

Caracterização de isolados bacterianos e seu perfil de resistência no setor de avicultura da UFRRJ: uma visão em Saúde Única

Sophia Marques Potz de Oliveira da Costa^{1*}, Mario Tatsuo Makita², Caio Nunes Christoffe Simões², Paulo Roberto Lima de Azevedo Junior², Thérèse Camille Nascimento Holmström², Miliane Moreira Soares de Souza³

¹Discente no Curso de Medicina Veterinária – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ – Seropédica/RJ – Brasil – *Contato: potzsophia@gmail.com

²Discente no Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias – UFRRJ – Seropédica/RJ – Brasil

³Docente titular no Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ – Seropédica/RJ – Brasil

INTRODUÇÃO

A avicultura é a criação de aves para produção de carnes, ovos e derivados, sendo uma importante atividade agrícola para o Brasil. Teve seu início como uma atividade de subsistência, mas rapidamente tornou-se comercial, na primeira metade do século XX⁷. O Brasil, atualmente, tornou-se um dos principais exportadores de frango¹, sendo o Sudeste a região com maior demanda de aves para as indústrias consumidoras de carne.⁷ De modo geral, os frangos ficam acomodados em uma cama constituída de substrato, sendo o mais utilizado a maravalha. Espera-se que os micro-organismos encontrados na cama de maravalha sejam os mesmos encontrados nas excretas das aves⁶. Além disso, a concentração de bactérias é cerca de 10 vezes menor do que a do trato gastrointestinal dos frangos. No entanto, essa concentração pode aumentar 10 vezes a cada lote de aves reutilizado na mesma cama⁶. Entende-se, portanto, que o reaproveitamento da maravalha pode ser um potencial contaminante para os frangos de uma granja, e por esse motivo, foi feita a coleta randomizada de amostras da cama onde esses animais ficaram alojados, e no enleiramento, a fim de analisar se esse processo fermentativo seria efetivo. Essas informações ressaltam a importância de fiscalização da cadeia produtiva da avicultura, que vai desde o nascimento dos pintinhos até o dia do abate. Todo esse preparo para a indústria e para a segurança dos produtos de origem animal abrange as mais diversas áreas da ciência, sendo a Microbiologia fundamental na identificação e no diagnóstico de possíveis microrganismos patogênicos, de potencial zoonótico e na análise de perfis de resistência à antimicrobianos. Sob essa ótica, vale ressaltar que, por muitos anos, antimicrobianos eram utilizados como aditivos zootécnicos para promoção de crescimento. Apesar dessa prática ter sido interrompida, ela perdurou por muitos anos, podendo ter deixado consequências relativas à resistência aos antimicrobianos. O presente estudo teve como objetivo identificar as bactérias isoladas e seu perfil de resistência antimicrobiana e compreender seu papel na Saúde Única.

MATERIAL E MÉTODOS

No Setor de Avicultura da UFRRJ, a produção de frango de corte é cíclica, e nesse trabalho, buscou-se coletar amostras de pintinhos recém-chegados de 1 dia, em frangos já adultos, e após 30 dias, foi feita mais uma coleta dos mesmos animais que antes eram os pintinhos recém-chegados.

Foram coletadas amostras com suabes, com meio de transporte, de traqueia de 5 frangos, cloaca de 30 frangos e cloaca de 25 pintinhos de 1 dia, totalizando 60 amostras de animais oriundos do setor de Avicultura da UFRRJ (Seropédica, Rio de Janeiro CEUA 9378290622).

Foram realizados testes fenotípicos de identificação presuntiva e bioquímica como preconizado por Koneman⁴. As amostras foram inoculadas em meio enriquecido e não seletivo Ágar Sangue de Carneiro a 5% (ASC-HiMedia ®) e em meios seletivos e diferenciais: Ágar MacConkey (Bastonetes Gram-Negativos)(AMC- MicroMED, ISOFAR®), Ágar Manitol Vermelho de Fenol (Coco Gram Positivos Aeróbios), e Ágar Azida Sangue de Carneiro 5% (Cocos Gram Positivos aeróbios facultativos).

Para aqueles isolados identificados como bastonetes e/ou cocobacilos Gram-negativos, foi realizada a bateria bioquímica IMVic e TSI (Triple Sugar Iron), nos quais foram avaliadas a produção de Indol, pela enzima triptofanase, avaliação da capacidade da bactéria utilizar a Via dos Ácidos Mistos (Vermelho de Metila-VM), e avaliação da capacidade da bactéria utilizar a Via do Butilenoglicol (Voges-Proskauer-VP). Além desses, foi avaliada a capacidade das bactérias em utilizarem o citrato como fonte exclusiva de carbono, pelo Citrato de Simmons, e a fermentação dos açúcares glicose, lactose e sacarose. Foi feita também a habilidade das bactérias de produzirem gás.

