

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Juliana Raquel da Silva Damer

**CARACTERÍSTICAS GENOTÍPICAS E FENOTÍPICAS DE CEPAS DE
Escherichia coli ISOLADAS DE CARNE MOÍDA BOVINA *IN NATURA***

**Santa Maria, RS
2016**

Juliana Raquel da Silva Damer

**CARACTERÍSTICAS GENOTÍPICAS E FENOTÍPICAS DE CEPAS DE
Escherichia coli ISOLADAS DE CARNE MOÍDA BOVINA *IN NATURA***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosmari Hörner

**Santa Maria, RS
2016**

Juliana Raquel da Silva Damer

**CARACTERÍSTICAS GENOTÍPICAS E FENOTÍPICAS DE CEPAS DE
Escherichia coli ISOLADAS DE CARNE MOÍDA BOVINA *IN NATURA***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Aprovada em 15 de janeiro de 2016:

Rosmari Hörner, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Marines Calegari Lavall, Dr^a. (UFSM)

Janice de Fátima Pavan Zanella, Dr^a. (UNICRUZ)

Santa Maria,RS
2016

Aos meus pais....
que sonharam os meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tornar real o que era apenas um sonho.

Aos meus pais, Valdemar e Juçara, por sonharem juntamente comigo. Obrigada pelo amor, paciência, conselhos e orações.

Ao meu querido namorado Júnior, pela compreensão e paciência.

À minha orientadora, Dr^a. Rosmari Hörner, pela grande oportunidade e por confiar no meu trabalho.

Às colegas, mestrandas e doutorandas, do Laboratório de Bacteriologia. Obrigada pela amizade, auxílios, correções.... Vocês são demais!

Aos estagiários da Iniciação Científica, pela grande ajuda nos experimentos.

Ao professor PhD. Daniel Graichen e a todos do Laboratório de Genética Evolutiva da UFSM – Campus de Palmeira das Missões, pela ajuda e participação neste trabalho.

Aos amigos Terimar, Viviane e Aldoir que muito contribuíram no início desta caminhada.

A todos que, de uma forma ou outra, tiveram participação nesta conquista.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, por conceder esta oportunidade.

À Capes, FINE e CNPq, pelo suporte financeiro.

*“Não se pode criar experiência.
É preciso passar por ela”
(Albert Camus)*

RESUMO

CARACTERÍSTICAS GENOTÍPICAS E FENOTÍPICAS DE CEPAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE CARNE MOÍDA BOVINA *IN NATURA*

AUTORA: Juliana Raquel da Silva Damer

ORIENTADORA: Dr^a. Rosmari Hörner

A *Escherichia coli* é uma bactéria que compõe a microbiota intestinal normal de animais de sangue quente, responsável por uma variedade de doenças em humanos, como bacteremia, infecção do trato urinário e infecções intestinais. Algumas tornam-se patogênicas após adquirirem genes de virulência. Ela é um contaminante frequente de alimentos, principalmente aqueles de origem animal e, quando ingerida, causa sintomas que caracterizam as Doenças Transmitidas por Alimentos, como diarreia e mal-estar.

