



ARTIGO 251

RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADA DE AVES COMERCIAIS NOS ESTADOS DE SÃO PAULO E DE GOIÁS, BRASIL

Antimicrobial resistance of Escherichia coli strains isolated commercial poultry in the states of São Paulo and Goiás, Brazil

Ana Lúcia Sicchiroli Paschoal Cardoso¹, Ana Maria Iba Kanashiro¹, Greice F. Zanatta Stoppa¹, Antonio Guilherme M. de Castro¹, Renato Luis Luciano¹, Eliana N. Castiglioni Tessari¹

RESUMO: Na avicultura, o uso de antimicrobianos é uma medida preventiva utilizada para reduzir os danos causados por infecções por *Escherichia coli* e para reduzir a mortalidade associada à colibacilose aviária. O uso indiscriminado de antimicrobianos, as subdosagens e a adição de promotores de crescimento à dieta, que expõe os animais por longos períodos a pequenas concentrações de antibióticos, colaboraram para a seleção e manutenção de organismos resistentes. Este é um fato cada vez mais comum, com graves conseqüências à indústria avícola mundial e à saúde da população consumidora devido à possibilidade de transferência horizontal de genes de virulência entre microrganismos comensais e patogênicos. O objetivo do presente estudo foi avaliar o perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *E. coli* isoladas de aves comerciais com quadros de colibacilose, provenientes dos Estados de São Paulo e de Goiás e atendidas no Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio Avícola-Instituto Biológico, Descalvado, SP. Foram isoladas 45 cepas de *E. coli*, as quais foram submetidas a teste de suscetibilidade a 12 antibióticos utilizados na prática veterinária. Observou-se alta resistência na maioria das drogas testadas. Os índices de resistência das bactérias estão aumentando frente aos antimicrobianos testados neste estudo, assim, a prática da análise de perfil de sensibilidade sempre deve ser utilizada como uma importante ferramenta sempre que uma nova amostra for isolada, pois pode auxiliar no controle desta enfermidade, que pode variar conforme a região geográfica, as drogas disponíveis na região, bem como nos custos do tratamento. **Palavras-chave:** antimicrobianos, ave comercial, *Escherichia coli*, frango, teste de suscetibilidade.

ABSTRACT: In the poultry industry, antimicrobials are used like a measure to prevention of the damages arising *E. coli* infections besides reducing the mortality associated with avian colibacillosis. The indiscriminate using of antimicrobials, the low dosages and the adding of growth promoters to the poultry feeds, that expose the birds by long periods of time, have contributed to selecting and maintenance of resistant microorganisms. This is a frequently common fact, with serious consequences to the world poultry industry and to the health of consumers due the possibility of horizontal transfer virulence gene between pathogenic and commensal microorganisms. The aim of the present work was to evaluate the antimicrobial resistance profile of *E. coli* strains isolated from commercial poultry with colibacillosis in the states of São Paulo and Goiás, Brazil, that were attended by Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio Avícola - Instituto Biológico, Descalvado, SP. Forty-five strains of *E. coli* were analyzed and submitted to the antimicrobial susceptibility test to the 12 drugs commonly used in veterinary medicine. Data showed high levels of antimicrobial resistance in the most of the drugs tested. The bacterial resistance rate is increasing in relation to antimicrobials tested in this study, so the procedure of the analysis of the sensitivity profile must be used like a tool whenever a new sample is isolated, because it may aiding in the control measures of this disease, that can to vary according the geographic area, drugs availability in the region and the costs of treatment. **Key words:** antimicrobial, poultry, *Escherichia coli*, broiler, susceptibility test

¹Instituto Biológico, Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio Avícola (CAPTAA), Rua Bezerra Paes 2278, CEP 13690-000, Descalvado, SP, Brasil. E-mail: alspscardoso@biologico.sp.gov.br



INTRODUÇÃO

Atualmente, a avicultura de corte no Brasil é uma das atividades agropecuárias de maior desenvolvimento. A tecnologia empregada neste setor tem procurado otimizar a produção de alimentos mais seguros e saudáveis para o consumo humano. Os promotores de crescimento são os principais aditivos de uso na alimentação animal, em particular na dieta das aves, sendo responsáveis pela melhoria na produtividade animal.

