

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

USO DE ANTIMICROBIANOS EM RAÇÕES DE GALINHAS POEDEIRAS E  
RESISTÊNCIA DE Escherichia coli NA MICROBIOTA NORMAL DO INTESTINO,  
EM GRANJAS DE UBERLÂNDIA

ADRIANA NUNES MIRANDA

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de  
Ciências Biológicas da Universidade Federal de  
Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em  
Ciências Biológicas

UBERLÂNDIA - MG  
1995

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

USO DE ANTIMICROBIANOS EM RAÇÕES DE GALINHAS POEDEIRAS  
E RESISTÊNCIA DE Escherichia coli NA MICROBIOTA NORMAL DO INTESTINO,  
EM GRANJAS DE UBERLÂNDIA

ADRIANA NUNES MIRANDA

ORIENTADOR: PROF. PAULO PINTO GONTIJO FILHO

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de  
Ciências Biológicas da Universidade Federal de  
Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em  
Ciências Biológicas

UBERLÂNDIA - MG  
1995

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

USO DE ANTIMICROBIANOS EM RAÇÕES DE GALINHAS POEDEIRAS  
E RESISTÊNCIA DE Escherichia coli NA MICROBIOTA NORMAL DO INTESTINO,  
EM GRANJAS DE UBERLÂNDIA

ADRIANA NUNES MIRANDA

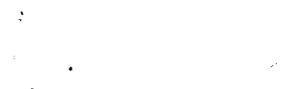
APROVADA PELA COMISSÃO EM 5 / 11 / 2016. CONCEITO: 7



Prof. Dr. Paulo Pinto Gontijo Filho  
Orientador



Profª. Angela Abdalla H. Beicher  
1º Conselheiro



Prof. Daniel Resende Carvalho  
2º Conselheiro



Profª. MS. Nora-Ney Santos Barcelo  
Coordenadora do Curso

Uberlândia, 22 de dezembro de 1996.

# AGRADECIMENTOS

A Deus, por existir e poder vencer todas as dificuldades decorrentes da vida. Muitas vezes, pensei em desistir, mas o senhor estava sempre ao meu lado e me ajudou para que este grande momento se realizasse . A emoção é imensurável.

À minha mãe, que com seu grande amor, sacrifício e compreensão, me ajudou para que este trabalho fosse realizado, sentindo assim grande orgulho de sua filha.

A meu noivo, que nos momentos de insegurança, me deu apoio.

Ao meu orientador, Dr. Paulo Pinto Gontijo Filho, pela paciência que teve no desenvolvimento do trabalho e pela oportunidade de trabalhar com uma pessoa tão capacitada em suas funções de mestre, orientador, doutor e um pouco de pai para conosco, que tanto o solicitamos.

A todos os professores da disciplina de Microbiologia: Geraldo, Vivian, Fábio, Lindalva e em especial à professora Angela Maria Abdalla H. Beicher, pelos préstimos

oferecidos no decorrer do trabalho e pela honrosa participação na defesa da monografia.

Ao professor de Nutrição Animal, Daniel Resende Carvalho, pelo seu interesse em poder me ajudar e pela sua participação na defesa da monografia.

Aos funcionários, técnico-administrativos da coordenação e do laboratório de microbiologia, em especial Claudete e Ricardo, pelas suas imprescindíveis cooperações durante o decorrer do trabalho.

Aos colegas do curso Cláudia Maria, Geraldo, Marize, Fernando, Cybele, Cristina, Petyana pela amizade, companheirismo e solidariedade no decorrer do curso e sobretudo, nos momentos de distração.

Aos funcionários Marcelo, Hilda, Darc e ao professor Paulo Lourenço da Rezende Alimentos, que abriram espaço, contribuindo assim, para a obtenção de dados essenciais para este trabalho.

