

RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS DE IOGURTES BRASILEIROS¹

Lais Gonçalves Botelho², Adriano França da Cunha³, Rayssa Gomes Alves⁴, Eduardo Nogueira Fernandes², Natália Parma Augusto de Castilho²; Viviane Gomes Lelis⁵

Resumo: *A verificação da suscetibilidade de bactérias ácido láticas a antimicrobianos tem como finalidade prevenir a utilização de micro-organismo com tal resistência em diversos biosistemas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a resistência de bactérias ácido láticas isoladas de quatro marcas diferentes de iogurtes brasileiros e comercializados em Viçosa (MG), frente a antimicrobianos. A avaliação do perfil de resistência in vitro a antimicrobianos foi realizada de acordo com técnica adaptada de suscetibilidade a antimicrobianos, utilizando gentamicina, eritromicina, clindamicina, ciprofloxacina, ceftazidima, estreptomicina, penicilina, oxacilina, vancomicina e tetraciclina. Todas as bactérias ácido láticas isoladas apresentaram resistência antimicrobiana frente a no mínimo um antimicrobiano testado, sendo todas sensíveis à clindamicina, eritromicina, tetraciclina, ceftazidima e penicilina. Todas foram resistentes à vancomicina e ciprofloxacina. Indústrias produtoras de iogurtes devem se preocupar em selecionar bactérias ácido láticas que não possuam resistência antimicrobiana.*

Palavras-chave: Fermentação, leite, probiótico, sensibilidade

Abstract: *Verification of the susceptibility of lactic acid bacteria to antimicrobial*

1Parte do Trabalho de Conclusão de Curso do primeiro autor;

2Graduanda em Medicina Veterinária – FACISA/UNIVIÇOSA. e-mail: laisgbb@yahoo.com.br; eduardo_soad@hotmail.com;

3Professor em Medicina Veterinária – FACISA/UNIVIÇOSA. e-mail: adrianofcunha@hotmail.com.br

4Graduanda em Engenharia Química – FACISA/UNIVIÇOSA. e-mail: rays-salves@hotmail.com;

5Médica Veterinária – FACISA/UNIVIÇOSA. e-mail: nataliaparma@hotmail.com

6Professora em Nutrição – FACISA/UNIVIÇOSA. e-mail: vivianegomeslelis@gmail.com

agents is intended to prevent the use of micro-organism to such resistance in various biosystems. Therefore, the aim of this study was to evaluate the resistance of lactic acid bacteria isolated from four different brands of Brazilian yogurts sold in Viçosa (MG), front to antimicrobials. The evaluation of the in vitro profile of resistance to antimicrobial agents was performed in accordance with technique adapted antimicrobial susceptibility using gentamicin, erythromycin, clindamycin, ciprofloxacin, ceftazidime, streptomycin, penicillin, oxacillin, vancomycin, and tetracycline. All bacteria lactic acid bacteria isolated of yogurt showed antimicrobial resistance against at least one antimicrobial agent tested. All bacteria were sensitive to clindamycin, erythromycin, tetracycline, penicillin and ceftazidime. All were resistant to vancomycin and ciprofloxacin. Industries producing yogurt should be worry about selecting lactic acid bacteria that do not have antimicrobial resistance.

Keywords: *Fermentation, milk, probiotic, sensibility*

Introdução

Dentre os inúmeros derivados lácteos comercializados, o iogurte é um dos produtos fermentados com maior popularidade e importância econômica. O produto é elaborado a partir de leite enriquecido com alto teor de sólidos, usando uma cultura mista de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* e *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*. Tais bactérias ácido lácticas exercem efeitos favoráveis aos consumidores, inibindo bactérias patogênicas e equilibrando a microbiota intestinal (CUNHA et al., 2013).

Muitas bactérias ácido lácticas podem ser consideradas probióticas. De acordo com Food and Agriculture Organization/World Health Organization, micro-organismos probióticos são aqueles que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro, dentre eles, não possuir resistência antimicrobiana (FAO/WHO, 2002).

A verificação da suscetibilidade de bactérias ácido lácticas a

antimicrobianos tem como finalidade prevenir a utilização de micro-organismos com tal resistência em diversos biossistemas, e assim, diminuir a probabilidade de disseminação dessa resistência para outros micro-organismos patogênicos e desejáveis presentes na microbiota do trato gastrointestinal do hospedeiro (COPPOLA et al., 2005).