A carne moída é um eficiente veiculador de *E. coli*, pois possui ótimas qualidades nutricionais e físico-químicas. Além disso, a sua grande manipulação contribui para a contaminação cruzada. O objetivo desta pesquisa foi analisar características genotípicas e fenotípicas de cepas de *E. coli*, provenientes de carne moída *in natura*, comercializadas em um município da região Noroeste do Rio Grande do Sul, no período de novembro de 2012 a março de 2013. Para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), foram realizados 26 *pools* de amostras de DNA de 262 cepas de *E. coli*, previamente isoladas e identificadas. Investigou-se a presença dos genes de virulência *bfpA* (EPEC típicas - tEPEC); *eaeA* (EPEC/EHEC); *stx1* e *stx2* (EHEC); *hlyA* (EHEC pO157); *aggR* (EAEC); *elt* e *est* (ETEC); e *ipaH* (EIEC). O perfil de sensibilidade frente aos antimicrobianos e a pesquisa dos fenótipos de enzimas de resistência ESBL, KPC, MBL e AmpC foram realizados pelo método de difusão do disco. Dos 26 *pools* analisados, 69,23% continham genes de virulência. O gene *bfpA* foi o prevalente, estando presente em 46,15% dos grupos analisados. Os genes *stx1*, *aggR*, *stx2*, *hlyA*, *eaeA* e *elt* foram encontrados em 26,92%; 23,07%; 19,23%; 11,53%; 11,53%; e 3,84%, respectivamente. Em contrapartida, não foram identificados os genes *est* e *ipaH*. O perfil de sensibilidade frente aos antimicrobianos demonstrou 100% de sensibilidade frente à aztreonam, ceftazidima, gentamicina, meropenem e piperacilina/tazobactam e resistência frente a ampicilina (7,63%), sulfametoxazol/trimetoprima (5,34%) e cefalotina (3,43%), sendo 1,14% resistente à múltiplas drogas. As enzimas de resistência não foram detectadas pelo teste fenotípico. Dessa forma, melhores cuidados higiênico-sanitários são necessários desde o momento do abate do animal até a comercialização da carne moída e outros produtos cárneos, a fim de diminuir a contaminação destes alimentos, principalmente por microrganismos patogênicos. Ainda, maior conscientização sobre o uso indiscriminado de antimicrobianos na criação de gado de corte deve ser realizada, evitando a seleção de microrganismos resistentes às drogas disponíveis comercialmente para tratamento de enfermidades.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. Carne. Virulência. Antimicrobianos.

ABSTRACT

CHARACTERISTICS GENOTYPIC AND PHENOTYPIC OF *Escherichia coli* STRAINS ISOLATED FROM GROUND BEEF MEAT *IN NATURA*

AUTHOR: Juliana Raquel da Silva Damer

ADVISOR: Dr^a. Rosmari Hörner

Escherichia coli is a bacterium that comprise the normal intestinal flora of warm-blooded animals, responsible for a variety of diseases in humans, as bacteremia, urinary tract and intestinal infections. Some become pathogenic virulence genes after purchasing. It is a frequent contaminant of food, particularly those of animal origin, and when ingested, causes symptoms that characterize the foodborne Diseases such as diarrhea and malaise. The ground beef is a efficient disseminator of *E. coli* because it has great nutritional and physicochemical qualities. In addition, a great handling contributes to cross-contamination. The objective of this research was to analyze genotypic and phenotypic characteristics of *E. coli* strains from ground beef in natura, marketed in a town in the Northwest region of Rio Grande do Sul from November 2012 to March 2013. For the Polymerase Chain Reaction (PCR), we made 26 pools of DNA samples of 262 *E. coli* strains previously isolated and identified. We investigated the presence of *bfpA* virulence genes (typical EPEC - tEPEC); *eaeA* (EPEC/EHEC); *stx1* and *stx2* (EHEC); *hlyA* (pO157 EHEC); *aggR* (EAEC); *elt* and *est* (ETEC); and *ipaH* (EIEC). The sensitivity profile front antimicrobial and the research phenotypes of resistance enzymes, ESBL, KPC, MBL and AmpC were performed by disk-diffusion method. Of the 26 pools analyzed 69.23% contained virulence genes. The *bfpA* gene was prevalent, present in 46.15% of the analyzed groups. The genes *stx1*, *aggR*, *stx2*, *hlyA*, *eaeA* and *elt* were found in 26.92%; 23.07%; 19.23%; 11.53%; 11.53%; and 3.84% respectively. In contrast they were not identified the genes *est* and *ipaH*. The sensitivity profile across antimicrobial showed 100% of sensitivity against aztreonam, ceftazidime, gentamicin, meropenem, and piperacillin/tazobactam and resistance against ampicillin (7.63%), sulfamethoxazole/trimethoprim (5.34%) and cephalothin (3.43%), and 1.14% being resistant to multiple drugs. Resistance enzymes were not detected by phenotypic test. Thus, better hygiene and sanitary precautions are necessary from time of animal slaughter to commercialization of ground beef and other meat products, in order to reduce contamination of feed, mainly by pathogenic microorganisms. Furthermore, greater awareness of the widespread use of antimicrobials in beef cattle breeding should be performed, avoiding the selection of resistant microorganisms to drugs commercially available for treating diseases

