RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE ISOLADOS DE ESCHERICHIA COLI PROVENIENTES DE QUEIJO MUÇARELA ARTESANAL PRODUZIDO NO BRASIL

ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF ESCHERICHIA COLI ISOLATES FROM HOME-MADE MOZZARELLA CHEESE IN BRAZIL

P. CARDOSO¹, J. M. MARIN^{2*}

RESUMO

Um total de cinquenta e nove queijos muçarela de fabricação caseira foi coletado em um pequeno produtor no vale do Jequitinhonha (Nordeste de Minas Gerais, Brasil) e 147 isolados de *E. coli* recuperados dos queijos foram examinados para sua resistência frente a 12 agentes antimicrobianos. As principais resistências foram detectadas para tetraciclina (52,4%), cefalotina (44,2%), amicacina (34,1%), ampicilina (31,3%) e ácido nalidíxico (30,0%). Porcentagem elevada de resistência a múltiplas drogas (60,0%) foi encontrada, o que representa um motivo de preocupação devido ao risco de disseminação de genes de resistência aos antimicrobianos na microbiota humana.

PALAVRAS-CHAVE: Escherichia coli. Queijo muçarela. Resistência antimicrobiana. Resistência a múltiplas drogas.

SUMMARY

A total of 59 home-made mozzarella cheese samples were taken at a local producer in the Jequitinhonha Valley (Northeast of Minas Gerais, Brazil). A hundred-forty-seven *E.coli* isolates from the cheese were screened for resistance to 12 antimicrobial agents. Predominant resistance was to tetracycline (52.4%), cefalothin (44.2%), amikacin (34.1%), ampicillin (31.3%) and nalidixic acid (30.0%). Multidrug resistance was found in high level (60.0%) which represents a reason for concern due to the risk of dissemination of antimicrobial resistant genes to the microbiota of human beings.

KEY-WORDS: Antimicrobial resistance. *Escherichia coli*. Mozzarella cheese. Multidrug resistance.

Submetido: 08/05/2014 Aceito: 25/02/2015 104

¹ Programa de Microbiologia, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Júlio de Mesquita /UNESP- Campus Jaboticabal, SP, Brazil.

² Departamento de Morfologia, Fisiologia e Patologia Básica, FORP, Universidade de São Paulo/USP- Campus Ribeirão Preto, SP, Brazil. Tel-55 16 3602 4101; Fax- 55 16 3602 4102. <u>immarin@forp.usp.br</u>

INTRODUÇÃO

A indústria de produção de queijos é uma das principais indústrias encontradas ao redor do mundo, e muito da sua produção ainda é realizada em pequena escala e com procedimentos rústicos de higiene (KOUSTA et al., 2010; DIAS et al., 2012). A muçarela neste estudo é definida como um queijo artesanal com uma pequena escala de produção, geralmente na própria fazenda na qual o leite é produzido. Em Minas Gerais, este é o queijo mais produzido (TEIXEIRA et al., 2007), e somente leite bovino é utilizado na manufatura deste queijo. Embora o queijo muçarela receba um severo tratamento térmico durante a filagem, alguns investigadores têm demonstrado a possibilidade de uma contaminação com organismos originalmente derivados do ambiente de manufatura do queijo ou do manipulador humano, após o tratamento por calor (DIAS et al., 2012).

A resistência antimicrobiana tem sido reconhecida como um problema emergente ao redor do mundo tanto na medicina humana como na veterinária, e o uso da droga antimicrobiana é considerado o fator mais importante para o aparecimento, a seleção e a disseminação de bactérias resistentes aos antimicrobianos (UNLU et al., 2011).