A colibacilose é uma das principais doenças da avicultura industrial, devido aos grandes prejuízos econômicos causados no mundo inteiro e está normalmente relacionada com elevados índices de condenação de carcaças de aves nos abatedouros (Johnson et al., 2008). Nas aves, a infecção por *Escherichia coli* é considerada secundária a outros agentes, sendo responsável por diversas patologias como doença crônica respiratória, onfalite, salpingite, septicemia, peritonites, síndrome da cabeça inchada, enterites e celulite (Gross, 1994; Dziva & Stevens, 2008; Ferreira & Knöbl, 2009).

No setor avícola, um dos objetivos do uso de antibióticos seria a redução das perdas ocasionadas pela infecção por *E. 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 no homem e nos animais (Bremner, 1981; Allan et al., 1993; Blanco et al., 1997; Cohen, 2000).

A maioria das amostras de *E. coli* de origem aviária apresenta diferentes perfis de resistência múltipla as drogas

antimicrobianas. Ao mesmo tempo verifica-se que a sensibilidade antimicrobiana varia nas diferentes regiões podendo dificultar a escolha do antimicrobiano a ser utilizado, por isso recomenda-se a realização de antibiogramas (Brito, 2000).

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 nº193 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).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram enviadas ao Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio Avícola-Instituto Biológico, Descalvado, SP, aves comerciais (pintinhos, frangos de corte, reprodutoras de postura) com suspeita de colibacilose, provenientes dos Estados de São Paulo e Goiás no período de janeiro 2013 a março de 2014. As aves foram necropsiadas e colheu-se material dos órgãos (sacos aéreos, fígado, coração e ovidutos) com lesões macroscópicas sugestivas de colibacilose. Os suabes e fragmentos de órgãos foram inoculados em caldo BHI (Brain Heart Infusion) e incubados a 36°C ±1 por 24 hs. Após incubação, o material foi inoculado em placas contendo ágar sangue e ágar MacConkey e incubados a 36°C ±1 por 24hs. As colônias com características típicas de *E. coli* foram confirmadas através de série bioquímica. A metodologia bacteriológica



utilizada seguiu as recomendações descritas por Barnes et al. (2003).

A partir das cepas de *E. Coli* isoladas foram realizados os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos e a metodologia empregada neste teste seguiu o método de difusão em placa descrito pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2003). Foram testadas 12 drogas antimicrobianas utilizadas na prática veterinária: amoxicilina (10mcg), canamicina (30 mcg), cefalexina (30 mcg), ceftiofur (30 mcg), doxiciclina (30 mcg), enrofloxacina (5 mcg), estreptomina (10 mcg), fosfomicina (200 mcg), gentamicina (10 mcg), norfloxacina (10 mcg), sulfazotrim (25 mcg), tetraciclina (30 mcg).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isoladas 45 cepas de *E. coli*, as quais foram submetidas ao teste de suscetibilidade. Os resultados do presente estudo estão discriminados na Tabela 1.

Observou-se altas percentagens da resistência na maioria das drogas testadas: 95,6% (43) para estreptomina, 93,3% (42) para doxiciclina, 91,1% (41) para cefalexina, 84,4% (38) para canamicina e tetraciclina, 82,2% (37) para amoxicilina, 77,8% (35) para enrofloxacina, 66,7% (30) para sulfametoxazol/trimetopim, 57,8% (26) para norfloxacina, 55,6% (25) para ceftiofur, 48,9% (22) para gentamicina e 37,8% (17) para fosfomicina.

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 (Cardoso et al., 2002; Zanatta et al., 2004; Yang et al., 2004; Gonçalves et al., 2012). 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 et al., 2001).