Keywords: *Escherichia coli*. Meat. Virulence. Antimicrobial.

LISTA DE TABELAS

Manuscrito

TABELA 1 - Genes, <i>primers</i> e sequências utilizados na PCR para a detecção dos genes de virulência das cepas de <i>E. coli</i> isoladas da carne moída <i>in natura</i>	25
TABELA 2 - Genes de virulência, identificados por PCR, nos <i>pools</i> de DNA de <i>E. coli</i> , isoladas de carne moída <i>in natura</i>	28
TABELA 3 - Perfil de sensibilidade frente aos antimicrobianos, pelo método de difusão do disco, das 262 cepas de <i>E. coli</i> isoladas de carne moída <i>in natura</i>	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
µg	Microgramas
µL	Microlitros
A/E	<i>Attaching and effacing</i>
aEPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica atípica
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BFP	<i>Bundle-forming pili</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DAEC	<i>Escherichia coli</i> de adesão difusa
DEC	<i>Escherichia coli</i> diarreiogênica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
EAF	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica <i>adherence factor</i>
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etilenodiamino tetra-acético
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasora
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ESBL	β-lactamases de espectro ampliado
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
g	Gramas
GN	Gram-Negativo
h	Horas
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida Humana
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
LT	Termolábil
MBL	Metalo β-lactamase
MDR	Resistência à Múltiplas Drogas
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
n°	Número
nm	Nanômetro
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial de hidrogênio
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RPM	Rotações por minuto
RS	Rio Grande do Sul
SHU	Síndrome Hemolítica Urêmica
ST	Termoestável
Stx	Toxinas de Shiga
tEPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica típica

TBE
UFSM
V

Tris/Ácido Bórico/ Etilenodiamino tetra-acético
Universidade Federal de Santa Maria
Volts

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS.....	13
1.1.1 <i>Escherichia coli</i>	14
1.1.1.1 <i>Escherichia coli</i> diarréiogênicas.....	14
1.1.2 Carne moída e a contaminação por <i>E. coli</i>	17
1.1.3 Resistência bacteriana aos antimicrobianos	18
1.2 JUSTIFICATIVA	18
1.3 OBJETIVOS.....	19
1.3.1 Objetivo geral.....	19
1.3.2 Objetivos específicos.....	19
2 MANUSCRITO CIENTÍFICO	20
2.1 MANUSCRITO – Presença de genes de virulência e perfil de sensibilidade frente aos antimicrobianos de <i>Escherichia coli</i> isoladas de carne moída bovina <i>in natura</i>	20
Abstract	20
Resumo	21
INTRODUÇÃO	21
MATERIAL E MÉTODOS	24
Isolados bacterianos	24
Pesquisa dos genes de virulência pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	24
Perfil de sensibilidade frente aos antimicrobianos	26
Ensaio fenotípico por difusão do disco para detecção de enzimas de resistência	26
β-lactamase de espectro ampliado (<i>Extended-Spectrum β-Lactamase</i> - ESBL).....	26
β-lactamase carbapenemase do tipo KPC (<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase). 27	
Metallo β-lactamases (MBL).....	27
β-lactamase cromossômica cefalosporinase (AmpC induzível).....	27
RESULTADOS	27
DISCUSSÃO	29
CONCLUSÕES	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
3 CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) podem ser infecções, intoxicações ou toxinfecções causadas pela ingestão de alimentos e água contaminados com microrganismos, parasitas ou substâncias tóxicas. Os sintomas dependem do agente etiológico envolvido, e em geral, caracterizam-se pela presença de diarreia e/ou vômitos, anorexia, cefaleia, náuseas, dentre outros (ANVISA, 2004). A diarreia é a manifestação clínica mais comum entre as DTA, sendo considerada a maior causa de morte de crianças em todo o mundo (BRASIL, 2010).

