



AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE CEPAS DE *SALMONELLA* SPP. ISOLADAS DE AVIÁRIOS FRENTE A ANTIBIÓTICOS CARBAPENÊMICOS

Naomy S. R. Paes Barreto¹; Míriam G. Marquezini²; Renata Bromberg³; Ernani Porto^{4†};
Gilma S. Sturion⁴

Nº 15228

RESUMO - O consumo mundial de carne de frango tem aumentado de maneira significativa nas últimas décadas. Por outro lado, a preocupação dos produtores de alimentos, com a inocuidade de seus produtos também tem aumentado na mesma proporção. Durante as etapas da operação de abate de maneira geral, as contaminações cruzadas são as principais causas de disseminação de microrganismos patogênicos nos produtos obtidos e causadores de gastroenterites no consumidor. Espécies da enterobactéria *Salmonella* se enquadram como um dos maiores riscos desse tipo de doença devido a sua associação com os inúmeros surtos ocorridos a nível mundial, após o consumo desses produtos. Algumas enterobactérias possuem um gene *blaKPC*, que codifica a enzima carbapenemase, que confere resistência a antibióticos carbapenêmicos, agravando mais a situação. A presente pesquisa objetivou a verificação de culturas de *Salmonella* spp isoladas de aviário e linha de abate de frangos de um frigorífico no estado do Rio Grande do Sul, apresentarem resistência a antibióticos carbapenêmicos. As linhagens foram submetidas ao teste de resistência a antibióticos carbapenêmicos pelo método de disco difusão com carbapenêmicos e pesquisa do gene de resistência a carbapenêmicos *blaKCP*, pela técnica de PCR. Observou-se a resistência das culturas somente ao antibiótico imipenem e não foi evidenciado o gene *blaKPC* nas culturas de *Salmonella* spp. isoladas na presente pesquisa. Não foi encontrada nenhuma cultura de *Salmonella* spp. com a resistência a carbapenêmicos no aviário e abatedouro de aves utilizado na pesquisa.

Palavras-chaves: *Salmonella* spp., carbapenêmicos, resistência.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Ciências Biológicas, UNIP, Campinas-SP.

2 Orientadora: Bióloga do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas-SP; miriamg@ital.sp.gov.br.

3 Co-orientadora: Pesquisador do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas-SP.

4 Colaborador: Pesquisador da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba-SP.

† Falecido



ABSTRACT- *The world consumption of chicken meat has increased significantly in the last decades. On the other hand, the concern of the food producers with the safety of their products also has increased in the same proportion. During the steps of the slaughter operation in general, cross contamination are the main causes of pathogenic microorganisms dissemination in the obtained products and the causes of gastroenteritis in the consumer. Species of the Enterobacter Salmonella fall as the highest risks of this kind of disease, due to their association with countless outbreaks which occurred worldwide, after the consumption of these products. Some enterobacter have a blaKPC gene, which codes for the carbapenemase enzyme that confers resistance to carbapenems antibiotics, aggravating the situation. The present research aimed to verify the capacity of Salmonella spp cultures isolated from aviary and slaughter line of chicken in a fridge of Rio Grande do Sul state to produce biofilms and be resistant to carbapenems antibiotics. The lineages were submitted to the carbapenems antibiotic resistance test by the disk diffusion method with carbapenems and the research of the resistance to carbapenems gene blaKCP using the PCR technique. It was observed the resistance of the cultures only to the imipenen antibiotic and It was not evidenced the gene blaKPC in Salmonella spp. cultures isolates in this research. It was not found any Salmonella spp. culture resistant to carbapenems in the aviary and slaughter line of birds used in this research.*

Key-words: *Salmonella* spp., carbapenems, resistance

1. INTRODUÇÃO

O consumo mundial de carne de aves teve um elevado crescimento entre os anos de 2000 e 2011, que passou de 29,09Kg por habitante a 47,38Kg. Ao longo do ano de 2012 houve uma pequena retração, sendo estimado o consumo em 45Kg por habitante (ROCHA, 2006; UBABEF, 2013). O fator determinante para a alteração do consumo foi o econômico, pois os métodos de exploração na indústria agrícola e o desenvolvimento da tecnologia de abate permitiram produzir carne de aves a preços mais baixos do que outros tipos de carnes, tornando-as mais atrativas para o consumidor (GOKSOY et al., 2004).

