



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Sanny Micaelly Rodrigues Fonseca

**Resistência a antimicrobianos de patógenos alimentares
isolados de amostras de leite comercializados informalmente**

Mossoró/RN

Abril de 2024

Sanny Micaelly Rodrigues Fonseca

**Resistência a antimicrobianos de patógenos alimentares
isolados de amostras de leite comercializados informalmente**

Monografia apresentada à Universidade
Federal Rural do Semi-Árido como requisito
para obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia

Orientador(a): Prof(a) Dr. Jean Berg Alves
da Silva

Mossoró/RN

Abril de 2024

Abril de 2024

©Todos os direitos estão reservados à Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade de Sanny Micaelly Rodrigues Fonseca, sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996, e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tornar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata, exceto as pesquisas que estejam vinculadas ao processo de patenteamento. Esta investigação será base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) seja devidamente citado e mencionado os seus créditos bibliográficos.

FF676 Fonseca, Sanny Micaelly Rodrigues Fonseca.
r Resistência a antimicrobianos de patógenos
alimentares isolados de amostras de leite
comercializados informalmente / Sanny Micaelly
Rodrigues Fonseca Fonseca. - 2024.
40 f. : il.

Orientador: Jean Berg Alves da Silva.
Coorientador: Jean Berg Alves da Silva.
Monografia (graduação) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Curso de Biotecnologia,
2024.

1. Staphylococcus sp. 2. Enterobacteriaceae.
3. sensibilidade. 4. resistência. 5.
antimicrobiano. I. da Silva, Jean Berg Alves,
orient. II. da Silva, Jean Berg Alves, co-orient.
III. Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade
com AACR2 e os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência
Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva
CRB: 15/120

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

Sanny Micaelly Rodrigues Fonseca

Resistência a antimicrobianos de patógenos alimentares isolados de amostras de leite comercializados informalmente

Monografia apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Defendida em: 19 / 04 / 2024.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 JEAN BERG ALVES DA SILVA
Data: 26/04/2024 21:30:21-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. Jean Berg Alves da Silva
Presidente

Documento assinado digitalmente
 CAROLINA DE GOUVEIA MENDES DA ESCÓSSIA F
Data: 26/04/2024 21:51:10-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dra. Carolina de Gouveia Mendes da Escóssia Pinheiro
Membro Examinador

Documento assinado digitalmente
 LARA BARBOSA DE SOUZA
Data: 26/04/2024 23:18:37-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. Lara Barbosa de Souza
Membro Examinador

RESUMO

A resistência antimicrobiana é um dos maiores problemas de saúde pública global. O objetivo dessa monografia é pesquisar os perfis de resistência de alguns microrganismos patogênicos que são encontrados geralmente em leite que não possui nenhum tipo de tratamento térmico e que são comercializados de forma informal em mercados. Para isolar os patógenos da família *Enterobacteriaceae*, primeiro foram feitos testes de coliformes termotolerantes através da inoculação das diluições em tubos em banho-maria a 45°C para observar a formação de gás, com isso, foi preciso passar para placas de EMB, onde só cresceriam bactérias gram-negativas, quem foram possível identificar o crescimento de *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter sp* e *Escherichia coli*. Para o isolamento de *Staphylococcus sp.* foi preciso colocar em placas de Baird Parker em estufa a 36°C para conseguir isolá-las. Para a realização dos testes de susceptibilidade nas famílias das *Enterobacteriaceae* foram utilizados os antibióticos: Sulfazotrim, Gentamicina, Amoxicilina, Cefoxitina, Imipenem, Amicacina, Ertapenem, Ciprofloxacina, Cefotaxima, Cefepime, Ceftriaxona e Ceftazidima. Para o teste de susceptibilidade nos *Staphylococcus sp.* foram utilizados os antibióticos: Penicilina, Sulfazotrim, Eritromicina, Cefoxitina, Amoxicilina, Norfloxacina, Amicacina, Ciprofloxacina, Gentamicina e Cefotaxima. Com isso foi possível observar que as *E. coli* apresentaram fator de multirresistência a alguns antibióticos, principalmente a Amicacina e Gentamicina. Portanto, foi possível observar que alguns desses microrganismos apresentam resistência a alguns antibióticos.

Palavras-chave: antibióticos, resistência, sensibilidade, antibiograma, *Staphylococcus sp.*, *Klebsiella*, *Citrobacter sp*, *E. coli*.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance is one of the biggest global public health problems. The objective of this monograph is to research the resistance profiles of some pathogenic microorganisms generally found in milk, which do not undergo any type of heat treatment and which are sold informally in the markets. To isolate pathogens from the *Enterobacteriaceae* family, thermotolerant coliform tests were first carried out by inoculating the dilutions in tubes in a water bath at 45°C to observe gas formation. As a result, it was necessary to transfer them to EMB plates, where only gram-negative bacteria grew, and it was possible to identify the growth of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter sp* and *Escherichia coli*. For the isolation of *Staphylococcus sp.* it was necessary to place Baird Parker plates in an oven at 36°C to be able to isolate them. To carry out susceptibility tests on *Enterobacteriaceae* families, the following antibiotics were used: Sulfazotrim, Gentamicin, Amoxicillin, Cefoxitin, Imipenem, Amikacin, Ertapenem, Ciprofloxacin, Cefotaxime, Cefepime, Ceftriaxone and Ceftazidime. For susceptibility testing of *Staphylococcus sp.* The following antibiotics were used: Penicillin, Sulfazotrim, Erythromycin, Cefoxitin, Amoxicillin, Norfloxacin, Amikacin, Ciprofloxacin, Gentamicin and Cefotaxime. With this, it was possible to observe that *E. coli* presented a multi-resistance factor to some antibiotics, mainly Amikacin and Gentamicin. Therefore, it was possible to observe that some of these microorganisms are resistant to some antibiotics.

Keywords: antibiotics, resistance, sensitivity, antibiogram, *Staphylococcus sp.*, *Klebsiella*, *Citrobacter sp.*, *E. coli*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	–	Halo de <i>K. oxytoca</i> e <i>Citrobacter</i> sp	24
Figura 2	–	Halo de <i>K. pneumoniae</i>	25
Figura 3	–	Halo de <i>Escherichia coli</i>	27
Figura 4	–	Halo de de <i>Escherichia coli</i>	28
Figura 5	–	Halo de <i>S. sp.</i>	33
Figura 6	–	Halo de <i>S. sp.</i>	33
Figura 7	–	Halo de <i>S. sp.</i>	34

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	–	Totalidade de resistência e sensibilidade de <i>Klebsiella e Citrobacter sp.</i>	24
Gráfico 2	–	Totalidade de resistência e sensibilidade de <i>Escherichia coli</i>	27
Gráfico 3	–	Totalidade de resistência e sensibilidade de <i>S. spp. (t)</i>	30
Gráfico 4	–	Totalidade de resistência e sensibilidade de <i>S. spp. (a)</i>	31
Gráfico 5	–	Totalidade de resistência e sensibilidade de <i>S. spp. (a e)</i>	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Prova bioquímica de <i>Klebsiella</i> e <i>citrobacter</i> s.....	22
Tabela 2	– Indicadores de resistência a <i>Klebsiella</i> e <i>Citrobacter</i> spp.....	23
Tabela 3	– Indicadores de resistência a <i>Escherichia coli</i>	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Bel	Bacharel
Dr	Doutor
GEN	Gentamicina
SUT	Sulfazotrim
CFO	Cefoxitina
IPM	Imipenem
AMI	Amicacina
ETP	Ertapenem
CIP	Ciprofloxacino
CTX	Cefotaxima
FEP	Cefepime
CRO	Ceftriaxona
CAZ	Ceftazidima
AMC	Amoxicilina
NOR	Norfloxacina
ERI	Eritromicina
PEN	Penicilina
AMI	Agar Mueller Hinton
BP	Baird Parker
EC	Caldo para <i>Escherichia coli</i>
EMB	Agar Eosina Metileno Azul