Os casos de DTA vêm aumentando dia após dia a nível mundial, cujas as causas são diversas, como o crescimento das populações, existência de grupos vulneráveis, urbanização desordenada, necessidade de produção de alimentos em grande escala e a ineficiência do controle da qualidade dos alimentos pelos órgãos competentes (BRASIL, 2010).

Os maus hábitos de higiene, mantidos pelos manipuladores de alimentos, são os principais fatores para a origem de surtos de DTA, tanto em cozinhas caseiras quanto nas indústrias alimentícias (BRONER et al., 2010; LITTLE et al., 2012). Além da manipulação, a temperatura de cocção dos alimentos, quando inadequada, é a causa mais frequente de surtos que ocorrem a domicílio (MARCHI et al., 2011).

Dentre os agentes etiológicos responsáveis por causar DTA, encontra-se a bactéria *Escherichia coli* (BRASIL, 2010). Em estudo sobre surtos ocorridos no Rio Grande do Sul (RS) durante os anos de 2006 e 2007, este microrganismo esteve presente em 41% das amostras de alimentos envolvidos. Ainda, constatou-se que os alimentos mais contaminados foram os produtos cárneos, principalmente a carne bovina (39%), e que as residências foram os locais onde os surtos ocorreram com maior frequência (WELKER et al., 2010). Em outra pesquisa, que abordou o perfil epidemiológico de surtos de DTA ocorridos no Brasil e descritos na literatura no período de 1998 a 2011, os produtos cárneos, juntamente com aqueles à base de ovos, foram os alimentos mais envolvidos (GARCIA; DUARTE, 2014).

1.1.1 *Escherichia coli*

A *E. coli* é um bacilo Gram-Negativo (GN), pertencente à família *Enterobacteriaceae*, sendo considerada a espécie predominante entre os microrganismos anaeróbios facultativos da microbiota intestinal de animais de sangue quente (KONEMAN, 2008; MURRAY, 2014; NATARO; KAPER, 1998). Membros desta família metabolizam diversas substâncias, como carboidratos, proteínas, aminoácidos, lipídeos e ácidos orgânicos. Fermentam a lactose com produção de ácido e gás; e a glicose com produção de ácido, resultando em positividade na prova de vermelho de metila. Entretanto, não produzem acetoina através de metabolização de glicose, resultando em prova negativa no teste de Voges-Proskauer. Ainda, produzem indol a partir do aminoácido triptofano, não utilizam o citrato e não produzem ácido sulfídrico (KONEMAN, 2008).

A *E. coli* é a espécie mais comumente isolada nos laboratórios clínicos, sendo responsável por doenças infecciosas que acometem todos os tecidos e sistemas orgânicos dos seres humanos e animais (HERZOG et al., 2014; LIU et al., 2014), além de estarem presentes em animais saudáveis, os quais servem de reservatório (KAGAMBÉGA et al., 2012; MOHAMMED, 2012; PIZARRO et al., 2013). Geralmente, para seu isolamento, utilizam-se ágar MacConkey ou ágar Azul de Metileno e a identificação é realizada através de reações bioquímicas em meios de cultura diferenciais ou kits comerciais (KONEMAN, 2008).

Em relação à diferenciação das *E. coli* diarreiogênicas (DEC) das não patogênicas, técnicas moleculares para a pesquisa de genes específicos têm sido frequentemente empregadas, como por exemplo, a reação em cadeia da polimerase (PCR) (NATARO; KAPER, 1998). Este, é um dos testes mais úteis utilizados atualmente, principalmente quando realizado em forma de multiplex. Entretanto, por ser trabalhoso, não é adequado para a análise de grandes números de amostras clínicas, ficando mais restrito a pesquisas científicas (CHEN et al., 2014).