Schroeder et al. (2002) detectaram duas amostras de *E. coli* isoladas de humanos resistentes a ceftiofur, droga de uso exclusivo em veterinária, e concluíram que pode ocorrer transferência de bactérias dos animais para humanos.

Sader (2004) salienta que a *E. coli* (O157:H7) é um dos patógenos transmitidos por alimentos que causam preocupação quanto a uma ligação entre animais e humanos.

No presente estudo foi observado cepas resistentes à tetraciclina e à sulfametoxazol/trimetopim. 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.

De acordo com Gonçalves & Andreatti Filho (2010), droga como a tetraciclina é muito utilizada por ser de baixo custo e fácil obtenção, o que explica também o número de amostras com resistência.

Cardoso et al. (2002) avaliaram a resistência de cepas de *E. coli* provenientes de frangos de corte e verificaram alta percentagem de resistência aos antimicrobianos, sendo o ácido oxolínico e a norfloxacina as drogas que apresentaram o maior índice de resistência (87,9 e 75,8%).

Zanatta et al. (2004) analisaram 120 amostras de *E. coli* de aves comerciais e encontraram grande número das amostras que apresentaram resistências aos antimicrobianos testados, sendo a tetraciclina o que apresentou a maior resistência (76%).



TABELA 1. Percentagem da resistência e sensibilidade das 45 cepas de *E. coli*, isoladas de aves comerciais (pintinhos, frangos de corte, reprodutoras de postura), aos 12 antimicrobianos testados.

Antimicrobianos	Sensível Nº (%)	Resistente Nº (%)
Amoxicilina	8 (17,8%)	37 (82,2%)
Canamicina	7 (15,6%)	38 (84,4%)
Cefalexina	4 (8,9%)	41 (91,1%)
Ceftiofur	20 (44,4%)	25 (55,6%)
Doxiciclina	3 (6,7%)	42 (93,3%)
Enrofloxacina	10 (22,2%)	35 (77,8%)
Estreptomicina	2 (4,4%)	43 (95,6%)
Fosfomicina	28 (62,2%)	17 (37,8%)
Gentamicina	23 (51,1%)	22 (48,9%)
Norfloxacina	19 (42,2%)	26 (57,8%)
Sulfametoxazol/trimetropim	15 (33,3%)	30 (66,7%)
Tetraciclina	7 (15,6%)	38 (84,4%)

Gonçalves & Andreatti Filho (2010) isolaram 27 amostras de *E. coli* oriundas de aves com suspeita de colibacilose e a sulfanamida (66,7%), tetraciclina (48%) e neomicina (40,7%) foram as drogas que apresentaram maior resistência. Os mesmos autores encontraram baixas taxas de resistência à amoxicilina e ceftiofur, e 100% de sensibilidade à norfloxacina e gentamicina, ao contrário do observado no presente estudo e por Blanco et al. (1997), Van Den Bogaard et al. (2001), Cardoso et al. (2002) e Zanatta et al. (2004), onde houve alto índice de resistência a estes dois últimos antibióticos.

Os pesquisadores citados acima encontraram alta percentagem de resistência à tetraciclina, resultados que se assemelham àqueles encontrados em estudos mais antigos (Verma, 1979; Sato et al., 1980; Kumar et al., 1981; Vidotto et al., 1984).

Blanco et al. (1997) evidenciaram altas taxas de resistência ao sulfazotrim (63%), também encontrado neste estudo. Estes pesquisadores também encontraram

baixas taxas de resistência a norfloxacina (17%), diferente de nossos resultados, onde este antimicrobiano apresentou taxa relativamente alta de resistência. A resistência da norfloxacina também foi evidenciada por Bazile-Pham-Khac et al. (1996).

Lambie et al. (2000) e Cardoso et al. (2002), verificaram uma forte tendência de resistência para amoxicilina e sulfazotrim e uma taxa significativa à norfloxacina, no que assemelhou-se a nossos resultados.