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1. Consumo e contaminação do leite	15
2.2. <i>Staphylococcus sp.</i>	15
2.3. <i>Enterobacteriaceae</i>	16
2.3.1. <i>Escherichia coli</i>	16
2.2.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	17
2.3.3. <i>Klebsiella oxytoca</i>	17
2.3.4. <i>Citrobacter spp.</i>	17
2.4. Resistência microbiana	18
3. OBJETIVOS	19
4.1. Objetivos gerais	19
4.2. Objetivos específicos	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1. Coleta das amostras de leite	20
4.2. Análise das amostras	20
4.2.1. Análise de coliformes e identificação dos isolados	20
4.2.2. Análise para identificação de <i>Staphylococcus sp.</i>	21
4.3. Teste de susceptibilidade antimicrobiana	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	22

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
7. REFERÊNCIAS	36

1. INTRODUÇÃO

O leite é um dos alimentos mais consumidos e importantes no mundo, fazendo com que milhares de pessoas dependam do leite para sobrevivência, sendo assim, 10% da população mundial depende do leite para conseguir sobreviver (Siqueira Kenya et al., 2019; Ribeiro Júnior et al, 2020)

No Brasil, por ser um dos maiores produtores de leite bovino, o seu consumo de leite ainda é visto como mediano, mas comparado com os países vizinhos, o seu consumo ainda é elevado. Em média, o brasileiro consome 2 copos diários de leite mas com a comercialização informal deste no mercado, juntando com a falta de conhecimento da população, o leite pode apresentar contaminação de patógenos por possuir uma baixa qualidade de armazenamento e manuseamento (Siqueira Kenya et al, 2019).

Em pesquisas é comentado que o leite produzido no país ainda se encontra uma grande contagem de microrganismos patogênicos, com isso, a sanidade do animal ligado diretamente com a proliferação desses patógenos, como também, a falta de higienização adequada de quem a manuseia, a forma como este leite é armazenado e em que tipo de recipientes o leite é colocado. Podendo encontrar patógenos como *Staphylococcus sp.* e patógenos da família *Enterobacteriaceae* (Almeida Patrícia et al, 2020).

O *Staphylococcus sp.* é um dos maiores responsáveis por intoxicação em humanos e diariamente em contaminação em produtos. Essas intoxicações por *S. aureus* são causadas pela produção de toxinas (Abdeen et al., 2020). A presença de *Staphylococcus sp.* pode estar associada a mastite, nas pessoas que estão manipulando ou presente na pele do animal, também como a falta de higienização dos utensílios utilizados para a manipulação e a forma de armazenamento e transporte, assim produzindo enterotoxinas podendo levar as DTAs (Silva Teixeira; Andrade Figueiredo, 2018).

Enterobacteriaceae são uma família de bactérias gram-negativas, bacilares e móveis que estão localizadas principalmente na mucosa intestinal por serem tolerantes ao oxigênio presente no epitélio. São as primeiras bactérias colonizadoras do trato

gastrointestinal de um bebê recém-nascido (Baldelli Valerio et al, 2021). Das várias bactérias desta família, quatro das principais encontradas são: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* e *Citrobacter sp.*

A *Escherichia coli* é um dos principais patógenos responsáveis por causar infecções através de produtos de origem animal e de água que estejam contaminados, sendo o leite um desses produtos de origem animal. É um patógeno que não vai apresentar resistência a processo de tratamento térmico, mas será resistente ao resfriamento e congelamento (Lopes Vinicius, 2018; Ribeiro, L. F. et al, 2019).

A *Klebsiella pneumoniae* é um patógeno oportunista responsável por causar diferentes tipos de doenças infecciosas em unidades hospitalares, mas que nos últimos anos vem sendo encontrado em alimentos e causando doenças, sendo considerado um dos patógenos mais importantes de origem alimentar (Neres et al., 2019). Outra bactéria do gênero *Klebsiella* é a *oxytoca*.

A *Klebsiella oxytoca* é um patógeno que está presente na microflora intestinal dos seres humanos, sendo um dos grandes causadores de uma ampla variedade de infecções, e um dos seus principais sintomas são as diarréias. A *K. oxytoca* vai fazer parte do grupo das *Klebsiella*. Sua primeira vez encontrada aconteceu no leite (Yang et al., [s.d.]).

Citrobacter spp. são patógenos oportunistas, em humanos causam infecções nasais, podendo ocorrer surtos ou ser somente esporádicos. Essas bactérias podem ser encontradas em alimentos, fezes e outros ambientes que eles possam habitar (Liu et al., 2020). Por isso, é importante o estudo e testes de resistência microbiana.

A resistência microbiana se dá pelo uso excessivo de antibióticos, assim, aumentando o crescimento de patógenos resistentes a antibióticos. Com esta situação, o tratamento de doenças em humanos, animais e plantas está ficando cada vez mais difícil de encontrar uma solução (Oliveira Alseldo, Silveira Dâmaris, 2021).

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Consumo e contaminação do leite

No Brasil, o consumo desse leite está relacionado à exploração do gado trazido durante a colonização, se tornando um alimento amplamente consumido em todo o país, principalmente por crianças e idosos. Por ser um alimento básico da alimentação brasileira, o leite é uma preocupação de saúde pública por ter uma microbiota favorável ao crescimento de microrganismos patogênicos (Alves, [s.d.]; Silva Teixeira; Andrade Figueiredo, 2018).

A contaminação do leite é causada pela falta de higienização antes, durante ou após a ordenha, comprometendo a qualidade do leite, a mastite bovina sendo um dos principais contribuintes para ocorrer este tipo de contaminação. Portanto, a contaminação do leite é um importante ocasionador da contaminação humana, influenciando na saúde do consumidor e causando gastroenterites por causa do consumo de leite informalmente vendidos em mercados (Almeida Patrícia et al, 2020;).

2.2. *Staphylococcus spp.*

O *Staphylococcus sp.* é uma bactéria esférica e gram-positiva pertencente ao grupo de cocos, são frequentemente encontradas na pele e nas fossas nasais do ser humano saudável por pertencer a microbiota humana, mas pode provocar vários tipos de doenças que vão das mais simples para as mais graves (Abdeen et al., 2020).

S. sp. por ser uma bactéria produtora de exotoxinas são comumente associadas à DTAs (Doenças Transmitidas por Alimentos). As intoxicações alimentares com sua origem estafilocócica são as mais comuns produzidas por essa espécie de bactéria.. Os fatores de virulência deste microrganismo estão associados com os componentes da sua superfície celular como a proteína A, adesinas, leucocidinas, hemolinas, ácido teicóico e a produção de enzimas extracelulares. Os alimentos quando são expostos a temperaturas inadequadas leva a multiplicação neste alimentos e a produção de toxinas podendo resultar na intoxicação. Essa intoxicação ocorre devido à variedade de

enterotoxinas que podem ser termoestáveis e que resistem a procedimentos a que os alimentos foram submetidos (Santos et al., 2007; Moglad et al., 2020; Abdeen et al., 2020).

Atualmente o *S. sp.* é classificado como a terceiro maior patógeno responsável pela intoxicação alimentar nos humanos é considerado diariamente como o maior contaminantes nesses produtos, sendo o leite cru um dos responsáveis pela intoxicação por essa bactéria por seu valor nutricional na sociedade, causando um potencial risco saúde pública dos consumidores associadas a falta de higienização, o manuseio, a mastite e o armazenamento quando o leite colhido (Abdeen et al., 2020).

2.3. *Enterobacteriaceae*

As *Enterobacteriaceae* são uma família de bactérias anaeróbias facultativas, que vão esgotar o oxigênio e criar um ambiente reduzido se adequando a colonização de anaeróbios estritos, estando presentes no trato gastrointestinal de humanos. Portanto, está presente na mucosa gastrointestinal quando inflamada e sendo associadas a doenças que contém um maior risco de falha no tratamento (Baldelli Valerio et al, 2021).