O aparecimento da resistência a antimicrobianos na família Enterobacteriaceae é um importante problema que requer uma atenção imediata. O aumento da prevalência de Enterobactérias, especialmente Escherichia coli resistente a antibióticos, não apenas as cepas patogênicas mas também as cepas comensais, sugere que esta comunidade pode agir como um reservatório de genes de resistência e que os alimentos podem contribuir para a disseminação dessas cepas resistentes (AMADOR et al., 2009). A E. coli está presente no trato intestinal de humanos e de animais, e sua detecção em alimentos processados é um indicativo de contaminação com matéria fecal. Isso também evidencia um controle inadequado do ambiente da unidade de processamento do alimento, a má higiene pessoal dos manipuladores e a qualidade inferior do produto finalizado (KOUSTA et al., 2010; DIAS et al., 2012). O presente trabalho foi conduzido para investigar a ocorrência de E. coli em queijo muçarela produzido em uma pequena fazenda em Minas Gerais e para determinar a resistência antimicrobiana das cepas isoladas de E. coli frente a um painel de 12 drogas antimicrobianas comumente usadas na medicina humana e veterinária.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleção de amostras e cultura.

Neste estudo foram analisadas 59 amostras de queijo produzidas com leite não pasteurizado (queijo muçarela) coletadas junto ao produtor em uma pequena fazenda no Vale do Jequitinhonha (Noroeste de Minas Gerais, Brasil), durante o período de julho de 2004 a janeiro de 2006. Quinze amostras de queijo foram coletadas a cada seis meses (uma amostra foi perdida, resultando no total 59 amostras de queijo), em dois dias

diferentes de coleta, de diferentes lotes de queijo; para este estudo um lote foi definido como os queijos produzidos em um único dia. Todas as amostras foram mantidas sob refrigeração, em sacos plásticos, sem nenhuma informação sobre a data de produção e a validade do produto. As amostras foram transportadas sob refrigeração (4-6°C) em caixas térmicas contendo pacotes de gelo e foram analisadas imediatamente logo após a chegada ao laboratório. Uma porção de 25 g de cada queijo foi triturada e homogeneizada com 225 mL de caldo nutriente (Difco, Detroit, USA) por dois minutos em baixa velocidade usando um triturador, e a suspensão foi incubada a 37°C por 24h (LOGUERCIO & ALEIXO, 2001). Um mL da cultura de cada amostra em caldo nutriente foi misturada com 9 mL de caldo MacConkey (Oxoid, Hampshire, UK) e em seguida foi incubada a 37°C por 24h. Uma alça de cultura de cada tubo foi distribuída em ágar Mac Conkey. Após incubação. no mínimo cinco colônias características morfológicas típicas de E. coli foram selecionadas de cada uma das placas de petri com ágar MacConkey e submetidas a testes bioquímicos, incluindo sulfeto de hidrogênio, citrato, urease e indol, para confirmação da espécie como E. coli (KONEMAN et al., 1997; LOGUERCIO & ALEIXO, 2001).

Teste de Susceptibilidade

Testes de susceptibilidade a antimicrobianos foram realizados utilizando o método de difusão de disco recomendado pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2002). Todos os isolados de E. coli foram inoculados em caldo de infusão de cérebro e coração e incubados a 37°C por 24h. Depois disso, 100 µL dessa cultura foram semeados em ágar Muller Hinton (MHA, CM0337, Oxoid, Hampshire, UK), e em seguida os discos de antibióticos (CEFAR, São Paulo, BR) foram colocados superfície do ágar. A concentração antimicrobianos usados foi: ampicilina (AMP, 10 µg); amoxicilina (AMO, 10 µg); tetraciclina (TET, 30 µg); amoxicilina/ácido clavulânico (AMC, 30 µg); amicacina (AMK, 30 µg); cefalotina (CFL, 30 µg); ceftriaxona (CEF, 30 µg); gentamicina (GEN, 5 µg); estreptomicina (STR, 10 µg); ácido nalidíxico (NAL, 30 μg); cotrimoxazol (COT, 25 μg); ciprofloxacina (CIP, 5 µg). As placas MHA foram incubadas a 37°C e avaliadas após 24h de incubação. Todas as zonas translúcidas que apareceram ao redor dos discos foram medidas utilizando uma régua, e as cepas foram classificadas como resistentes, intermediárias ou sensíveis de acordo com as recomendações da NCCLS (2002) (atualmente Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI). As linhagens de E. coli ATCC 43889 e ATCC 8739 foram utilizadas como controle (MicroBiologics-Licensed Derivative, Plast Labor, BR).