Barros et al. (2012) isolaram 35 amostras de *E. coli* de frangos de corte e de poedeira comercial do Estado de Pernambuco e os testes utilizados demonstraram que 94,28% dos isolados foram resistentes a três ou mais antibióticos, com a lincomicina apresentando o maior percentual de resistência (100%).

Pesquisadores avaliaram o perfil de resistência antimicrobiana de *E. coli* patogênicas isoladas de frangos de corte. Detectaram o gene *iss* em 12 amostras, as quais foram submetidas ao teste de



suscetibilidade e exibiram resistência a 14 dos 20 antimicrobianos testados. Todas as amostras foram sensíveis a amicacina e ao aztreonam e resistentes a ampicilina, clindamicina, eritromicina, penicilina, tetraciclina, vancomicina e teicoplanina (Gonçalves et al., 2012)

Conforme Rodrigues & Fonseca (2006), a utilização desordenada de antibióticos nas medicina humana e veterinária tem causado sérios problemas com implicações econômicas, dificultando a terapêutica, sendo atualmente um dos maiores problemas de saúde pública.

A resistência adquirida pela bactéria *E. coli* devido a utilização inadequada de antimicrobianos e de administração em doses sub-terapêuticas, apenas selecionam os agentes bacterianos mais resistentes, e não debelam a infecção (Ferreira & Knöbl, 2000).

No que se refere especificamente a *E. coli* comensal de animais, já é sabido que é resistente à maioria dos agentes antimicrobianos comumente utilizados, como as tetraciclínas, sulfametoxazole, ampicilina, estreptomicina e carbenicilina (Kang et al., 2005).

A resistência aos antimicrobianos nas cepas de *E. coli* testadas demonstra a real necessidade do seu uso correto, em criações de aves comerciais, 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 et al., 2001).

CONCLUSÃO

A maioria das amostras de *E. coli* encontradas foram resistentes a antimicrobianos de uso no tratamento de enfermidades em aves comerciais, representando um risco na seleção de cepas patogênicas para as aves e na resistência cruzada com patógenos entéricos dos seres humanos. Assim, monitorar a resistência de bactérias isoladas de aves a diferentes grupos de antibióticos torna-se um fator determinante para a eleição do tratamento, bem como eliminar, através do uso de antibióticos específicos. Este estudo demonstrou que a estreptomicina, a doxiciclina e a cefalexina são as drogas que apresentaram menor eficácia para o tratamento da colibacilose devido ao alto índice de resistência.

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.

BARNES, H.J.; VAILLANCOURT, J.P.; GROSS, W.B. Colibacillosis. In: SAIF, Y.M. (Ed.) **Diseases of Poultry**. 11ed. Iowa State Press, 2003. p.631-645.



BARROS, M.R.; SILVEIRA, W.D.; ARAÚJO, J.M. et al. Resistência antimicrobiana e perfil plasmidial de *Escherichia coli* isolada de frangos de corte e poedeiras comerciais no Estado de Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.5, 2012.

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

BAZILE-PHAM-KHAC, S.; TRUONG, Q.C.; LAFONT, J.P. et al. Resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* isolated from poultry. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.40, n.6, p.1504-1507, 1996.

BLANCO, J.E., BLANCO, M., MORA, A. et al. 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.2184-2185, 1997.

BRASIL. Portaria nº193 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 nº3 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.

BRITO, B.G. Fatores de virulência de *Escherichia coli* de origem aviária - APEC. II Simpósio de Sanidade Avícola 14 e 15 de setembro de 2000 - **Anais...** Santa Maria, RS. p.56-59. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/anais9000_brito.pdf> Em: 06 abril 2014.

CARDOSO, A.L.S.P.; TESSARI, E.N.C.; CASTRO, A.G.M. et al. Avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* de origem aviária. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.69, n.2, p.1-5, 2002.

COHEN, M.L. Changing patterns of infectious diseases. **Nature**, v.406, p.762-767, 2000.