Os microrganismos patogênicos e os deteriorantes são introduzidos na cadeia da carne por meio das próprias aves ao adentrarem nos abatedouros, disseminando-se pelas instalações, equipamentos e utensílios (MORENO, 2006). Durante as etapas do abate, as contaminações cruzadas são responsáveis pela disseminação dos microrganismos, cuja quantidade nas carnes frescas e produtos cárneos podem ser suficientes para provocar, nos consumidores, gastroenterites e doenças de origem alimentar (BERRANG et al., 2000).



A *Salmonella* spp. é uma bactéria pertencente a família *Enterobacteriaceae* e sua presença em alimentos é um problema de saúde pública relacionado a graves intoxicações alimentares, sendo a principal responsável por vários surtos ao redor do mundo (WHO, 2013).

Os antimicrobianos carbapenêmicos pertencem ao grupo de antibióticos beta-lactâmicos nos quais o átomo de enxofre no anel tiazolidínico da molécula de penicilina é substituído por um átomo de carbono. Tienamicinas integram um subgrupo de carbapenêmicos que têm um átomo de enxofre como o primeiro componente da corrente lateral (ANVISA, 2012). A partir de 1980, o imipenem, meropenem e ertapenem foram indicados como alternativas terapêuticas de última escolha em casos de infecções graves provocadas por bactérias Gram-negativas resistentes a outros antibióticos. Os carbapenêmicos formam um dos principais conjuntos terapêuticos de amplo espectro contra infecções causadas por bactérias Gram-negativas, como as *Enterobacteriaceae*, e os bacilos Gram-negativos não fermentadores da lactose como o *Acynetobacter* spp. e a *Pseudomonas aeruginosa*. Esta característica está relacionada a sua estabilidade a hidrólise das enzimas beta lactamases (SHA, 2008; ZHANEL et al., 2007).

O gene plasmidial que codifica a enzima KPC, identificado como *bla_{KPC}*, é transmissível entre as espécies da família *Enterobacteriaceae* (MARTINS et al., 2010). Por ser um gene localizado em um plasmídeo móvel, é facilmente transferido entre bactérias da mesma espécie ou entre espécies diferentes durante etapas de crescimento. Onze diferentes variantes KPC foram isoladas até o presente momento, sendo a KPC-2 e KPC-3 as mais comuns no Brasil, sendo que, a diferença entre as enzimas está na substituição de um ou dois aminoácidos (ROBLEDO et al., 2010; WHO, 2013).

A presente pesquisa objetivou a verificação de culturas de *Salmonella* spp isoladas de aviário e linha de abate de frangos de um frigorífico no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, apresentarem resistência a antibióticos carbapenêmicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Culturas utilizadas e ativação inicial.

As culturas de *Salmonella* spp. utilizadas no experimento foram obtidas da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia do Centro de Tecnologia de Carnes (CTC), pertencente ao Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), isoladas previamente de amostras coletadas em um aviário e abatedouro de aves. A ativação foi realizada a partir da inoculação de 1mL em 10mL de caldo Triptona de Soja (TSB), incubado a 35°C por 24h e estocado até o uso em geladeira (8±1°C) (UZUNOVA-DONEVA & DONEV, 2005).



2.2. Ajuste do inóculo inicial.

Na preparação da solução bacteriana, o inóculo foi suspenso em solução salina 0,85%, agitado em Vortex (AP56, Phoenix) por aproximadamente 60 segundos e a turbidez obtida foi aferida utilizando-se o equipamento Densimat (Ref. 99 234, Biomerieux) até a leitura de 0,5 McFarland (Figura 2). Desta forma foi obtida uma solução bacteriana de 10^8 UFC de *Salmonella* spp. por mL. Para aferir a contagem real das células em suspensão, foi realizada a contagem por plaqueamento em profundidade em TSA, com incubação a 35°C por 24h (DOWNES; ITO, 2001).

2.3. Avaliação da resistência a antibióticos carbapenêmicos

Após o ajuste da concentração do inóculo, a superfície seca da placa de Petri contendo o ágar Müeller-Hinton foi inoculada deslizando-se suabe em toda a superfície estéril do ágar. Repetiu-se o procedimento deslizando-se outras duas vezes, girando a placa aproximadamente 60° cada vez, a fim de assegurar a distribuição uniforme do inóculo e ao final, passou-se o suabe na margem interna da placa de ágar. O conjunto de antimicrobianos (imipenem 10mg, meropenem 10mg, ertapenem 10mg) de discos foi colocado na superfície da placa de ágar semeada. Cada disco inoculado foi manualmente distribuído por igual, de maneira que a distância de centro para centro não excedeu 24mm (Figura 3). As placas foram invertidas e colocadas numa estufa, a 35°C, até 15min após a aplicação dos discos. Após 16-18 horas de incubação, examinou-se cada placa. Foi realizada a medição dos halos de inibição com o auxílio de uma régua e, os resultados, comparados à tabela A2 e 2I disponível no M23— *Development of In Vitro Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters* do CLSI (2010) para classificação quanto à resistência.