2.3.1 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é uma bactéria patogênica gram-negativa e um importante indicador de doença pública. Esta bactéria é um dos principais causadores de diarreia infantil em países em desenvolvimento, pois possui capacidade de aderir à mucosa intestinal. A diarreia vai causar secreção, aumento da permeabilidade intestinal, inflamação intestinal e perda de superfície de absorção (Baldelli Valerio et al, 2021; Lopes Vinicius, 2018; Ribeiro, L. F. et al, 2019; Silveira et al, 2019).

As toxinas presentes na *Escherichia coli* vão induzir a secreção de líquidos, causando diarreia infantil. Os seus surtos estão relacionados ao mau manuseamento ou má qualidade da água e dos alimentos contaminados, sendo este patógeno responsável por colonizar a superfície da mucosa intestinal e liberar enterotoxinas, causando a diarreia (Ribeiro, L. F. et al, 2019; Ferreira et al, 2022).

2.3.2. *Klebsiella pneumoniae*

A *Klebsiella pneumoniae* é uma bactéria pertencente da família das Enterobacteriaceae, sendo elas gram-negativa, anaeróbia facultativa e oportunista. A primeira identificação do seu gênero ocorreu em 1885 por Trevisan, sendo ele também o responsável pela descrição da *Klebsiella pneumoniae*, podendo ela ser encontrada em diversos locais como, o solo, vegetais, laticínios, água e esgotos (Henry et al., 2017; Neres et al., 2019).

A *K. pneumoniae* é a única bactéria da família das enterobactérias que possuem capacidade de fixar no ambiente oxigênio atmosférico, como também descarboxilar aminoácidos para a formação de aminas (Henry et al., 2017; Neres et al., 2019).

2.3.3 *Klebsiella oxytoca*

A *Klebsiella oxytoca* é uma bactéria gram-negativa do gênero *Klebsiella* e da família das *Enterobacteriaceae*. Nos humanos está presente na microflora intestinal, sendo um importante patógeno causador de uma larga variedade de infecções, de diarreias a meningites (Yang et al., [s.d.]).

Em 1886, foi a primeira vez que ela foi descrita, mas com outro nome, “*Bacillus oxytocus permiciosus*”, tendo sido recuperado de um leite velho por Flugge, e sofreu renomeação para “*Aerobacter oxutocum*” por Bergey em 1926, e em 1956, por Lautrop chegou-se ao nome *Klebsiella oxytoca* (Yang et al., [s.d.]).

2.3.4. *Citrobacter sp.*

Citrobacter sp. são um patógeno oportunista em humanos que podem causar infecções naconasais, infecções esporádicas e surtos, podendo ser encontradas em fezes, alimentos e em outros ambientes. O *Citrobacter sp.* raramente coloniza o trato intestinal e o períneo de humanos. O *Citrobacter* é uma bactéria gram-negativa

pertencente às *Enterobacteriaceae* (Liu et al., 2020).

Em 1931, Werkman e Gellen propuseram um termo genérico, *Citrobacter*, para intermediários coliaerógenos positivos para citrato isolados de fezes. Este gênero atualmente possui mais de 11 espécies. Os *Citrobacter spp.* são bacilos retos, facultativos anaeróbios, possuindo flagelos peritríquios que conferem mortalidade. Meningites causadas por *Citrobacter spp.* foram reportadas pela primeira vez em 1960 (Liu et al., 2020).

2.4. Resistência microbiana

A resistência microbiana aos antimicrobianos é um desafio para a saúde global. A resistência microbiana é causada pelo mau uso e usos excessivos dos antibióticos mais antigos e consequentemente mais tradicionais, causando assim uma resistência desses antibióticos, assim, ocorrendo um desequilíbrio e resistência quando tenta tratar infecções com esses medicamentos (Oliveira Anselmo, Silveira Dâmaris, 2021; Scaldaferrri et al 2020).

Como os antibióticos representam um grupo vulnerável de cobertura e segurança da saúde é necessário que ocorra uma conscientização para o uso exagerado desses medicamentos. Por isso, é necessário testes para a verificação da susceptibilidade dessas drogas com os patógenos, realizando testes de verificação in vitro através do cultivo dos patógenos em placas em teste de difusão em disco, por ser tanto um método quanto quantitativo (Abdeen et al., 2020; Bejarano et al, 2018; Felix et al, 2018).

3. OBJETIVOS DA PESQUISA

3.1. OBJETIVO GERAL

Analisar a resistência bacteriana em patógenos presentes no leite comercializado informalmente.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a presença de coliformes tolerantes no leite;
- Analisar a presença de *Staphylococcus* sp. no leite;
- Isolar os patógenos presentes no leite;
- Analisar a resistência antimicrobiana dos patógenos presentes no leite através do teste de susceptibilidade.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta da amostra do Leite

Foram coletadas 10 amostras de leite de diferentes locais/vendedores ambulantes de diferentes áreas do município de Mossoró/RN e Quixeré/CE. Cada amostra tinha 500 mL, as amostras foram preservadas em recipientes e transportadas para o Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, localizado na Universidade Federal Rural do Semiárido – Mossoró/RN.

4.2. Análise das amostras

As amostras em seus frascos foram agitadas aproximadamente 20 vezes até que ocorresse a homogeneização. Após homogeneização, foram transferidos 25 mL de leite para um erlenmeyer contendo 225 mL de água peptonada e completou a sua diluição seriada passando 1 mL para três tubos de ensaios contendo 9 mL de água peptonada (“Instrução Normativa SDA nº 62 de 26/08/2003”, [s.d.]).

4.2.1. Análise de coliformes e identificação dos isolados

Para isolar *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* e *Citrobacter sp.* primeiro foi feito análises de coliformes termotolerantes em que os coliformes termotolerantes foram utilizados 90 tubos contendo caldo EC em que foram transferidos 0-5 mL das diluições 2, 3 e 4 em temperaturas de 45°C por 48 horas. Passado as 48 horas foi observado se ocorreu ou não formação de gás nesses tubos e transferidos para o meio EMB, colocados em estufa a 35°C por 24 horas para observar o crescimento de colônias características de bactérias da família *Enterobacteriaceae*, e transferidos para tubos contendo 5 mL de caldo BHI e deixado por 24 horas em estufa e foi iniciado os testes resistência antibacteriana em Ágar Mueller Hinton (“Instrução Normativa SDA nº 62 de 26/08/2003”, [s.d.]).

4.2.2. Análise para identificação de *Staphylococcus sp.*

Para isolar *Staphylococcus sp.* foi utilizado 60 placas contendo Baird Parker Agar sendo 6 para cada amostra de leite e duas para cada diluição em que foi adicionado 0-1mL das diluições em cada placa utilizando um espalhador de células, colocado em estufa em temperatura de 35°C por 48 horas. Após passada as 48 horas observar se houve crescimento de colônias típicas de *Staphylococcus sp.*, as colônias típicas conterá a formação de um halo em volta das colônias, mas mesmo assim realizar a contagem tanto das colônias típicas quanto das atípicas. Depois, as colônias foram transferidas para tubos contendo 5 mL de caldo BHI, colocadas em estufa por 24 horas a 35°C, e colocados 0.5 mL em Ágar Mueller Hinton para testes de resistência antibacteriana (“Instrução Normativa SDA nº 62 de 26/08/2003”, [s.d.]).

4.3. Teste de susceptibilidade antimicrobiana

Para a realização do teste de antibiograma foi utilizado o método de disco difusão em ágar Mueller Hinton em placas grandes para que haja espaço em que esse halos possam ser formados.

Para *Staphylococcus sp.* os antibióticos que foram utilizados são a Penicilina, Sulfazotrim, Eritromicina, Cefoxitina, Amoxicilina, Norfloxacin, Amicacina, Ciprofloxacina, Gentamicina e Cefotaxima, e medido o halo após 24 horas na estufa a 35°C (ABDEEN et al., 2020, MANUAL ANTIBIOGRAMA et al., 2019).

Para os microrganismos da *Enterobacteriaceae* os antibióticos utilizados foram: Sulfazotrim, Gentamicina, Amoxicilina, Cefoxitina, Imipenem, Amicacina, Ertapenem, Ciprofloxacina, Cefotaxima, Cefepime, Ceftriaxona e Ceftazidima, e medido o halo após 24 horas. (ABDEEN et al., 2020; MANUAL ANTIBIOGRAMA et al., 2019).