DZIVA, F.; STEVENS, M.P. Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. **Avian Pathology**, v.37, n.4, p.355-366, 2008.

FERREIRA, A.J.P.; KNÖBL, T. Colibacilose aviária. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. (Eds.) **Doenças das Aves**. Campinas: FACTA, 2000. p.197-205.



FERREIRA, A.J.P.; KNÖBL T. 2009. Colibacilose aviária, In: BERCHIERI JUNIOR A.; SILVA, E.N.; DI FABIO, J. et al. (Eds.) **Doenças das Aves**. 2.ed. Facta: Campinas. 2009. p.457-471.

GONÇALVES, G.A.M.; ANDREATTI FILHO, R.L. Susceptibilidade antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de frango industrial (*Gallus Gallus Domesticus* Linnaeus, 1758) com colibacilose. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.4, p.715-718, 2010.

GOLÇALVES, P.M.R.; PEREIRA, V.L.A.; SILVA, R.C.F. et al. Perfil de resistência antimicrobiana de isolados de *Escherichia coli* positiva para gene *iss* em frangos de corte na idade de abate. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.8, n.15; p.1288-1294, 2012.

GROSS, W.G. Diseases due to *E. coli* in Poultry. In: GYLES, C.L. (Ed.) **Escherichia coli in domestic animals and humans**. CAB International: Oxon, 1994. p:237-59.

JOHNSON, T.J.; WANNEMUEHLER, Y.; DOETKOTT, C. et al. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, n.12, p.3987-3996, 2008.

KANG, H.Y.; JEONG, Y.S.; OH, J.Y. et al. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons found in *Escherichia coli* isolates from humans and animals in Korea. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.55, p.639-644, 2005.

KUMAR, A.; MISTRA, D.S.; SINGH, L.P. Drug resistant and R-factor-bearing *Escherichia coli* in poultry. **Indian Journal of Animal Sciences**, v.51, n.9, p.872-876, 1981.

LAMBIE, N.; NGELEKA, M.; BROWN, G. et al. Retrospective study on *Escherichia coli* infection in broilers sul postmortem examination and antibiotic resistance of isolates in Trinidad. **Avian Diseases**, v.44, n.1, p.155-160, 2000.

NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard-Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 (ISBN 1-56238-485-6). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

RODRIGUES, D.P.; FONSECA, E.L. Resistência antimicrobiana. Manual de procedimentos para a determinação da suscetibilidade antimicrobiana em Enterobactérias. Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ-Laboratório de referência Nacional de Cólera e outras Enteroinfecções Bacterianas LRNCB/LABENT. 2006.

SADER, H.S. O uso de antimicrobianos promotores de crescimento contribui para a resistência a antibióticos? In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 5., 2004, Santos, SP. **Anais...** Santos: 2004. v.2, p.211-217.



SATO, A.; TAGAWA, K.; YKE, Y. et al. Drug resistance of *Escherichia coli* strains isolated from chickens. **Japanese Journal of Medical Science & Biology**, n.33, v.3, p.185-188, 1980.

SCHROEDER, C.M.; MENG, J.; ZHAO, S. et al. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O26, O103, O0128, and O145 from animals and humans. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, n.12, p.1409-1414, 2002.

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

VERMA, N.D. A note on drug resistance of *E. coli* isolated from chicken source from Manipur state. **Indian Journal of Animal Sciences**, v.49, n.7, p.588-590, 1979.

VIDOTTO, M.C.; MULLER, E.E.; GUIMARÃES, I.G. Resistência a drogas em amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves em Londrina - PR. Semina: **Ciências Agrárias**, v.5, n.16, p.34-39, 1984.

ZANATTA, G.F.; KANASHIRO, A.M.I.; CARDOSO, A.L.S.P. et al. Suscetibilidade de amostras de *Escherichia coli* de origem aviária a antimicrobianos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.71, n.3, p.283-286, 2004.

YANG, H., CHEN, S., WHITE, D.G. et al. 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.