2.4. Detecção do gene *bla*_{KPC}.

Foi realizada a transferência de 1mL da cultura ativa e padronizada na escala de 0,5 McFarland para um tubo tipo eppendorf. O tubo foi submetido à centrifugação por 4min a 9000rpm, em centrífuga de bancada (Q22E24, Quimis), o sobrenadante descartado e o *pallet* ressuspendido e homogeneizado em 100µL de água estéril. O tubo foi congelado a -82°C por 15min e, em seguida aquecido em banho seco (MA651, Marconi) a 90°C por 15min. Foi preparada uma solução mix composta de, *primer bla*_{KPC} *forward*: sequência 5' -3': CTGTCTTGTCTCTCATGGCC, *primer bla*_{KPC} *reverse*: sequência 5' -3': CCTCGCTGTGCTTGTCATCC, Taq DNA polimerase recombinante, Mix de desoxyribonucleotídeos (dNTPs), Tampão de MgCl₂ e DNA previamente extraído. Os tubos de reação foram levados ao termociclador (Proflex, Life Technology) apresentado na figura 4, onde realizou-se a amplificação do DNA com desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45seg, anelamento do primer a 65°C por 45seg e extensão a

72°C por 45seg, além de uma extensão final de 72°C por 7min. O resultado da amplificação foi visualizado por meio da presença de uma banda específica em eletroforese em gel de agarose 2%. Para controle negativo foi utilizada uma cultura de *Samonella* Typhimurium ATCC 14028 e como controle positivo, uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* IAL 2470.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Avaliação da resistência a antibióticos carbapenêmicos

Dentre as 36 cepas de *Salmonella* spp. avaliadas, 100% apresentaram-se sensíveis aos antimicrobianos ertapenem e meropenem. A maior frequência de cepas resistentes foi observada para imipenem, com 32% e resistência intermediária de 58% (Fig. 1).

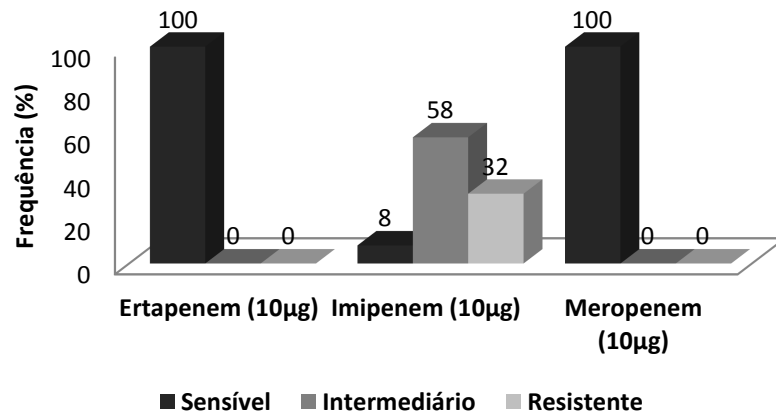


Figura 2. Perfil de suscetibilidade de *Salmonella* spp. a antibióticos carbapenêmicos.

3.2. Detecção do gene *bla*_{KPC}

Após análise de PCR, não foi evidenciada a presença do gene *bla*_{KPC} nas 36 amostras analisadas. O padrão positivo de *K. pneumoniae* IAL 1420 apresentou o gene (Fig. 2), comprovando a eficiência do primer utilizado no método analítico.

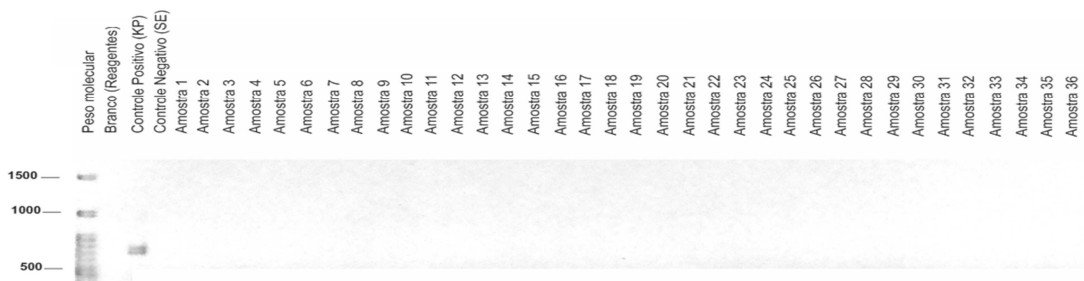


Figura 2. Amplificação de PCR de fragmentos de DNA das culturas de *Salmonella* spp. isoladas, com o emprego do primer do gene *bla*_{KPC}.