1.1.1.1 *E. coli* diarreiogênicas

A *E. coli* compõe a microbiota intestinal normal de animais de sangue quente, incluindo humanos, porém determinadas linhagens tornam-se patogênicas após adquirirem fatores de virulência (MURRAY, 2014). Cepas de DEC, contendo genes de

virulência, têm sido responsáveis por surtos de DTA em várias partes do mundo, como por exemplo na Coreia do Sul (CHO et al., 2010), Reino Unido (CHATTAWAY et al., 2013), Índia (DUTTA et al., 2013), Irã (ALIKHANI et al., 2013) e Brasil (JANUZZI et al., 2009; FRANÇA et al., 2013).

Os fatores de virulência, as manifestações clínicas e a epidemiologia das diarreias causadas, são os critérios para a classificação em grupos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), as quais serão foco deste estudo, além de *E. coli* de adesão difusa (DAEC) (MURRAY, 2014).

A linhagem EPEC não é produtora de enterotoxinas, entretanto causa enfermidade em crianças e lactentes, principalmente nos países em desenvolvimento (NATARO; KAPER, 1998). Os sintomas caracterizam-se pela presença de diarreia aquosa, febre, vômitos e mal-estar (LEVINE, 1987). A intimina codificada pelo gene *eae* e seu receptor Tir, presentes nas EPEC típicas (tEPEC) e atípicas (aEPEC), são as principais proteínas envolvidas na adesão íntima e lesão A/E (*attaching and effacing*), pois orientam a formação do pedestal, alterações profundas no citoesqueleto das células epiteliais (destruição das microvilosidades) e o acúmulo de actina no local (GOOSNEY et al., 2000). As tEPEC possuem ainda um plasmídeo de alto peso molecular chamado “EPEC adherence factor” (EAF) onde encontram-se os genes *bfp*, os quais codificam e mediam a expressão dos pili formadores de feixes denominados de “bundle-forming pili” (BFP), sendo esse o primeiro estágio da lesão A/E (KAPER et al., 2004).

A linhagem EHEC é capaz de produzir as citotoxinas stx1 e stx2 mediadas pelos genes *stx1* e *stx2*, respectivamente. Elas são denominadas verotoxinas ou toxinas *Shiga-like*, ou ainda toxinas de Shiga (*Stx*) (NATARO; KAPER, 1998) e são produzidas por diversos sorotipos causadoras de diarreia sanguinolenta chamada de colite hemorrágica, síndrome hemolítica-urêmica (SHU) e púrpura trombocitopênica trombótica, além de morte (FENG; WEAGANT, 2002). Essas citotoxinas causam a inibição da síntese de proteínas e consequente morte celular. EHEC possui ainda o gene *hlyA* localizado no plasmídeo pO157, o qual codifica para uma enterohemolisina com capacidade para lisar enterócitos. Cepas de sorologia O157 são as representantes mais importantes dessa linhagem pois estão amplamente associadas com SHU. Além de produzir as toxinas de Shiga e a enterohemolisina, pode expressar o gene cromossomal *eae*, o qual age da mesma maneira que em EPEC (KAPER et al., 2004).

As cepas ETEC são responsáveis por causar a “diarreia do viajante”, aquosa, sem dano tecidual, afetando crianças (NATARO; KAPER, 1998) e animais (GUTH, 2000). A sua virulência caracteriza-se pela presença de fatores de colonização contendo adesinas que promovem a adesão às células da mucosa intestinal (GUTH, 2000) e pela produção das enterotoxinas termolábil (LT) e termoestável (ST), mediadas pelos genes plasmidiais *elt* e *est*, respectivamente (DIAS et al., 2012). Essas enterotoxinas induzem a secreção de água e eletrólitos pelo intestino e estão associadas a um grande número de sorotipos que podem produzir ambas ou apenas uma delas. Os genes para os fatores de colonização são codificados pelo mesmo plasmídeo codificador para as enterotoxinas (GUTH, 2000).