Para a identificação dos pontos de corte e medição do halo formado pelos antibióticos foi usado o BrCast, EUCast e a Biblioteca virtual em saúde.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para analisar a presença de coliformes termotolerantes nas amostras de leite, foi realizado o método de presença de formação de gás em tubos em meio EC e foram contatados que 45/90 deram positivos em 10 amostras de leite. Com isso foram selecionados tubos de cada diluição que deu positivo das amostras e foram passadas para meio EMB, que é um meio seletivo e diferencial que permite o crescimento de bactérias gram-negativas, permitindo assim o crescimento de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* e *Citrobacter sp.*, onde as três últimas foi possível de identificar fazendo prova bioquímica. De acordo com a tabela 1.

Tabela 1: Prova bioquímica para *K. pneumoniae*, *oxytoca* e *Citrobacter sp.*

Patógenos	INDOL	CITRATO	URÉIA	LISINA	SIM	TSI
<i>K. pneumoniae</i>	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	AVG
<i>K. pneumoniae</i>	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	AVG
<i>K. oxytoca</i>	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	AAG
<i>Citrobacter sp.</i>	(+)	(-)	(+)	(+)		AAH2S

(-): negativo; (+): positivo; AV: Irão indicar a cor de como o meio ficou e G: indica a formação de gás.

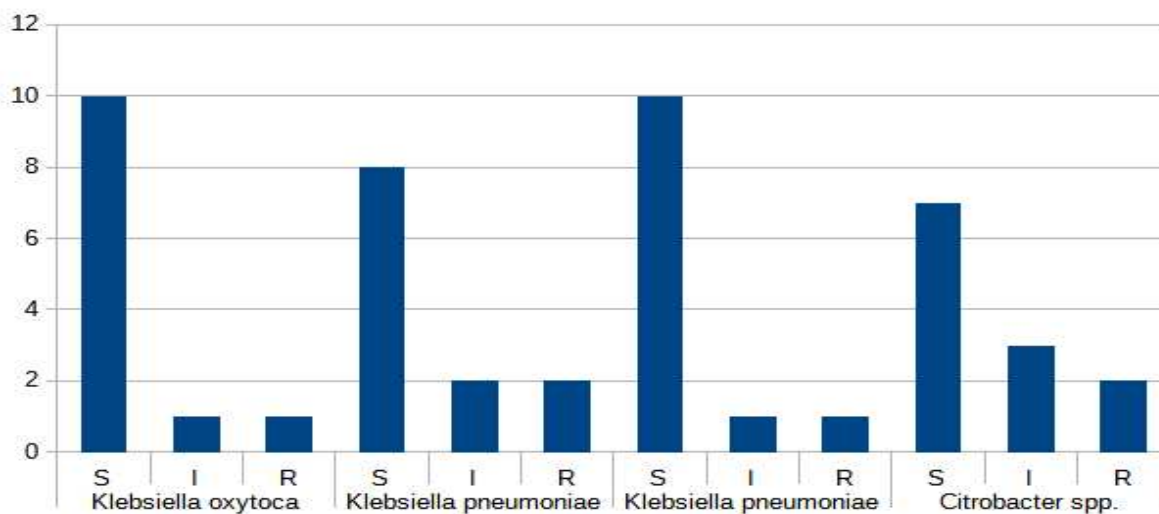
Quanto à sensibilidade dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* identificados na prova bioquímica foi possível observar que eles apresentaram resistência a Gentamicina e Amicacina. Quanto à sensibilidade do isolado de *Klebsiella oxytoca*, ela apresentou ser resistente à Amicacina. Em referente ao isolado de *Citrobacter sp.* ele apresentou resistência a Sulfazotrim e Amicacina. Estando representados na na tabela 2 e no gráfico 1. Em sequência na figura 1 e 2 a visualização da formação do halo nas placas de antibiogramas.

Tabela 2: Relação de resistência e sensibilidade entre a *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* e *Citrobacter sp.* e os antibióticos.

Antibiótico	<i>Klebsiella oxytoca</i>			<i>Klebsiella pneumoniae</i>			<i>Klebsiella pneumoniae</i>			<i>Citrobacter sp.</i>		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
GEN	1					1	1			1		
SUT	1			1			1					1
CFO	1			1			1			1		
IPM	1			1			1			1		
AMI			1			1			1			1
ETP	1			1			1			1		
CIP	1			1					1		1	
CTX	1			1			1			1		
FEP		1			1		1				1	
CAZ	1			1			1			1		
CRO	1				1		1				1	
AMC	1			1			1			1		
TOTAL	10	1	1	8	2	2	10	1	1	7	3	2

GEN: Gentamicina; SUT: Sulfazotrim; CFO: Cefoxitina; IPM: Imipenem; AMI: Amicacina; ETP: Ertapenem; CIP: Ciprofloxacina; CTX: Cefotaxima; FEP: Cefepime; CRO: Ceftriaxona; CAZ: Ceftazidima e AMC: Amoxicilina. A relação de S, I e R está relacionada com Sensibilidade, Intermediário e Resistência.

Gráfico 1: A relação da totalidade de resistência e sensibilidade apresentada dos microrganismos e antibióticos.

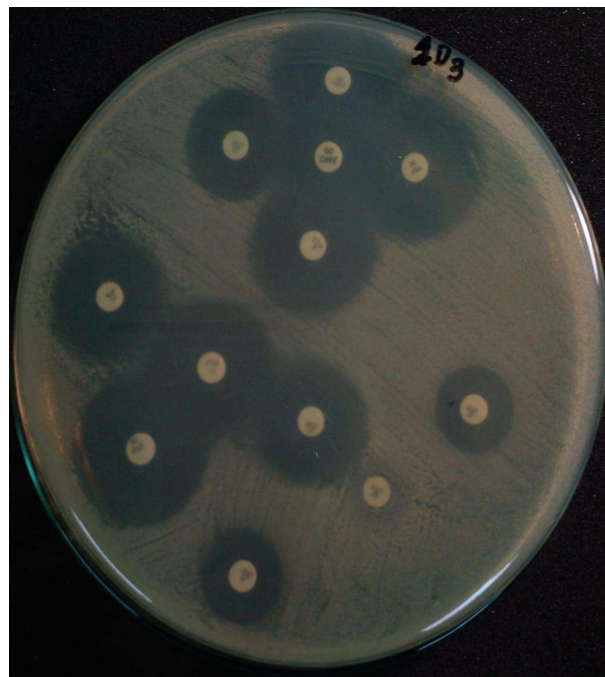


A relação de S, I e R está relacionada com Sensibilidade, Intermediário e Resistência.

Figura 1: Visualização dos halos nas amostras de *Klebsiella oxytoca* e *Citrobacter spp.*



(a) *Klebsiella oxytoca*



(b) *Citrobacter sp.*

Figura 2: Visualização dos halos nas amostras de *Klebsiella pneumoniae*.