RESULTADOS E DISCUSSAO

Cento e quarenta e sete cepas de *E. coli* foram isoladas a partir de 38 queijos muçarela (64,4%)

positivos para E. coli dentre as amostras analisadas Este resultado é menor do que aquele descrito por Teixeira et al. (2007), que descreveram que 90% das amostras de soro de queijo muçarela provenientes de diferentes regiões de Minas Gerais estavam contaminadas com E. coli. As cepas isoladas foram testadas para verificação de sua susceptibilidade frente a um painel de 12 agentes antimicrobianos. Os resultados de todas as cepas analisadas estão sumarizados na Figura, na qual estão representadas as proporções de isolados sensíveis, intermediários e resistentes de acordo com as regras da NCCLS (atualmente conhecida como Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI). As cepas de E. coli provenientes do queijo muçarela apresentaram uma alta resistência a tetraciclina (52,4%), cefalotina (44,2%), amicacina (34,1%), ampicilina (31,3%) e ácido nalidíxico (30,0%). Por outro lado, a sensibilidade a ciprofloxacina, ceftriaxona e cotrimoxazol foi encontrada em altas porcentagens, de 93,3%, 91,2% e 90.5%, respectivamente, entre as cepas examinadas (Figura 1). Amador et al. (2009) examinaram 20 amostras de queijo em Portugal e descreveram uma alta resistência antimicrobiana entre as cepas de E. coli a tetraciclina (46,5%), o que está de acordo com o presente trabalho.Unlu et al. (2011) examinaram 600 amostras de queijo na Turquia e descreveram uma alta resistência antimicrobiana a tetraciclina (58,6%) e ampicilina (53,3%) entre as cepas de E. coli

recuperadas dos queijos, o que coincide com o presente trabalho. A resistência antimicrobiana entre as Enterobactérias aos betalactâmicos, aminoglicosídeos, sulfametoxazol/trimetroprima e tetraciclinas tem aumentado drasticamente (SCHROEDER et al., 2004; PATERSON, 2006) devido ao extensivo uso dessas drogas antimicrobianas na prática veterinária. Paneto et al. (2007) examinaram 50 amostras de queijo Minas frescal no Brasil, e a frequência de resistência antimicrobiana encontrada entre as cepas recuperadas de E. coli foram similares às do presente trabalho com relação a ampicilina (29,0%), cefalotina (60,0%) e ácido nalidíxico (40,0%) e menores para a tetraciclina (31,0%). O fenótipo de múltiplas resistências (MDR) foi definido como aquele apresentando resistência a três ou mais drogas antimicrobianas estruturalmente diferentes. O fenótipo MDR foi identificado em 60,0% das cepas examinadas no presente trabalho, e a resistência a 3 ou 4 antimicrobianos foi a mais encontrada entre as cepas examinadas, sendo os principais genótipos de resistência amicacina-ácido nalidíxico-tetraciclina (11 cepas), ciprofloxacina-ácido nalidíxico-estreptomicina (6 cepas), ampicilina-ácido nalidíxico-tetraciclina (6 cepas), ampicilinaestreptomicina-tetraciclina (4 cepas) e amoxicilinaácido nalidíxico-cefalotina-tetraciclina (4 cepas), o que representa 34,0% do total dos genótipos de múltipla resistência recuperados entre as cepas de E. coli.