A linhagem EIEC assemelha-se bioquimicamente a bactéria *Shigella* sp., além de apresentar os mesmos sintomas de infecção, como diarreia profusa com ou sem sangue e muco (LAN et al., 2004; NATARO; KAPER, 1998), febre, vômitos, dor abdominal grave e câimbras (LEVINE, 1987). Os fatores de virulência estão relacionados à presença do gene *ipaH*, responsável por determinar o mecanismo de invasão celular, à presença de proteínas de invasão e à presença de enterotoxina termolábil (KAPER et al., 2004). A invasão celular ocorre por endocitose após alterações no citoesqueleto, em seguida a bactéria multiplica-se, rompe a célula, e desloca-se para as células adjacentes. A célula invadida sofre acúmulo de actina e há o desarranjo da estrutura celular causando a sua morte (KONEMAN, 2008).

A EAEC é isolada principalmente de crianças que apresentam diarreia crônica, aquosa e mucoide, sem sangue macroscópico, nem leucócitos, com febre baixa e poucos vômitos, e também de pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência adquirida humana (HIV) (NATARO et al., 2006). A adesão agregativa caracteriza-se pela adesão das fímbrias bacterianas à mucosa intestinal, assemelhando-se a uma pilha de tijolos e formando agregados heterogêneos ou cordões. Após, ocorre a produção de muco e formação de biofilme na superfície dos enterócitos, além da liberação de toxinas (HARRINGTON et al., 2005). Como um único fator de virulência não está associado à patogenicidade de EAEC, sugere-se que um “pacote” de fatores de virulência plasmidiais e cromossômicos sejam regulados por um único ativador de transcrição, chamado de *aggR* (NATARO et al., 2006).

1.1.2 Carne moída e a contaminação por *E. coli*

Carne moída *in natura* é o produto cárneo obtido da moagem de tecidos musculares de bovinos (BRASIL, 2003). Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001, este alimento pode ser consumido quando houver ausência de *Salmonella* spp. em 25g de amostra (BRASIL, 2001). A pesquisa de *E. coli* não é exigida pela legislação brasileira, entretanto, torna-se importante pois a sua presença indica contaminação de origem fecal e a possível presença de outros enteropatógenos (LUNDGREN et al., 2009).

A carne moída apresenta mais problemas microbiológicos que outros cortes, pois sofre maior manipulação e possui maior relação área/volume. As qualidades nutricionais da carne agravam essa realidade, pois contém quantidades significativas de proteínas, gorduras, carboidratos, vitaminas e sais minerais, além de elevada atividade de água e pH próximo da neutralidade (SOUZA et al., 2012). Além disso, o aumento da contagem microbiana na carne moída em relação ao corte inteiro pode ocorrer devido à elevada contaminação presente na máquina de moer bem como nas mãos dos manipuladores, a qual promove a contaminação cruzada (OLIVEIRA et al., 2008).

Dessa forma, muitos pesquisadores têm investigado a qualidade higiênica e/ou a presença de *E. coli* virulentas em cortes bovinos e carne moída, tanto aqui no Brasil quanto em outros países. Os autores enfatizam que a presença desta bactéria em produtos de origem animal pode ser devido à contaminação através do manipulador, utensílios, fezes do animal e local de abate contaminado. Os resultados ainda revelam as condições precárias desse alimento e o risco que a população está exposta ao consumi-lo, principalmente se não for preparado adequadamente (FERREIRA et al, 2012; JURE, et al., 2010; LUNDGREN et al., 2009; MOHAMMED, 2012; MOHAMMED et al., 2014; XIA et al., 2010).