(a) *Klebsiella pneumoniae*



(b) *Klebsiella pneumoniae*

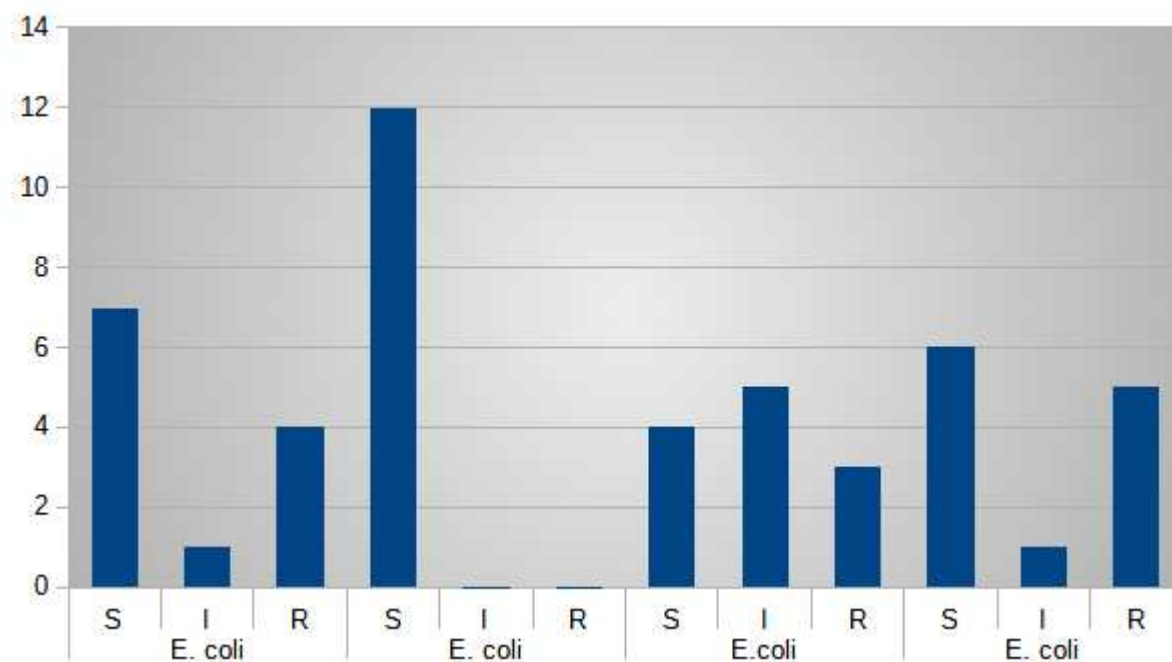
Quanto à sensibilidade dos isolados de *Escherichia coli*, onde foram isolados 4 cepas desse patógeno, eles apresentaram resistência a antibióticos em 3/4 dos isolados. Nos três patógenos de *E. coli* apresentaram resistência a Gentamicina, Amicacina, Ertapenem, Ceftriaxona, Cefepime e Amoxicilina. Conforme mostrado na tabela 3 e gráfico 2. Em sequência na figura 3 e 4 a visualização da formação do halo nas placas de antibiogramas.

Tabela 3: Relação de resistência e sensibilidade entre as *Escherichia coli* e os antibióticos.

Antibióticos	E. coli			E. coli			E.coli			E. coli		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
GEN			1	1					1			1
SUT	1			1			1			1		
CFO	1			1				1		1		
IPM	1			1				1		1		
AMI			1	1					1			1
ETP			1	1					1	1		
CIP	1			1			1			1		
CTX	1			1				1		1		
FEP	1			1				1				1
CAZ	1			1				1			1	
CRO			1	1			1					1
AMC		1		1			1					1
TOTAL	7	1	4	12	0	0	4	5	3	6	1	5

GEN: Gentamicina; SUT: Sulfazotrim; CFO: Cefoxitina; IPM: Imipenem; AMI: Amicacina; ETP: Ertapenem; CIP: Ciprofloxacina; CTX: Cefotaxima; FEP: Cefepime; CRO: Ceftriaxona; CAZ: Ceftazidima e AMC: Amoxicilina. A relação de S, I e R está relacionada com Sensibilidade, Intermediário e Resistência.

Gráfico 2: A relação da totalidade de resistência e sensibilidade apresentada dos microrganismos e antibióticos.



A relação de S, I e R está relacionada com Sensibilidade, Intermediário e Resistência.

Figura 3: Visualização dos halos nas amostras de *Escherichia coli* de acordo com o gráfico.

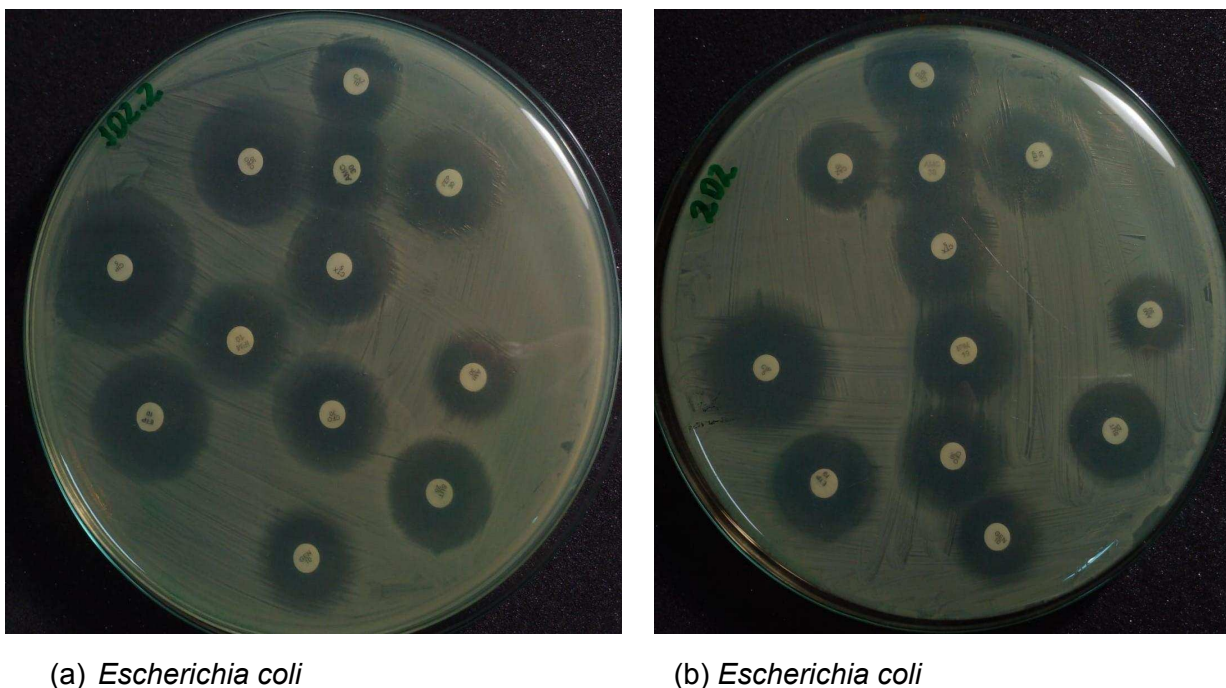


(a) *Escherichia coli*



(b) *Escherichia coli*

Figura 4: Visualização dos halos nas amostras de *Escherichia coli* de acordo com o gráfico.



Com os resultados obtidos dos patógenos pertencentes a família da *Enterobacteriaceae* isoladas do leite comercializado informalmente, os isolados de *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* e *Citrobacter sp.*, não mostraram um perfil de multirresistência elevado em comparação com os estudos de Mota et al., com isso, não corroborou com os resultados apresentados. Como as pneumonias são muito associadas a infecção de IRAS ao uso de ventilação mecânica em hospitais, foi um fator importante porque mostraram que esses patógenos não apresentaram multirresistência quando comparadas outros estudos porque nesses estudos indicam que o alto de índice de mortalidade que esses patógenos podem levar (Mota et al, 2018).