## RESUMO

O impacto do uso de antimicrobianos em rações animais foi investigado em galinhas poedeiras quanto à seleção de E. coli resistentes. Foram utilizadas aves de quatro granjas, duas fazendo uso de promotores de crescimento do grupo dos quinoxalínicos (Granjas A e B), uma de um antibiótico do grupo dos polipeptídeos (Granja C) e a última (Granja D) que não faz uso dos mesmos. Isolados de E. coli da microbiota normal das fezes foram testados "in vitro" quanto à susceptibilidade aos antimicrobianos, pela técnica de difusão em gel.

Independente da origem, a maioria das cepas foi resistente aos Betalactâmicos (91,18% à ampicilina e 85,29% à cefalotina) e susceptíveis ao cloranfenicol (94,12%) e gentamicina (91,18%). Verificou-se um predomínio de cepas multirresistentes de E. coli.

Os espectros de resistência de E. coli provenientes das granjas A, B e D foram semelhantes e divergentes do observado para os isolados da granja C. Com uma resistência mais elevada ao ácido nalidíxico (18/25 versus 2/9) e susceptibilidade ao sulfametoxazol + trimetoprim.

O uso de antimicrobianos nas práticas médica e veterinária, bem como propósitos não clínicos, tais como o ganho ponderal de animais, vem selecionando microrganismos resistentes/genes de resistência e contribuindo para uma incidência crescente de patógenos multirresistentes e que, particularmente em países como o Brasil, o seu controle é precário.

## Índice:

1 -	<i>INTRODUÇÃO</i> .....	1
2 -	<i>OBJETIVO</i> .....	4
3 -	<i>MATERIAIS E MÉTODOS</i> .....	5
3.1 -	Aves .....	5
3.2 -	Coleta de fezes .....	5
3.3 -	Coleta e identificação de <u>E. coli</u> ....	6
3.4 -	Estocagem .....	6
3.5 -	Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos .....	7
4 -	<i>RESULTADOS E DISCUSSÃO</i> .....	8
5 -	<i>CONCLUSÕES</i> .....	17
6 -	<i>REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA</i> .....	19

# 1 - Introdução

Os agentes antimicrobianos são muito utilizados em veterinária, a exemplo do que acontece em medicina humana, para tratar doenças infecciosas em animais e com finalidade profilática para prevenir infecções e/ou promover o crescimento de animais através do uso de doses subterapêuticas. Este último procedimento pode favorecer o aparecimento de resistência aos antimicrobianos em patógenos responsáveis por doenças tanto em animais quanto em humanos (HOEMBERG, 1984; SPIKA, 1987).

Estudos epidemiológicos demonstram a influência do emprego de antimicrobianos na emergência, persistência e na transmissão de bactérias resistentes. Embora o uso destes medicamentos correlacione com a frequência de bactérias resistentes, não está claro, se todos os grupos de antimicrobianos representam riscos semelhantes. A sua utilização por tempo prolongado pode acarretar uma maior prevalência de resistência do que o uso terapêutico ou profilático de curta duração (COHEN, 1992).

A resistência aos antimicrobianos tem reflexos na morbidade, mortalidade e nos custos associados à erradicação da

doença. Os aumentos na morbidade e mortalidade decorrem do atraso no início, de uma terapêutica não empírica e efetiva. Isto é particularmente verdadeiro no Brasil, onde a frequência de microrganismos resistentes é muito alta e há um predomínio de terapêutica empírica. Esta situação tende a continuar no nosso país, porque os antimicrobianos, particularmente os mais recentes, são de custos muito altos, portanto, sendo inacessíveis ao consumo pela população (COHEN, 1992).

As condições de higiene e de saneamento básico são precárias em países subdesenvolvidos, aumentando a chance de transmissão de bactérias resistentes. Entre as medidas efetivas para a sua redução, incluem-se: práticas de controle de infecção hospitalar, melhoria das condições de higiene e saneamento na comunidade e ainda, na adoção de medidas de prevenção e controle em medicina veterinária (CLAUDE, 1994).