O mecanismo de resistência a antimicrobianos é fundamentado em estratégias como inativação da droga, prevenção de que a droga alcance seu alvo, redução da suscetibilidade ao alvo ou aquisição de novos mecanismos de resistência. A resistência pode ocorrer por mutações e por aquisição de fatores determinantes de resistência, que pode ser transferida entre bactérias de uma mesma ou diferentes espécies ou gêneros, podendo ser intrínseca ou adquirida por pressão seletiva, em função do aumento das concentrações dos antimicrobianos (MATHUR & SINGH, 2005). Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a resistência de bactérias ácido láticas isoladas de iogurtes brasileiros e comercializados em Viçosa (MG), frente a antimicrobianos.

Material e Métodos

Para realização do experimento, foram coletados lotes de marcas diferentes de iogurtes parcialmente desnatados (A, B, C e D), dentro do prazo de validade, em estabelecimentos comerciais da cidade de Viçosa (MG). Tais amostras foram transportadas em caixa de isopor com gelo até o Laboratório de Microbiologia da UNIVIÇOSA (MG), onde foram utilizadas para isolamento e identificação morfotintorial de bactérias ácido láticas.

A avaliação do perfil de resistência *in vitro* a antimicrobianos foi realizada, em duplicata, de acordo com técnica adaptada de suscetibilidade a antimicrobianos, utilizando antibiograma para cada bactéria ácido láctica isolada dos iogurtes. A técnica se baseou na utilização de discos contendo antimicrobianos que se difundiram pelo meio de cultura, como descrito por Charteris et al. (1998).

Após duas ativações a 37°C por 24 horas e sob aerobiose, os micro-

organismos foram cultivados em ágar MRS (Difco), sob aerobiose, a 37°C, durante 24 a 48 horas. Em seguida, partes das colônias foram transferidas, com auxílio de uma alça de níquel-cromo, para tubos contendo 3,5 mL de salina peptonada 0,85% (p/v), para se obter concentração correspondente a 1,0 na escala Mc Farland.

Em seguida, inóculos foram realizados utilizando-se swabs, sobre a superfície de placas (14 cm de diâmetro) contendo ágar MRS (Difco). Sobre as placas contendo os inóculos foram distribuídos discos (Oxoid, Basingstoke, England) contendo os seguintes antimicrobianos, com suas respectivas concentrações: gentamicina (10 µg), eritromicina (15 µg), clindamicina (2 µg), ciprofloxacina (5 µg), ceftazidima (30 µg), estreptomicina (10 µg), penicilina (10 UI), oxacilina (1 µg), vancomicina (30 µg), e tetraciclina (30 µg).

Após a incubação, as leituras dos diâmetros dos halos de inibição foram feitas com auxílio do paquímetro digital (Mitutoyo Digimatic Caliper, Mitutoyo Sul Americana Ltda). O controle de qualidade dos discos contendo os antimicrobianos foi realizado utilizando-se amostra de *Escherichia coli* ATCC 25922. O perfil de suscetibilidade a antimicrobianos foi avaliado qualitativamente de acordo com Charteris et al. (1998). A pesquisa foi aprovada pelo Núcleo de Pesquisa e Extensão (NUPEX) da Faculdade União do Ensino Superior de Viçosa (UNIVIÇOSA) sob número de protocolo 038/2014-I.

Resultados e Discussão

Todas as bactérias ácido lácticas isoladas apresentaram resistência antimicrobiana frente a no mínimo um antimicrobiano, sendo todas sensíveis à clindamicina, eritromicina, tetraciclina, ceftazidima e penicilina (Tabela 1). Todas foram resistentes à vancomicina e ciprofloxacina. As bactérias ácido lácticas isoladas do produto D ainda apresentaram resistência à oxacilina, dos produtos B, C e D à estreptomicina e dos produtos C e D à gentamicina.