Os isolados de *Escherichia coli* apresentam perfil de multirresistência corroborando com os estudos de Mota et al., com isso, é possível relacionar em recentes estudos em que as bactérias do tipo bacilos gram-negativas estão apresentando resistência a antibióticos beta lactamases de espectro estendido e que a *Klebsiella pneumoniae* carbapemases se tornaram uma grande preocupação por causa

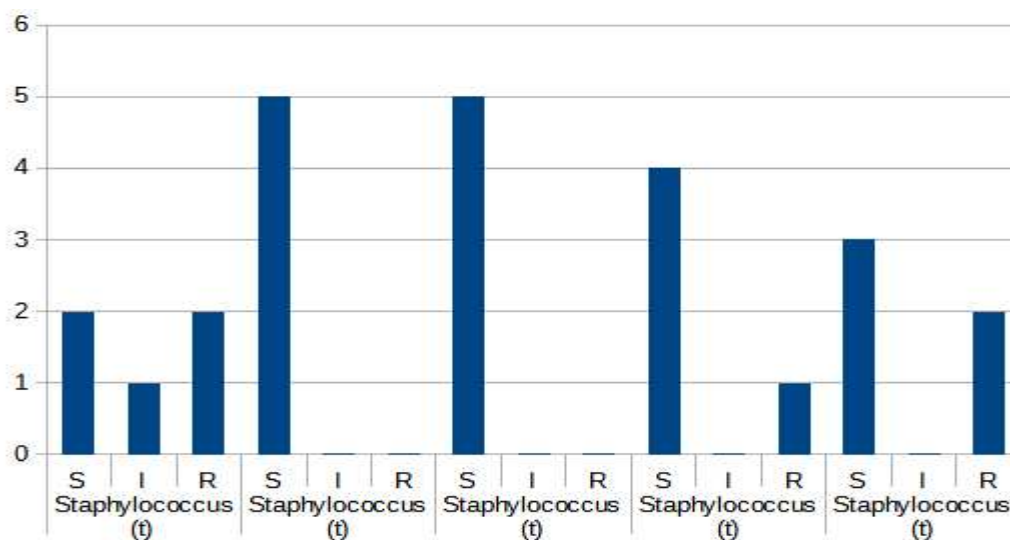
da escassez de antibióticos eficazes. No atual momento, a resistência bacteriana aos antimicrobianos beta lactâmicos continuam aumentando, o que gera uma preocupação por serem antibióticos que geralmente são de uso tradicional (Modesto et al, 2019).

Também foi possível observar que a Amicacina e a Gentamicina foram os antibióticos menos apresentaram sensibilidade as bactérias patogênicas da família *Enterobacteriaceae*, porque também são antibióticos de uso tradicional para tratamentos empíricos e que são formados principalmente de aminoglicosídeos.

Das dez amostras de leite coletadas também foram utilizados para saber a presença de *Staphylococcus sp.* e assim inoculadas em 60 placas contendo BP em suas diferentes diluições. Nas placas cresceram tanto bactérias contendo halo na colônia quanto as que não apresentam halo na colônia. Nas cinco primeiras amostras de leite cru, após as 48h nas placas em estufa, foram isoladas e colocadas em caldo BHI, 5 cepas de colônias de *Staphylococcus sp.* contendo halo na sua colônia e outras 5 não contendo o halo.

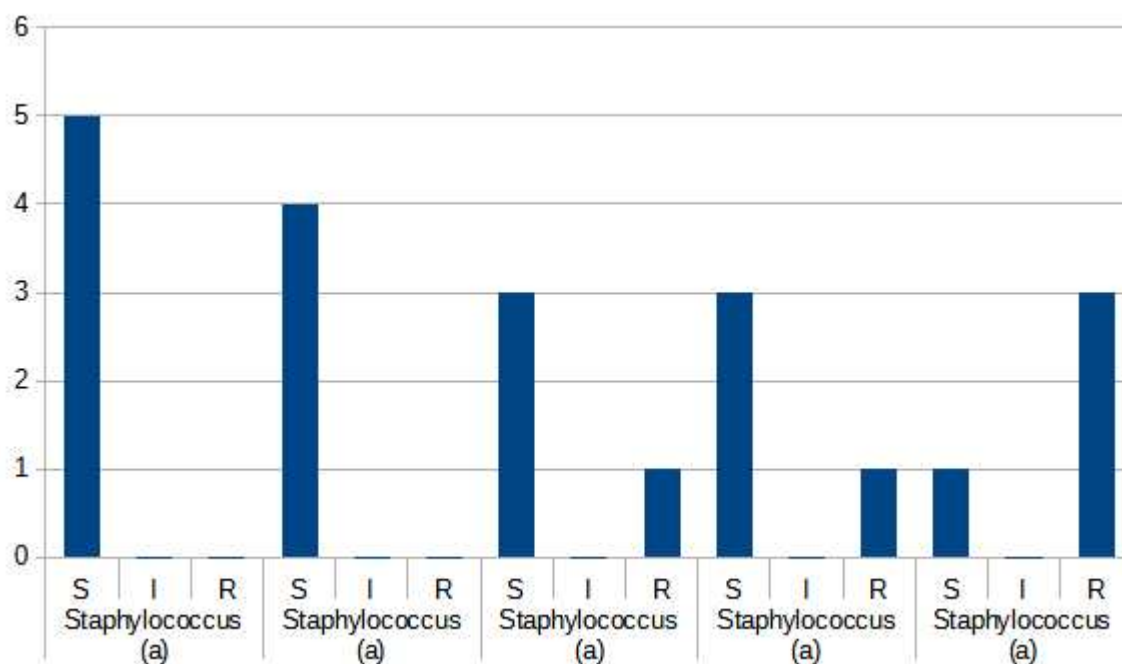
Nos *Staphylococcus sp.* contendo o halo na colônia quando colocados para a realização do antibiograma, apenas três desses isolados apresentaram resistência a algum antibiótico. No primeiro isolado, apresentou resistência a Penicilina e Amoxicilina, e intermediário para Eritromicina. No segundo, o isolado apresentou resistência apenas ao antibiótico Penicilina. No terceiro, o isolado foi resistente aos antibióticos: a Penicilina e a Eritromicina. Conforme apresentado no gráfico 3.

Gráfico 3: Relação da totalidade da sensibilidade e resistência dos *Staphylococcus sp.* (*t- típicas*) nas placas.



Nos *Staphylococcus sp.* com colônia sem a presença do halo, dois isolados não contiveram nenhuma resistência aos antibióticos, mas apresentaram sensibilidade aos antibióticos. Em dois isolados a resistência ocorreu na Penicilina e no último, a resistência ocorreu na Penicilina, Eritromicina e Amoxicilina. Conforme apresentado no gráfico 4.

Gráfico 4: Relação da totalidade da sensibilidade e resistência dos *Staphylococcus sp.* (a) nas placas.



A relação de S, I e R está relacionada com Sensibilidade, Intermediário e Resistência.

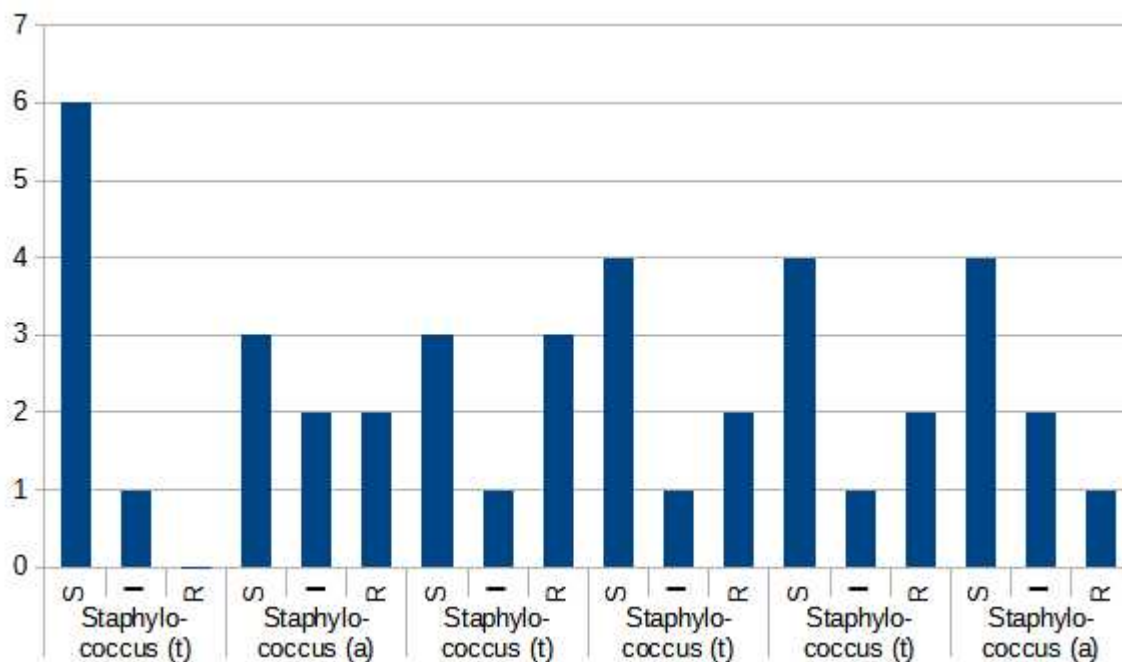
Nas outras 5 amostras de leite comercializado informalmente, quando crescidas nas placas, foram isoladas apenas 6 cepas de *Staphylococcus sp.*, sendo apenas duas delas de colônias que não continham o halo e as outras quatro foram as que apresentaram halo na sua colônia.