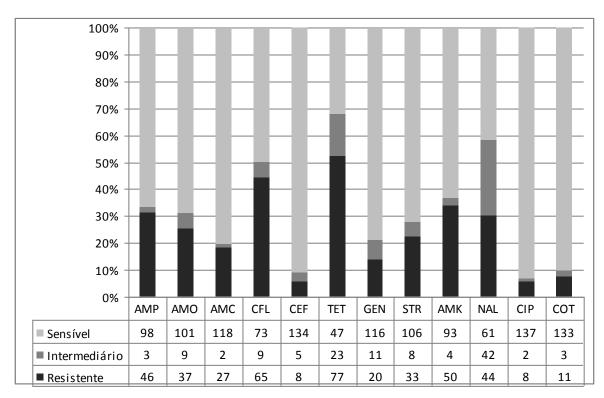


Figura 01- Resultados da susceptibilidade antimicrobiana de estirpes de *Escherichia coli* isoladas de queijo muçarela (n = 147) no Brasil. AMP - ampicilina; AMO - amoxicilina; AMC- amoxicilina/ácido clavulânico; CFL - cefalotina; CEF - ceftriaxona; TET - tetraciclina; GEN- gentamicina; STR - estreptomicina; AMK - amicacina; NAL - ácido nalidíxico; CIP - cicrofloxacina; COT – cotrimoxazol.

A frequência de MDR determinada neste estudo foi o dobro daquela descrita por Amador et al. (2009) para as cepas de E. coli recuperadas dos queijos em Portugal (31,0%), e também os genótipos de resistência encontrados eram completamente diferentes daqueles descritos no presente trabalho. A possibilidade de uma transmissão horizontal dos genes de resistência a drogas antimicrobianas encontrados entre as cepas isoladas a partir de alimentos para a microbiota humana pode se tornar um motivo de grande preocupação, porque diversos estudos têm indicado essa possibilidade de transferência (ANGULO et al., 2004). Assim, os seres humanos podem ser colonizados por cepas de E. coli de origem animal carregando genes de resistência antimicrobiana, e devido à resistência aos agentes antimicrobianos mais comumente utilizados, essas bactérias podem causar infecções nos seres humanos, para as quais limitadas opcões terapêuticas estão disponíveis (HAMMERUM & HAUER, 2009).

Estudos experimentais já demonstraram que um tratamento utilizando altas temperaturas, como, por exemplo, durante a filagem do queijo muçarela a 80°C por 5 minutos, é efetivo para controlar o crescimento/aparecimento de cepas de E. coli. (SPANO et al., 2003). No presente estudo foi utilizada para a filagem uma temperatura entre 75 e 85°C por 10 minutos, segundo informações do produtor rural, indicando um eficiente tratamento por calor. A identificação da fonte de contaminação dos queijos está além do objetivo deste trabalho, uma vez que o objetivo era analisar o risco potencial dos queijos como possíveis veículos para a disseminação de E. coli junto ao consumidor final. Entretanto é conhecido que os queijos podem ser facilmente contaminados pelas mãos dos manipuladores de alimentos, os quais apresentam uma higiene pessoal insatisfatória (KOUSTA et al., 2010) nos diferentes pontos ao longo do processo de preparo dos queijos.

Campos et al. (2009) descreveram a análise de 92 amostras coletadas das mãos dos manipuladores de alimento, 24 amostras de leite cru e queijo Minas frescal para a detecção da presença de E. coli em uma planta de processamento de queijos em Goiás. Quarenta e sete cepas de E. coli foram obtidas das diferentes fontes acima descritas e comparadas através perfil de macrodigestão de desoxirribonucleico (DNA) e eletroforese de campo pulsado (PFGE). Com base nos resultados da genotipagem por PFGE foi possível determinar que uma cepa isolada das mãos do manipulador de alimentos se mostrou idêntica a uma cepa isolada dos queijos, sugerindo, para esse caso, a mão do manipulador como provável fonte de contaminação para o queijo. Dias et al. (2012) descreveram na implementação de boas práticas de manufatura (GMP) em uma pequena unidade produtora de muçarela no Paraná, Brasil, que as maiores dificuldades na implementação da GMP eram relacionadas dificuldade em mudar as práticas de higiene inadequadas dos manipuladores de alimentos. Pesquisa e esforços educacionais para identificar os potenciais fatores de risco na fazenda de produção de queijo irão

melhorar as qualidades dos produtos lácteos, ajudando a reduzir ou prevenir a contaminação por patógenos específicos dos alimentos. A identificação, na própria fazenda, desses reservatórios de bactérias pode ajudar na implementação de programas de redução da carga bacteriana dos produtos.