Tabela 1. Perfil de sensibilidade (média dos diâmetros dos halos de

inibição em milímetros) à antimicrobianos de bactérias ácido lácticas isoladas de iogurtes brasileiros comercializados em Viçosa (MG)

Antimicrobiano	A		B		C		D	
	Ø (mm)	Sen.	Ø (mm)	Sen.	Ø (mm)	Sen.	Ø (mm)	Sen.
Ceftazidima	31,6	S	40,6	S	30,6	S	22,4	S
Clindamicina	43,4	S	50,6	S	44,9	S	36,6	S
Oxacilina	22,6	MS	30,6	S	20,1	MS	16,4	R
Eritromicina	32,1	S	43,6	S	32,6	S	24,6	S
Vancomicina	5,4	R	5,6	R	4,6	R	1,4	R
Tetraciclina	32,9	S	41,4	S	27,4	S	20,6	S
Penicilina	43,4	S	48,6	S	40,4	S	33,6	S
Ciprofloxacina	4,6	R	4,1	R	2,6	R	2,6	R
Estreptomicina	13,6	MS	7,6	R	3,4	R	3,6	R
Gentamicina	17,9	S	19,9	S	11,1	R	10,6	R

Legenda: Ø = Diâmetro; R = resistente; MS = moderadamente sensível; S = sensível

Alguns estudos relataram grandes variações de suscetibilidade em relação à sensibilidade de bactérias ácido lácticas a antimicrobianos (CHARTERIS et al., 1998; COPPOLA et al., 2005; CUNHA et al., 2013). Os autores relataram resistência a múltiplas drogas, o que também foi observado no presente estudo.

A resistência à vancomicina em 100% das amostras de bactérias ácido lácticas isoladas foi também observada em outros trabalhos, o que confirma que bactérias ácido lácticas podem ter resistência intrínseca à vancomicina (CEBECI & GURAKAM, 2003; COPPOLA et al., 2005). Humel et al. (2007) indicaram que bactérias ácido lácticas podem possuir resistência intrínseca à estreptomicina, gentamina e ciprofloxacina. O presente estudo reforça que tais bactérias realmente podem possuir resistência intrínseca à ciprofloxacina. Cunha et al. (2013) também sugeriram resistência intrínseca à ciprofloxacina e

vancomicina, além de ceftazidima e oxacilina.

Todas bactérias ácido lácticas isoladas foram sensíveis à ceftazidima. Entretanto, Cebeci e Gurakam (2003) observaram que 64% de bactérias ácido lácticas foram resistentes à tal antimicrobiano. Porém, Cunha et al. (2013) relatam que o potencial de bactérias probióticas deve ser selecionado não só com base na resistência fenotípica, mas também na ausência de genes de resistência, evitando a sua transferência a outras bactérias.

Os resultados demonstram o potencial de bactérias ácido lácticas em adquirir resistência aos antimicrobianos, o que é motivo de preocupação, uma vez que os genes para resistência antimicrobiana podem ser transferidos por conjugação, entre outros mecanismos, para bactérias patogênicas. Por isso, é importante que indústrias leiteiras selecionem fermentos lácticos livres de genes de resistência a fim de garantir a segurança alimentar e manter tal propriedade probiótica.

Conclusões

As bactérias ácido lácticas de iogurtes brasileiros são sensíveis à clindamicina, eritromicina, tetraciclina, ceftazidima e penicilina, mas possuem resistência à vancomicina e ciprofloxacina. Indústrias produtoras de iogurtes devem ser preocupar em selecionar bactérias ácido lácticas que não possuam resistência antimicrobiana.

Referências Bibliográficas

CEBECI, A.; GURAKAN, C. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Microbiology*, v.20, p.511-518, 2003.

CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, K. Antibiotic susceptibility of potential probiotic *Lactobacillus* species. *Journal of Food Protection*, v.61, p.1636-1643, 1998.

COPPOLA, R.; SUCCI, M.; TREMONTE, P.; REALE, A. Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *Lait*, v.85, p.193-204, 2005.

CUNHA, A.F.; ACURCIO, L.B.; ASSIS, B.S.; OLIVEIRA, D.L.S.; LEITE, M.O.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; SOUZA, M.R. In vitro probiotic potential of *Lactobacillus* spp. isolated from fermented milks. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.65, n.6, p.1876-1882, 2013.

FAO/WHO, Food and Agriculture Organization/ World Health Organization. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. 2002. 11p. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>. Acesso em: 13 de março de 2014.

HUMMEL, A.S.; HERTEL, C.; HOLZAPFEL, W.H.; FRANZ, C.M.A. Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v.73, n.3, p.730-739, 2007.

MATHUR, S.; SINGH, R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria: a review. *International Journal of Food Microbiology*, v.105, p.281-295, 2005.