Para aqueles isolados identificados como coco Gram-positivos catalase positivos, foi realizada a prova da coagulase e resistência à bacitracina

(0,04UI)(SENSIFAR-CEFARR®) por meio dos discos antimicrobianos no Antibiograma com ágar Müller-Hinton. A prova da coagulase foi posteriormente realizada para a caracterização dos grupos de estafilococos coagulase-positivos e coagulase-negativos. Os isolados coagulase-positivos foram, então, submetidos à prova de fermentação dos carboidratos: maltose e manose, resistência a polimixina B e prova de Voges-Proskauer (VP) para identificação das espécies⁴.

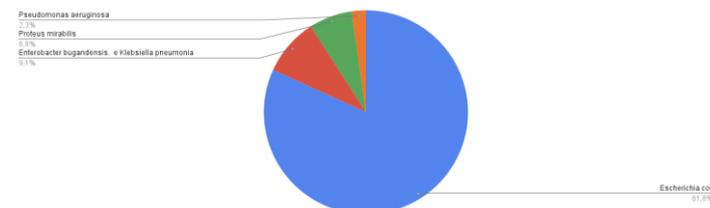
Para aqueles isolados identificados como cocos Gram-positivos catalase negativos, hemolíticos ou não, foi realizada a prova da bile-esculina, crescimento em caldo BHI (Brain Heart Infusion-HIMEDIA®), hipertônico (6,5% de NaCl) e açúcares para diferenciação de espécies de *Enterococcus spp.*⁴

A identificação fenotípica foi confirmada por meio da análise proteômica do Tempo de Voô de Ionização/ Dessorção por Laser Assistida por Matriz (MALDI-TOF MS). A avaliação foi realizada no Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica (LIMM) do Instituto de Microbiologia Paulo Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Para análise de resistência fenotípica os antimicrobianos utilizados foram: ampicilina (AMP 10ug), ceftazidima (CAZ 30ug), cefoxitina (CFO 30ug), cefotaxima (CTX 30ug), aztreonam (ATM 30ug), meropenem (MPM 10ug), cefepime (CPM 30ug), e amoxicilina+ácido clavulânico (AMC 30ug). Do total de bactérias isoladas, 26/44 apresentaram alguma resistência.

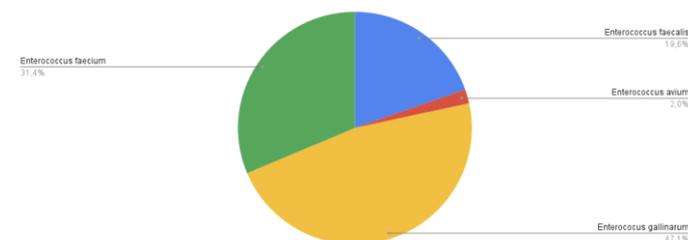
RESULTADO E DISCUSSÃO

Identificou-se 51 cepas de *Enterococcus spp.*, 25 *Staphylococcus spp.* coagulase negativa e 44 cepas de bastonetes gram-negativos.



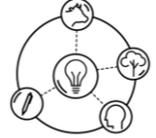
Azul: 81,8% *E.coli* - Laranja : 2,3% *Pseudomonas aeruginosa* – Verde: 6,8% *Proteus mirabilis* – Vermelho: 9,1% *Enterobacter bugandensis* e *Klebsiella pneumonia*

Figura 1: Resultado de amostras Gram-Negativas (Fonte Autoral).

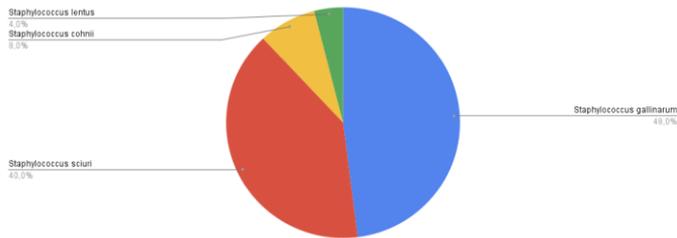


Verde: 31,4% *Enterococcus faecium* – Azul: 19,6% *Enterococcus faecalis* – Vermelho: 2,0% *Enterococcus avium* – Amarelo: 47,1% *Enterococcus gallinarum*

Figura 2: Resultado de amostras de *Enterococcus spp.* (Fonte Autoral).



XIII Colóquio Técnico Científico de Saúde Única, Ciências Agrárias e Meio Ambiente



Azul: 48% *Staphylococcus gallinarum* – Vermelho: 40% *Staphylococcus sciuri* – Verde: 4% *Staphylococcus lentus* – Amarelo: 8% *Staphylococcus cohnii*

Figura 3: Resultado de amostras de *Staphylococcus spp.* (Fonte Autoral).