9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015
10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo

A alta frequência de cepas resistentes à imipenem pode ser explicada pela capacidade de algumas linhagens de *Salmonella* spp. possuírem genes que codificam enzimas beta-lactamase. As beta-lactamases interferem na estrutura do anel β -lactâmico dessa classe de fármacos deixando-os sem atividade antimicrobiana.

Mesmo tendo apresentado nesta pesquisa um perfil de resistência, o imipenem, de acordo com CDC (2013) apresenta menor sensibilidade (42 a 94%) e especificidade (28 a 93%) com a enzima KPC e quando comparado com o ertapenem e o meropenem, que apresentam melhores afinidades com a enzima, com sensibilidade de 90 a 100% e 48-94%, e especificidade de 81 a 93% e 96-100%, respectivamente (CDC, 2013).

Nos Estados Unidos o Sistema Nacional de Monitoramento da Resistência Antimicrobiana realizou entre 2002 e 2006, uma avaliação em amostras de carne de varejo, onde nenhuma das avaliadas apresentou resistência ao imipenem, ertapenem e meropenem. Foram encontradas, no entanto resistências a outras classes de antibióticos, como a ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamidas e tetraciclina (ZHAO et al., 2009).

No Brasil, mesmo com uma alta incidência de *Salmonella* spp. e outras enterobactérias, não foram relatados casos de microrganismos isolados de produtos de origem alimentar com resistência aos antibióticos carbapenêmicos. Os estudos em relação a este tipo de resistência estão concentrados na área hospitalar, onde são comumente encontrados em casos de septicemia ou infecções hospitalares (MONTEIRO & SANTOS, 2009; PEIRANO et al., 2009; ALVES & BEHAR, 2013).

O resultado da resistência a imipenem encontrado no trabalho, pode estar relacionado a uma enzima codificada por um gene cromossomal (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-H} e *bla*_{OXA}), já que o gene plasmidial *bla*_{KPC} não foi localizado nas linhagens durante o estudo.

No Brasil, foram isoladas de aviários, culturas de *Salmonella enterica* sorotipo Schwarzengrund resistentes a β -lactâmicos, incluindo cefalosporinas de espectro expandido (cefotaxima, ceftazidima, cefepime), aztreonam, e carbapenens. Através de análise molecular foram encontrados os genes β -lactamase do *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-H} e *bla*_{OXA}, e o gene plasmidial *bla*_{KPC} (SILVA et al., 2011).

Nos EUA, foram encontradas culturas de *Salmonella* spp. isoladas de uma fazenda de suínos, as quais foram submetidas a avaliações (genotípicas e fenotípicas) e foram confirmadas a presença da resistência a antibióticos carbapenêmicos (SILVA et al., 2013).

O uso indiscriminado de antibióticos nas etapas de criação dos animais pode contribuir para o surgimento de microrganismos adaptados a estes fármacos. Como uma medida inicial de controle de antibióticos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), criou o Programa



9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015 10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo

Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango (BRASIL, 2008) e vem realizando um monitoramento da contaminação de resíduos veterinários (ANVISA, 2012).

4. CONCLUSÃO

As culturas de *Salmonella* spp. são resistentes somente ao antibiótico imipenem, mas este resultado isolado não pode caracterizar uma resistência a antibióticos carbapenêmicos, sendo necessária uma maior investigação. Não foi evidenciada a presença do gene *bla_{KPC}* nas culturas de *Salmonella* spp. isoladas do aviário e linha de abate de frangos;

Considera-se que os resultados desta pesquisa poderão contribuir para subsidiar os estudos de controle do uso de antibióticos na cadeia avícola visando a garantia do alimento seguro e a saúde do consumidor. Estudos complementares com abrangência nacional se fazem necessários, assim como, a atualização de dados epidemiológicos dos órgãos regulatórios.

5. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq pela bolsa PIBIC concedida

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Relatório de pesquisa em vigilância sanitária: monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em enterococos e salmonelas isolados de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil; Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango – PREBAF.** 2012. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/73f1990042e128fdb2e4bf348b3626d1/Relat%C3%B3rioPrebaf-vers%C3%A3ofinal-mar2012.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 17 set. 2014.

ALVES, A.P.; BEHAR, P.R.P. Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de Kpc em um hospital terciário do sul do Brasil. **Revista da AMRIGS**, Porto Alegre, v. 57, n. 3, p. 213-218, 2013.

