., OLAH, P., KERCHER, R., SHERWOOD, J.S., FOLEY, S.L., NOLAN, L.K. Location of increased serum survival gene and selected virulence traits on a conjugative R plasmid in an avian *Escherichia coli* isolate. **Avian Diseases**, v. 46, p. 342-352, 2002.

JOHNSON, T.J., SKYBERG, J., NOLAN, L.K. Multiple antimicrobial resistance region of a putative virulence plasmid from an *Escherichia coli* isolate incriminated in avian colibacillosis. **Avian Diseases**, v. 48, p. 351-360, 2004.

KORNACKI, J.L., JOHNSON, J.L. *Enterobacteriaceae*, Coliforms and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological examination of foods**. 4 ed. Washington: APHA, 2001. 676 p. cap. 8, p. 69-82

MELLATA, M., DHO-MOULIN, M., DOZOIS, C.M., CURTISS III, R., BROWN, P.K., ARNÉ, P., BRÉE, A., DESAUTELS, C., FAIRBROTHER, J.M. Role of virulence factors resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 1, p. 536-540, 2003.

PARSONNET, K.C., KASS, E.H. Does prolonged exposure to antibiotic-resistant bacteria increase the rate of antibiotic-resistant infection? **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 31, n. 6, p. 911-914, 1987.

PEIGHAMBARI, S.M., VAILLANCOURT, J.P., WILSON, R.A., GYLES, C.L. Characteristics of *Escherichia coli* isolates from avian cellulitis. **Avian Diseases**, v.39, p.116-124, 1995.

VAN DEN BOGAARD, A.E., LONDON, N., DRESSEN, C., STOBBERINGH, E.E. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.47. p. 763-771, 2001.

YANG, H., CHEN, S., WHITE, D.G., ZHAO, S., MCDERMOTT, P., WALKER, R., MENG, J. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n.8, p. 3483-89, 2004.