As taxas de infecções hospitalares são bastante elevadas na América Latina e muitas destas infecções são por microrganismos multirresistentes, responsáveis principalmente por infecções urinárias, pós cirúrgicas, pneumonias, bacteremias e diarreias (CLAUDE, 1994).

Muitos dos fatores de risco que favorecem o aumento de resistência bacteriana estão presentes no Brasil e na maioria dos países da América Latina, com destaque para: livre comercialização de antimicrobianos, automedicação, uso irrestrito de novos medicamentos, elevadas taxas de infecções

hospitalares e comunitárias e existência de microrganismos gram negativos e gram positivos multirresistentes (CLAUDE, 1994).

No Brasil, informações a respeito do emprego de antimicrobianos na criação de animais para abate são escassas. Entretanto, sabe-se que a quantidade de antimicrobianos usados como suplementos em rações, varia de país para país (YOUNG, 1994).

Os tipos de antimicrobianos aprovados para utilizações terapêutica e profilática em medicina veterinária estão regulamentados através de critérios definidos em alguns países, como os do Reino Unido e Estados Unidos (YOUNG, 1994).

As mudanças freqüentes das rações para animais, podem refletir resistência em específicos patógenos, resistência esta que se dá ao uso de antimicrobianos e é sugerido que o uso reduzido destes possa vir a diminuir a resistência antimicrobiana (COHEN, 1986).

## 2 - Objetivo

O impacto do uso de antimicrobianos em rações animais, foi investigado em galinhas poedeiras quanto à seleção de amostras de E. coli isoladas de fezes, resistentes aos antimicrobianos presentes na ração.

## 3 - Materiais e Métodos

### 3.1 - Aves

Foram utilizadas galinhas poedeiras de quatro granjas (Tabela 1), localizadas na cidade de Uberlândia. A Granja D não faz uso de promotores de crescimento, criando galinhas ditas "caipiras". A Granja C apresenta condições de sanidade compatíveis com as de países desenvolvidos, sendo dotada de laboratório para monitoramento microbiológico rotineiro.

### 3.2 - Coleta de fezes

Foram coletadas 3 (três) amostras de fezes/granja, de aproximadamente 2,0 gramas cada uma, em pontos representativos de um dos galpões, com auxílio de espátula. Estas foram transferidas para o laboratório em tempo não superior a 2 (duas) horas e mantidas em refrigerador (4° C), sendo processadas em tempo máximo de 24 (vinte e quatro) horas.

### 3.3 - Coleta e identificação de E. coli

Foi preparada uma suspensão a 1% (um por cento) em água destilada esterilizada, a partir de cada uma das amostras, seguindo-se diluições decimais em água destilada. Volumes 0,1 ml das diluições  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$  foram inoculados na superfície de placas contendo ágar MacConkey. As culturas foram incubadas a 37° C, por 24 (vinte e quatro) horas, quando as colônias suspeitas de E. coli foram quantificadas.

A identificação dos isolados de E. coli foi realizada através do cultivo em ágar tríplice açúcar e ágar citrato.

### 3.4 - Estocagem

Um máximo de três isolados de E. coli, correspondentes a cada uma das amostras de fezes, foram repicados para ágar estoque e mantidos em congelador (-20° C). Por ocasião da avaliação da atividade "in vitro" dos antimicrobianos, procedeu-se a dois subcultivos seguidos em caldo tripticase soja, sendo a última suspensão padronizada segundo a escala de 0,5 McFarland.

### 3.5 - Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

O antibiograma foi realizado de acordo com a técnica de difusão em gel (Kirby e Bauer), conforme a metodologia do "National Comitee for Clinical Laboratory Standard" (1990), utilizando-se os seguintes discos de antimicrobianos: ampicilina, cefalotina, sulfametoxazol + trimetoprim, cloranfenicol, tetraciclina, gentamicina e ácido nalidíxico.

## 4 - Resultados e Discussão

Entre as quatro granjas incluídas nesta investigação, apenas uma (Granja D) não faz uso de promotor de crescimento. Como referido na Tabela 1, esta cria galinhas ditas "caipiras", inexistindo galpão para criação das mesmas, ao contrário das demais. A existência de um laboratório de controle microbiológico só foi observada na Granja C, única cuja produção é exportada.