Nas placas de antibiogramas das colônias isoladas contendo o halo, apenas três patógenos apresentaram resistência a antibióticos. Na primeira, a resistência ocorreu nos antibióticos Gentamicina, Cefoxitina e Amoxicilina. No segundo, ocorreu resistência aos antibióticos Gentamicina e Cefoxitina. No terceiro, a resistência foi nos antibióticos Amicacina e Cefoxitina. Nas quatro apresentaram antibióticos que ficaram no perfil intermediário, sendo eles, Ciprofloxacina, Cefotaxima e Ciprofloxacina. Conforme apresentado no gráfico 5. Em sequência na figura 5 e 6 a visualização da formação do halo nas placas de antibiogramas.

Nas placas de AMI com colônias sem a presença do halo, as duas apresentaram resistência a algum antibiótico. As duas apresentaram resistência à Cefoxitina, e uma delas resistente à Gentamicina. Elas também tiveram antibióticos que ficaram no perfil

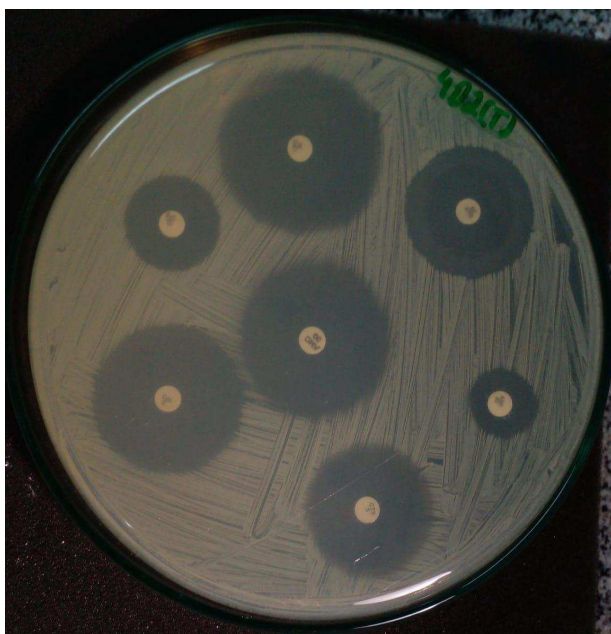
intermediário, a Cefotaxima e a Ciprofloxacina. Conforme apresentado no gráfico 5. Em sequência na figura 7 a visualização da formação do halo nas placas de antibiogramas.

Gráfico 5: Relação da totalidade da sensibilidade e resistência dos *Staphylococcus sp.* (*t* - típica e *a* - atípica) nas placas.

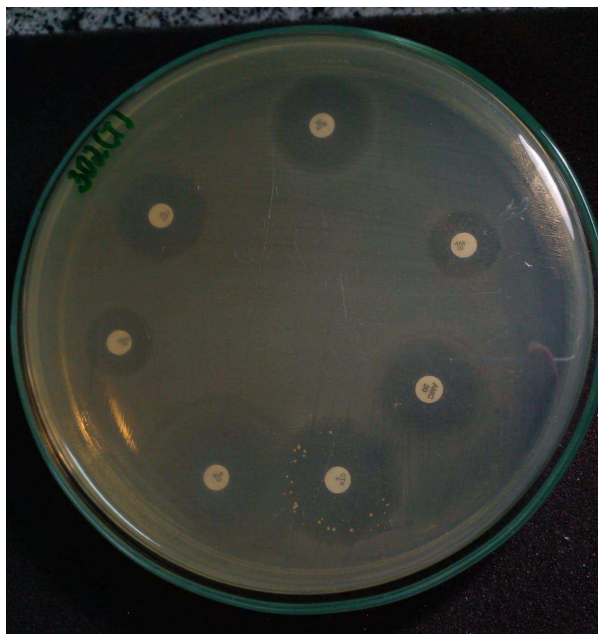


A relação de S, I e R está relacionada com Sensibilidade, Intermediário e Resistência.

Figura 5: Visualização dos halos formados nas primeira e terceira amostra do gráfico 5

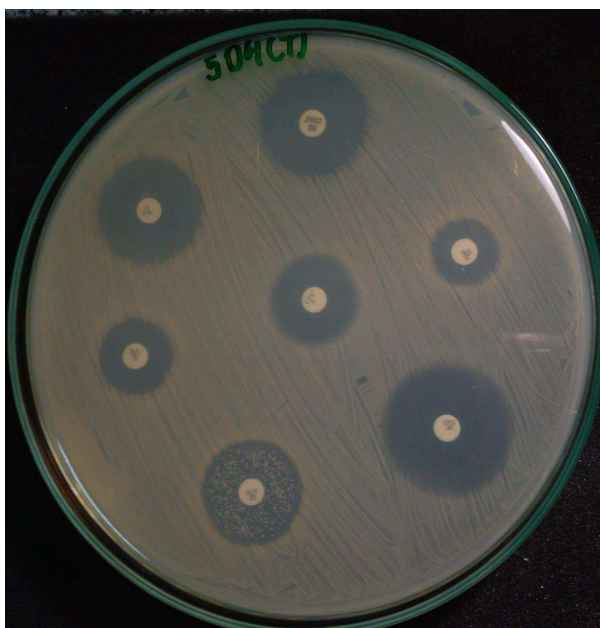


(a) *Staphylococcus sp. (t)*

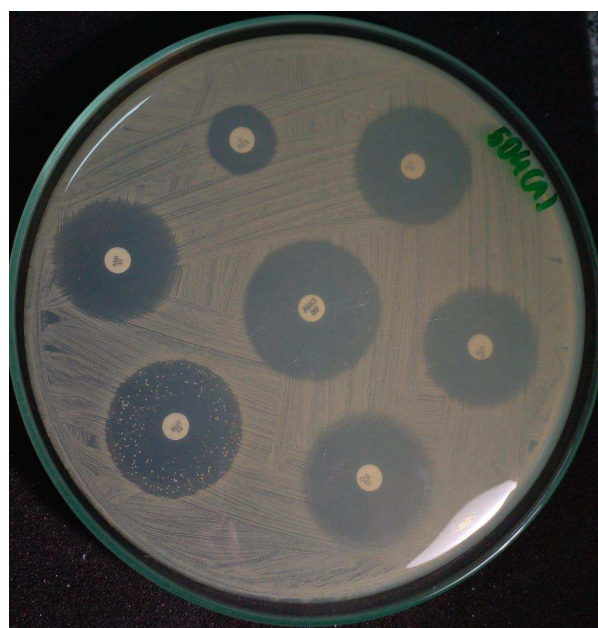


(b) *Staphylococcus sp. (t)*

Figura 6: Visualização dos halos formados na quinta e sexta amostra do gráfico 5.



(a) *Staphylococcus sp. (t)*

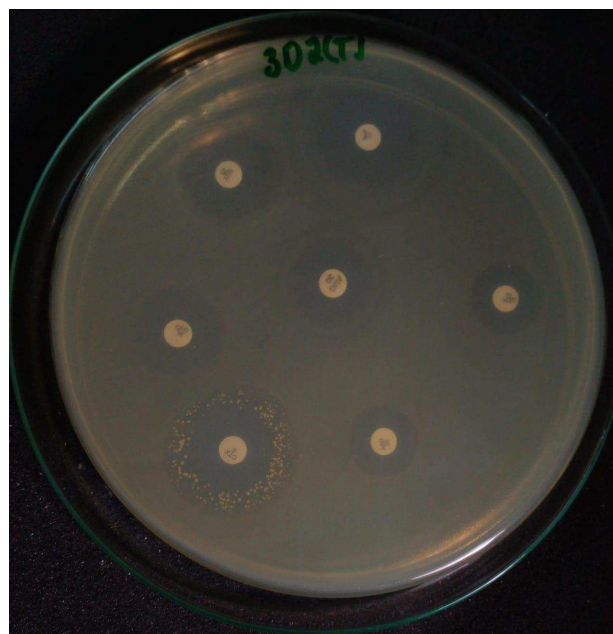


(b) *Staphylococcus sp. (t)*

Figura 7: Visualização dos halos formados na segunda e quarta amostra do gráfico 5.