BERRANG, M.E.; DICKENS, J.A.; MUSGROVE, M.T. Effects of hot water application after defeathering on the levels of *Campylobacter*, coliform bacteria and *Escherichia coli* on broiler carcasses. **Poultry Science**, Athens, v. 79, p. 1689-1693, 2000.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Michigan retail store recalls ground beef products due to possible *Salmonella* Contamination:** FSIS-RC-009-2013. 2013.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.** Twenty-Second Informational Supplement. Wayne. M100 – S20; Vol. 30 Nº 1.p.22-34. 2010.

DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** 4th ed. 2001.

GOKSOY, E.O., KIRKAN, S., KOK, F. Microbiological quality of broiler carcasses during processing in two slaughterhouses in Turkey. **Poultry Science**, Isikli Koyu Aydin, v. 83, p. 1427-1432, 2004.

MARTINS, W.M.B.S.; ALMEIDA, A.C.S.; SILVA, B.O.; VILELA, M.A.; MORAIS, M.M.C. Prevalência do gene *bla_{KPC}* em isolados clínicos de Enterobacteriaceae e não fermentadores encontrados em amostras clínicas em um hospital universitário do Recife. In: JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 10., 2010,



9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015
10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo

Recife. **Anais...** Disponível em: <<http://www.sigeventos.com.br/jepex/inscricao/resumos/0001/R1934-1.PDF>>. Acesso em: 02 maio 2013.

MONTEIRO, J.; SANTOS, A.F. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, São Paulo, v. 53, n. 1, p. 333-334, 2009.

MORENO, B. **Higiene e inspección de carnes – I**. León: Ediciones Díaz de Santos, 2006. 620 p.

PEIRANO, G.; SEKI, L.M.; PASSOS, V L.V.; PINTO, M.C.F.G.; GUERRA, L.R.; ASENSI, M.D. Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Rio de Janeiro, v. 63, n. 2, p. 265-268, 2009.

ROBLEDI, I.E.; AQUINO, E.E.; SANTÉ, M.I.; SANTANA, J.L.; OTERO, D.M.; LEÓN, C.F.; VÁSQUEZ, G.J. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. **J. Antimicrob. Agents Chemother. Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Puerto Rico, v. 54, p. 1354-1357, Mar. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2825984/?tool=pubmed>>. Acesso em: 02 maio 2013.

ROCHA, D. **Ambiente em foco: consumo de carne de frango já supera o de carne bovina**. 2006. Disponível em: <<http://www.ambienteemfoco.com.br>>. Acesso em: 18 ago. 2012.

SHAH, P.M. Parenteral carbapenemas. **Clinical Microbiology and Infection**. Frankfurt, v. 14, n. 11, p. 175–180, 2008.

SILVA, K.C.; FONTES, L.C.; MORENO, A.M.; ASTOLFI-FERREIRA, C.S.; FERREIRA, A.J.P.; LINCOPAN, N. Emergence of extended-spectrum- β -lactamase CTX-M-2-producing *Salmonella enterica* serovars Schwarzengrund and Agona in poultry farms. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, São Paulo, v. 57, p. 3458–3459, 2011.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.E.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2007. 552 p.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA. **Relatório anual 2011/2012**, 2013. Disponível em: <<http://www.ubabef.com.br/files/publicacoes/732e67e684103de4a2117dda9ddd280a.pdf>>. Acesso em: 10 abr. 2014.

UZUNOVA-DONEVA, T.; DONEV, T. Anabiosis and conservation of microorganisms. **Journal of Culture Collections**, Bulgária, v. 4, p. 17-28, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Drug-resistance *Salmonella***. 2005. Disponível em:

ZHANEL, G.G.; WIEBER, R.; DILAY, L.; THOMSON, K.; RUBINSTEIN, E.; HOBAN, D.J.; NOREDDIN, A.M., KARLOWSKY, J.A. Comparative review of the carbapenems. **Drugs**, Winnipeg, v. 67, p. 1027–1052, 2007.

ZHAO, S.; BLICHENSTAFF, K.; GLENN, A.; AYERS, S.L.; FRIEDMAN, S.L.; ABBOTTAND, J.W.; MACDERMOTT, P.F. β -lactam resistance in *Salmonella* strains isolated from retail meats in the United States by the National Antimicrobial Resistance Monitoring System between 2002 and 2006. **Applied and Environmental Microbiology**, Laurel, v. 75, n. 25, p. 247624-7630, 2009. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/75/24/7624.full>>. Acesso em: 04 mar. 2015.