Tabela 1

Relação das Granjas, utilização de promotores de crescimento e suas condições sanitárias

Granja	Promotores de Crescimento / antimicrobianos na ração	Controle Sanitário
A	Presente	Ausente
B	Presente	Presente
C	Presente	Presente
D	Ausente	Ausente

As Granjas A e B utilizam como promotor de crescimento, o produto de nome Olaquinox (Supre Mais Química Ltda., Mogi Guaçu, SP), que contém antimicrobiano de amplo espectro, do grupo dos quinoxalínicos. Na Granja C, o promotor de crescimento empregado é o Enradin (Resende Alimentos, Uberlândia, MG), cujo princípio ativo é a Enramicina, antibiótico de pequeno espectro (ativo contra bactérias gram positivas), do grupo dos polipeptídeos (JOKLIK et al., 1992).

Os promotores de crescimento são recomendados no caso de criação de poedeiras, nas primeiras semanas de criação e durante o período de maturação de ovário. Nesta investigação, as coletas de fezes foram realizadas em vigência da sua utilização.

Foram observadas diferenças significativas (3 log) entre as contagens de viáveis de E. coli nas quatro granjas. As granjas B ( $\bar{X} = 3,4 \times 10^4$ ) e C ( $\bar{X} = 3,6 \times 10^6$ ) apresentavam, respectivamente, o menor e maior número, como evidenciado na Tabela 2.

Tabela 2

Contagens de viáveis de E. coli nas fezes de galinhas colhidas em granjas de Uberlândia

Granja	Amostra	Contagem de <u>E. coli</u> (ufc/mL)*
A	1	$9,2 \times 10^5$
	2	$1,5 \times 10^5$
	3	$2,3 \times 10^5$
B	1	$3,0 \times 10^4$
	2	$4,8 \times 10^4$
	3	$2,3 \times 10^4$
C	1	$2,5 \times 10^6$
	2	$3,8 \times 10^5$
	3	$4,6 \times 10^6$
D	1	$2,0 \times 10^5$
	2	$6,0 \times 10^4$
	3	$4,0 \times 10^3$

\* unidades formadoras de colônia/mililitro

O problema representado pela resistência bacteriana em microrganismos responsáveis por infecções hospitalares e comunitárias atingiu proporções preocupantes, a ponto de ser considerada uma questão de saúde pública pela Organização Mundial de Saúde e organizações médicas americanas e européias (BURGERT, 1994). Como foi referido na introdução, a resistência de patógenos resulta em mais morbidade, mortalidade e custos

mais elevados (COHEN, 1992). Estudos epidemiológicos têm demonstrado que entre os fatores de risco para emergência, persistência e transmissão de bactérias resistentes, estão: frequência do uso de antimicrobianos, globalização observada no comércio, facilitação de viagens internacionais, condições de pouca sanidade e higiene, usualmente existentes em países subdesenvolvidos, venda permissiva de antibióticos em farmácias, desenvolvimento de agentes microbianos de espectro cada vez mais abrangente, mudanças de comportamento, tais como em relação a sexo e o uso de drogas injetáveis (COHEN, 1992).

O impacto potencial do uso de antibióticos em animais sobre a saúde humana e no tratamento de doenças infecciosas vem sendo motivo de preocupação crescente (YOUNG, 1994). DUPONT e STEELE (1987) relataram que cerca da metade dos antibióticos usados nos Estados Unidos foi como suplemento de ração para animal, estimando que 80% das aves, 75% dos suínos, 60% do gado de corte e 75% dos bezerros foram alimentados com antimicrobiano durante sua existência.