(a) *Staphylococcus sp.* (a)



(b) *Staphylococcus sp.* (a)

As cepas resistentes a Penicilina são aqueles que são sensíveis a Oxacilina que produzem beta-lactamase, sendo preferível que essa penicilina seja testada com a junção da Amoxicilina que é uma beta-lactamase-lábeis, com isso, é possível concluir que apesar dessas cepas serem sensíveis a Amoxicilina, ele realmente apresenta resistência a Penicilina, por causa da sua composição. E que alguns mesmos combinados ocorrem realmente a resistência a outros antibióticos, como é o caso da Eritromicina, com a Amoxicilina e Penicilina, podendo ser possível concluir a resistência desta cepa a esses antibióticos (Bôtelho et al, 2022).

A resistência à Cefoxitina pode ter conexão com a característica genotípica do mesmo, que é um marcador de resistência aos beta-lactâmicos, e com isso, ele apresenta resistência nas maiorias das cepas, sendo possível fazer a combinação da sua sensibilidade com a ajuda da Amoxicilina, mas pode concluir que mesmo fazendo uma combinação, à Cefoxitina realmente apresenta resistência a alguns isolados de *Staphylococcus sp.* A Gentamicina vai apresentar resistência quando forem utilizados em infecções sistêmicas, e por ele ser um aminoglicosídeo tem que ser utilizado com outro agente antimicrobiano, podendo ser distinguido quando ele adquire mecanismo

de resistência (Duarte et al, 2018).

É importante salientar que a resistência de *Staphylococcus sp.* é um fator preocupante porque este patógeno está relacionados com diversas doenças que afetam tanto humanos quanto animais e que o principal causador de sua doenças são as toxinas presentes nelas e com uma capacidade invasiva, causa resistência a antibióticos (Oliveira Paloma et al, 2020) .

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentaram pontos significativos entre a resistência e sensibilidade desses patógenos em relação aos antibióticos, onde a *E. coli* apresentou mais resistência a alguns antibióticos, sendo os antibióticos mais frequentes a Gentamicina e Amicacina, não só unicamente nas *E. coli* como também nos outros patógenos da família *Enterobacteriaceae*. Portanto, é importante que o uso destes medicamentos seja administrado de forma correta para que não haja cada vez mais crescente o aparecimento de multirresistência dos mesmos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, D. R. INDUSTRIALIZAÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DO LEITE DE CONSUMO NO BRASIL. p. 9, [s.d.].

GONÇALVES, D. E. CONTROLE DE QUALIDADE DO LEITE DE BOVINOS: da ordenha à indústria processadora do leite e seus derivados. Nossa Senhora da Glória - SE. Monografia, junho de 2021.

SIQUEIRA, B. K. O MERCADO CONSUMIDOR DE LEITE E DERIVADOS. EMBRAPA - Juiz de Fora, julho de 2019

BELL, C. E. **Coli : a practical approach to the organism and its control in foods.** [s.l.] London ; New York : Blackie Academic & Professional, 1998.

Baldelli, V.; Scaldaferrì, F.; Putignani, L.; Del Chierico, F. The Role of Enterobacteriaceae in Gut Microbiota Dysbiosis in Inflammatory Bowel Diseases. *Microorganisms* 2021, 9, 697. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040697>

JÚNIOR, R. C. J. et al. Perfil consumidor brasileiro de consumo de leite e derivados. *Archives of Veterinary Science*, v.25, n.2, p.21-30, 2020.

HENRY, C. S. et al. Generation and Validation of the iKp1289 Metabolic Model for *Klebsiella pneumoniae* KPPR1. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 215, n. Suppl 1, p. S37–S43, 15 fev. 2017.

Instrução Normativa SDA nº 62 de 26/08/2003. Disponível em: <https://www.normasbrasil.com.br/norma/instrucao-normativa-62-2003_75165.html>. Acesso em: 8 dez. 2023.

LIU, L. et al. Lineage, Antimicrobial Resistance and Virulence of *Citrobacter* spp. **Pathogens**, v. 9, n. 3, p. 195, 6 mar. 2020.

NERES, L. L. F. G. et al. Perfil de sensibilidade microbiana in vitro de cepas de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* isoladas de queijo artesanal. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 10, n. 3, p. 20–29, 17 jul. 2019.

QUIGLEY, L. et al. The complex microbiota of raw milk. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 5, p. 664–698, set. 2013.

LOPES, L. V. A. Micro-organismo indicadores e caracterização de *Escherichia coli* isoladas de leite cru refrigerado. UFPB - Recife, fevereiro de 2018.

SILVEIRA, L et al. Antagonismo de bactérias ácido lácticas autóctones de leite cru contra

Staphylococcus aureus ATCC 12600 e *Escherichia coli* ATCC 25922. VÉRTICES, Campos dos Goytacazes/RJ, v.21, n.3, p. 443-451, set./dez. 2019.

RIBEIRO, L. et al. DIARRHEAGENIC *Escherichia coli* IN RAW MILK, WATER, AND CATTLE FACES IN NON-TECHNIFIED DAIRY FARMS. Cienc. anim. bras, Goiânia, v.20, 1-9, e-47449, 2019.

SILVA TEIXEIRA, C. M.; ANDRADE FIGUEIREDO, M. QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO LEITE BOVINO NO BRASIL ASSOCIADA A *Staphylococcus aureus*. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 6, n. 1, p. 196, 31 dez. 2018.

FELIX, M. L. A. et al. *Allium Sativum*: uma nova abordagem frente a resistência microbiana - uma revisão. Braz. J. Hea., Curitiba, v. 1, n. 1, p. 201-207, jul/set, 2018.

BEJARANO, KA et al. Resistencia microbiana desde una perspectiva metagenómica - artículo de revisión. Nova, Bogotá v. 16 n. 29, jan/june, 2018.

SCALDAFERRI, et al. Formas de resistência microbiana e estratégia para minimizar sua ocorrência na terapia antimicrobiana: revisão. PUBVET v.14, n.8, a621, p.1-10, Ago., 2020.

OLIVEIRA, de Gomes Anselmo; SILVEIRA, Dâmaris. Resistência microbiana a antibióticos: quo vadis?. 10.14450/2318-9312.v33.e3.a2021.pp215-216.

OLIVEIRA, de C. V. P. et al. Avaliação da qualidade do leite cru e prevalência de mastite no município de Mossoró-RN. Braz. J. of Develop., Curitiba, v. 6, n. 8, p. 64027-64042, aug. 2020.

MODESTO, et al. Infecções relacionadas à assistência à saúde em recém-nascidos de alto risco: perfil de resistência dos bacilos gram-negativos. REAS/EJCH, v. 11, e. 507, março de 2019.

MOTA et al. Perfil e prevalência de resistência aos antimicrobianos de bactérias gram-negativas isoladas de um paciente de uma unidade hospitalar de terapia intensiva. Universidade Católica de Goiás, junho de 2018.

BÔTELHO, X. E. et al. Prevalência e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* em hospitais do Brasil: uma revisão integrativa da literatura. Research, Society and Development, v. 11, n. 6, e2711628744, 2022.

DUARTE, C. FELIPE et al. Bacteremia por *Staphylococcus aureus*: uma análise de quinze anos da sensibilidade a antimicrobianos em um hospital terciário do Brasil. R Epidemiol Control Infec, Santa Cruz do Sul, 8(3):232-238, 2018. [ISSN 2238-3360].

YANG, J. et al. Klebsiella oxytoca Complex: Update on Taxonomy, Antimicrobial Resistance, and Virulence. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 35, n. 1, p. e00006-21, [s.d.].