Como esperado, o perfil de bactérias encontradas nas amostras isoladas foi o mesmo perfil descrito de microbiana gastrointestinal das aves. A pesquisa por genes de resistência se deu devido à importância de entender o perfil que as cepas bacterianas encontradas possuem. Isso porque, na avicultura, é comum a utilização de antimicrobianos para a profilaxia de algumas doenças em pintinhos³. De modo geral, esses medicamentos são pouco absorvidos pelo corpo do animal, levando-se a crer que grandes proporções de antimicrobianos são excretadas nas fezes enquanto composto original⁵. No entanto, a granja da UFRRJ não possui essa prática, tornando a pesquisa ainda mais interessante, uma vez que os dados coletados sobre resistência estão relacionados a genes transmitidos, provavelmente, por contaminação horizontal pelas matrizes, e não por seleção antimicrobiana.

Das amostras identificadas como *Staphylococcus spp.* coagulase negativa, foi feito o teste de resistência fenotípica mediada pelo gene *mecA*, sendo que nenhuma das amostras mostrou resistência à cefoxitina. Este é o antimicrobiano que avalia indicativo do gene *mecA*.² Além desse, foi feito o teste de resistência fenotípica com penicilina, que indica a presença do gene *bla_Z*.

Das amostras identificadas como bastonetes gram-negativas, foram encontradas muitas bactérias com resistência antimicrobiana fenotípica pelo método de disco difusão para ESBL.

Tabela 1: Perfil de resistência fenotípica

Antimicrobiana	Amostras com resistência
CPM	6/26
CTX	9/26
AMC	4/26
ATM	4/26
CFO	3/26
CAZ	7/26
AMP	19/26

Com base nesses dados, observou-se muitas amostras com resistência antimicrobiana à antimicrobianos usados corriqueiramente na clínica médica e veterinária. Isso indicia um problema grave

Das 51 amostras identificadas como *Enterococcus spp.*, 1 cepa *E.fecalis* de cloaca de frango adulto apresentou resistência fenotípica à vancomicina. É interessante destacar que algumas cepas de *Enterococcus gallinarum* e *Enterococcus casseliflavus* não apresentaram resistência fenotípica, apesar de possuírem resistência intrínseca à vancomicina².

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Torna-se evidente, portanto, que a avicultura é uma atividade de alto impacto na sociedade, principalmente em termos microbiológicos. O ambiente intestinal das aves é constituído por um conjunto de microrganismos que, em harmonia, beneficiam o animal. Quando em desbiose, o trato gastrointestinal das aves pode-se transformar em um potencial fator de contaminação para a indústria de carnes, e principalmente, o ambiente onde eles vivem dentro das granjas podem contaminar o ambiente com cepas resistentes aos antimicrobianos. Em

larga escala isso passa a ser um problema muito grave para a humanidade, uma vez que a tendência é de as bactérias partilharem genes de resistência entre si, embora isso não tenha sido o foco do trabalho. Dessa forma, a prática indiscriminada de administração de antimicrobianos, na produção de frangos, pode atuar como um reservatório de bactérias resistentes, gerando um alerta no âmbito da Saúde Única, visto que

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BELUSSO, Diane; HESPANHOL, Antonio Nivaldo. A evolução da avicultura industrial brasileira e seus efeitos territoriais. *Percurso - NEMO*, Florianópolis, v. 2, n. 1, 2010.
- CLSI. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals- Third Edition. CLSI document VET01S. Wayne, PA, USA: CLSI; 2015.
- HEUER, H.; SCHMITT, H.; SMALLA, K. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Current Opinion in Microbiology*, v. 14, n. 3, p. 236–243, 1 jun. 2011.
- KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D. JANDA, W. M. Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido. 6ª ed. Rio de Janeiro, 2008.
- NANDI, S.; MAURER, J. J.; HOFACRE, C.; SUMMERS, A. O. Gram-positive bacteria are a major reservoir of class 1 antibiotic resistance integrons in poultry litter. *Proceedings of the National Academy of Science*, v. 101, p. 7118-7122, 2004.
- SILVA, Virginia Santiago. Métodos e segurança sanitária na reutilização de cama de aviários.. *Avicultura Sustentável: Práticas e Desafios*. EMBRAPA, Brasília, 2018. Capítulo 5, p. 75-92.
- ZEN, Sérgio De et al. Evolução da Avicultura no Brasil. *Informativo CEPEA*, São Paulo, v. 1, n. 1, ano 2014.

APOIO:

LABACVET