Os resultados obtidos (Tabela 3) evidenciam a importância do exposto acima. Independente da granja, a maioria das cepas de E. coli apresentou resistência aos betalactâmicos (91,18% para ampicilina e 85,29% para cefalotina) e cerca de um terço à tetraciclina. Considerando em conjunto, os resultados interpretados como resistente e intermediário ao ácido nalidíxico, a resistência de E. coli a este quimioterápico foi

de 67,65%. Portanto, verificou-se uma predominância de cepas multirresistentes de E. coli ou seja, com resistência a pelo menos dois grupos distintos de antimicrobianos. Na Tabela 3 verifica-se também que antimicrobianos de uso predominante em pacientes hospitalizados, como é o caso da gentamicina (91,18%) e cloranfenicol (94,12%), são ativos contra os isolados de E. coli.

Tabela 3

Resistência aos antimicrobianos de cepas de E. coli isoladas de fezes de galinhas colhidas em granjas de Uberlândia

Granja	Ampicilina			Gentamicina			Cefalotina			Tetraciclina			Sulfametoxazol + Trimetoprim			Ácido Nalidíxico			Cloranfenicol		
	R	MS	S	R	I	S	R	MS	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S
A (n=8)	8	-	-	1	-	7	8	-	-	3	1	4	1	-	7	3	3	2	-	1	7
B (n=8)	8	-	-	-	-	8	7	1	-	4	1	3	-	-	8	1	3	4	-	-	8
C (n=9)	6	1	2	1	-	8	6	1	-	3	-	6	8	-	-	1	1	7	-	1	8
D (n=9)	9	-	-	-	1	8	8	-	-	1	4	2	-	-	9	2	6	1	-	-	9
Total (n=34)	31	1	2	2	1	31	29	2	-	11	6	15	9	-	24	7	13	10	-	2	32
Σ	91,18	2,94	5,38	5,38	2,94	91,18	85,29	5,38	-	32,35	23,53	44,12	29,41	-	70,59	32,35	58,24	29,41	-	5,38	94,12

A legislação sobre o emprego de antimicrobianos com a finalidade de ganho ponderal nos Estados Unidos é menos rigorosa do que a de países europeus, incluindo uma lista maior de produtos licenciados para serem adicionados às rações. Enquanto apenas dez antimicrobianos são aprovados com este propósito no Reino Unido, nos Estados Unidos esta lista inclui 22 antimicrobianos (YOUNG, 1994).

No Brasil, não foi possível verificar se existe legislação específica em vigor. Como foi evidenciado na Tabela 1, três das quatro granjas fazem uso de promotores de crescimento, sendo que em duas, o antimicrobiano utilizado é um quinoxalínico, enquanto na terceira (Granja C), é um polipeptídeo. Esta diferença justifica, em parte, os achados distintos entre as granjas A, B e C ou seja, uma maior proporção de cepas de E. coli (10/16) resistentes ao ácido nalidíxico nas duas primeiras e de susceptíveis (2/9), na última. A outra diferença observada em relação aos isolados desta granja foi uma maior resistência de E. coli ao sulfametoxazol + trimetoprim quando comparada às demais, não pode ser justificada pelo promotor de crescimento acrescentado à ração.

Os resultados da Granja D foram semelhantes aos das granjas A e B, apesar da inexistência de antimicrobianos na primeira (Tabelas 1 e 3). Como foi referido anteriormente, a falta de saneamento básico e de higiene são fatores importantes no agravamento do problema representado pela resistência

bacteriana, por favorecerem a transmissão destes microrganismos nos diferentes ambientes (COHEN, 1992).

As bactérias tornam-se resistentes aos antimicrobianos como resultado de uma mutação cromossomial ou pela transferência de material genético através de mecanismos de transformação, transdução ou conjugação por plasmídeos. A conjugação com a transferência de plasmídeos é particularmente comum entre Enterobacteriaceae, Pseudomonas e microrganismos anaeróbicos. Adicionalmente aos plasmídeos conjugativos, as bactérias também possuem transposons, os chamados genes saltitantes, que têm a capacidade de se integrar ao DNA plasmideal ou cromossomial. A resistência pode ser transferida horizontalmente por plasmídeos ou por transposons conjugativos, localizados em cromossomas, disseminando a resistência a outros microrganismos de espécies, gêneros e famílias distintas (NEU, 1992). A ocorrência de multirresistência aos antimicrobianos, como observado nos isolados de E. coli de galinhas de granjas de Uberlândia, sugere a presença de plasmídeos R (de resistência) nos mesmos.