Como conclusão, o presente trabalho mostrou uma grande resistência a antimicrobianos disseminada entre as cepas de *E. coli* recuperadas dos queijos muçarela para as seguintes drogas: tetraciclina, cefalotina, amicacina, ampicilina e ácido nalidíxico, assim como a existência de um alto fenótipo MDR. Dessa maneira, o queijo muçarela pode ser considerado um veículo para a transmissão de cepas de *E. coli* com fenótipo MDR e para a disseminação de genes de resistência a drogas antimicrobianas para a microbiota humana, o que é motivo de grande preocupação.

REFERÊNCIAS

AMADOR, P.; FERNANDES, R.; PRUDÊNCIO, C.; BRITO, L. Resistance to β-lactams in bacteria isolated from defferent types of Portuguese cheese. **International Journal of Molecular Sciences**, v.10, p.1538-1551, 2009.

ANGULO, F. J.; NARGUND, V. N.; CHILLER, T. C. Evidence of an association between use of antimicrobial agents in food animals and antimicrobial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance. **Journal of Veterinary Medicine**, v.51, p.374-379, 2004.

CAMPOS, M. R. H.; ANDRÉ, M. C. D.P. B.; BORGES, L. J.; KIPNIS, A.; PIMENTA, F. C.; SERAFINI, A. B. Genetic heterogeneity of *Escherichia coli* strains isolated from raw Milk, Minas frescal cheese, and food handlers. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, p.1203-1209, 2009.

DIAS, M. A. C.; SANT'ANA, A. S.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F.; OLIVEIRA, C. A. F.; BONA, E. On the implementation of good manufacturing practices in a small processing unity of mozzarella cheese in Brazil. **Food Control**, v.24, p.199-205, 2012.

HAMMERUM, A. M.; HEUER, O. E. Human health hazards from antimicrobial-resistant *Escherichia coli* of animal origin. **Clinical Infectious Diseases**, v.48, p.916-921, 2009.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; SCHREKENBERGER, P.; JANDA, C.; WINN, W.C. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 5ed. Philadelphia, Lippincott Company, p.363-393, 1997.

KOUSTA, M.; MATARAGAS, M.; SKANDAMIS, P.; DROSINOS, E. H. Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. **Food Control**, v.21, p.805-815, 2010.

LOGUERCIO, A. P.; ALEIXO, J. A. G. Microbiologia de queijo tipo Minas frescal produzido artesanalmente. **Ciência Rural,** v.31, p.1063-1067, 2001.

National Committee for Clinical Laboratory. Performance Standards for Antimicrobial disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard, second ed. M31-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne (P.A), USA, 81pp, 2002.

PANETO, B. R.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; MACEDO, C.; SANTO, E.; MARIN, J. M. Occurrence of toxigenic *Escherichia coli* in raw milk cheese in Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v.59, p.508-512, 2007.

PATERSON, D. L. Resistance in Gram-negative bactéria: *Enterobactiriaceae*. **American Journal of Infection Control**, v.34, p.20-28, 2006.

SPANO, G.; GOFFREDO, E.; BENEDUCEL, L.; TARANTINO, D.; DUPUY, A.; MASSA, S. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture of Mozzarela cheese. **Letters in Applied Microbiology**, v.36, p.73-76, 2003.

SCHROEDER, C. M., MENG, J.; WHITE, D. G. Retail meat and poultry as a reservoir of antimicrobial-resistant *Escherichia coli*. **Food Microbiology**, v.21, p.249-255, 2004.

TEIXEIRA, L. V.; FONSECA, L. M.; MENEZES, L. D. M. Avaliação da qualidade microbiológica do soro de queijos Minas padrão e mozarela produzidos em quatro regiões do estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, p.264-267, 2007.

UNLU, T.; KOLUMAN, A.; BURKAN, Z. T.; TEZEL, A.; AKCELIK, E. N.; CALIM, H. D.; ATA, Z. Incidence and antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from different kinds of cheese. **Journal of Food Safety**, v.31, p.54-60, 2011.