O aumento dramático na resistência microbiana tem complicado a capacidade dos médicos de tratar efetivamente doenças graves. Recomenda-se o uso mais prudente de antimicrobianos no homem, como uma forma de reduzir a pressão que estes medicamentos exercem nos diferentes ambientes pois, estes favorecem o desenvolvimento de resistência. Também é

importante uma reversão no emprego de antibióticos em rações animais, num esforço para definir as drogas e os usos que são apropriados em populações animais (COHEN, 1992).

## 5 - Conclusões

Entre as conclusões deste estudo, destacam-se as seguintes:

- 1 - A maioria (mais de 85%) das cepas foi resistente aos Betalactâmicos e mais de 50% comportou-se como multirresistentes aos antimicrobianos.
- 2 - Verificaram-se diferenças no espectro de resistência das cepas de E. coli entre as granjas que fazem uso de promotores de crescimento. A resistência ao ácido nalidíxico foi mais freqüente nas granjas (A e B), que fazem uso de um antimicrobiano do mesmo grupo químico como promotor de crescimento, enquanto que, em relação ao sulfametoxazol + trimetoprim, verificou-se uma relação inversa com as cepas de E. coli da granja C resistente, sem relação com o antibiótico utilizado.
- 3 - O espectro de resistência de E. coli da granja D, que não faz uso de promotor de crescimento,

foi semelhante aos das granjas A e B, sugestivo da grande difusão da resistência aos Betalactâmicos e da disseminação dos microrganismos/plasmídeos, decorrente das condições sanitárias precárias verificadas nesta granja.

- 4 - A contagem de viáveis de E. coli nas fezes foi mais significativa na granja C.

## 6 - Referência Bibliográfica

- BURGERT, S. J. e BURKE, J. P. Antibiotic resistance: Will infection control meet th challene? American journal of Infection Control, 22 : 193-194, 1994.
- CLAUDE, M. E. P. Entrevista Jornal Informativo da Sociedade Brasileira de Infectologia, 2 : 8. 1994.
- COHEN, M. L. e TAUXE, R. V. Drug Reistance **Salmonella** in the United States: An Epidemiologic Perspective. Science, 234 : 964-969, 1986.
- COHEN, M. L. Epidemiology of Drug Resistance : Implications for a Post-Antimicrobial Era. Science, 257 : 1052-1055, 1992.
- HOLMBERG, S. D.; WEELS, J. G. & COHEN, M.L. Animal-to-man transmission of antimicrobial-resistant **Salmonella**: investigations os U.S out-breaks. Science, 225 : 833-835, 1984.
- JOKLIK, W. K.; WILLETT, H. P.; AMOS, D.B.; WILFERT, C. M. (EDS) Zinsser Microbiology. 20th. ed. Appleton Rl Laange. London, 1992.

- KRITICHEVSKY, S. B. & SIMMONS, B. P. Toward Better Antibiotic Use In Hospitals. Infection Control and Hospital Epidemiology, 15: 688-690, 1994.
- KUNIN, C. M. Problems of Antibiotic Usage. Annals of Internal Medicine, 2 : 802-805, 1978.
- NEU, H. C. The Crisis in Antibiotic Resistance. Science, 257 : 1064-1072, 1992.
- WILLIAMS, R. D.; ROLLINS, L. D.; PROCURALL, D. W.; SELWYN, M. & MERCER, H.D. Antimicrobial Agents CHEMOTHERAPY. 14 : 710, 1978.
- YOUNG, H.K. Do Non Clinical Uses of antibiotics make a difference? Infection control and Hospital Epidemiology, 15 484-487, 1994.