Nesse mesmo contexto, pesquisas recentes têm demonstrado a ampla distribuição de cepas de *E. coli* virulentas em diversos alimentos de origem animal. Elas foram encontradas em alimentos crus, como por exemplo: em cortes e produtos de frango, camelos, ovinos, caprinos, bovinos e suínos (MOMTAZ et al., 2013; PETTERNEL et al., 2014; STUART et al., 2012; VOETS et al., 2013), leite de vacas, cabras, ovelhas, búfalas, camelas e mulas (MOHAMMADI et al., 2013; MOMTAZ et al., 2012); e em alimentos industrializados, como em produtos lácteos fermentados (DEHKORDI et al., 2014) e queijo minas frescal (DIAS et al., 2012).

Xia e colaboradores (2010) afirmaram que a presença de linhagens virulentas em carne moída comercializada nos Estados Unidos da América, representa uma grande preocupação devido ao seu elevado potencial patogênico e pelo fato de que este alimento é amplamente consumido pela população.

1.1.3 Resistência bacteriana aos antimicrobianos

A resistência bacteriana aos antimicrobianos tem sido uma ameaça crescente à saúde pública, pois infecções menores, antes facilmente curáveis, agora podem levar à morte tornando o tratamento caro, difícil ou mesmo impossível, principalmente em pacientes vulneráveis (WHO, 2014). O surgimento de bactérias GN multirresistentes e produtoras de enzimas de resistência também tem aumentado e representam uma preocupação particular (ANVISA, 2013; PETER-GETZLLAF et al., 2011).

Os microrganismos podem desenvolver resistência aos antimicrobianos rapidamente, logo após entrarem em contato com eles. As alterações acontecem através de codificação por plasmídeos transferíveis e por trocas entre espécies, gêneros e famílias (MURRAY, 2014).

O uso de antibióticos é uma prática comum em animais que serão destinados ao abate, tanto como medida profilática ou de tratamento, quanto como promotores de crescimento. Essa prática promove a seleção de microrganismos resistentes, os quais podem comprometer tratamentos de doenças entéricas e sistêmicas, humanas ou não (COSTA et al., 2006; MENG, 1998; MOTA et al., 2005).

Segundo Mantilla e Franco (2012), a investigação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos em cepas de *E. coli* isoladas de animais ou seus produtos é importante, pois além de ser um alvo de monitoramento, direciona as medidas de controle sanitário. Szmolka et al. (2012) advertiram que o surgimento de cepas que são virulentas e ao mesmo tempo resistentes aos antimicrobianos representa um fator limitante no tratamento de infecções em animais e em seres humanos. Ressaltaram ainda a necessidade de estudos sobre esses perfis, pois são úteis na identificação de genótipos emergentes.

1.2 JUSTIFICATIVA

Produtos cárneos são os alimentos mais comumente envolvidos em surtos de DTA causados por cepas de *E. coli* virulentas, das quais muitas são resistentes aos

antimicrobianos. As características genotípicas e fenotípicas desta espécie possuem elevada diversidade regional, sendo de grande importância à saúde pública. Assim, a investigação destas características em *E. coli* isoladas de amostras de carne moída *in natura* é de grande importância, uma vez que esse derivado cárneo, juntamente com hambúrgueres, são alimentos saborosos, acessíveis e estão presentes nas refeições diárias, sendo amplamente consumidos em todo o mundo.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

Determinar as características genotípicas e fenotípicas de cepas de *Escherichia coli* isoladas de amostras de carne moída bovina *in natura* comercializadas em um município da região Noroeste do Rio Grande do Sul, Brasil.

1.3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos desta pesquisa foram:

- a) detectar a presença dos diferentes genes de virulência nas cepas de *E. coli* (*stx1*, *stx2*, *eaeA*, *est*, *elt*, *ipaH*, *aggR*, *hlyA*, *bfpA*);
- b) avaliar o perfil de sensibilidade das cepas de *E. coli* frente aos antimicrobianos mais frequentemente utilizados na prática clínica;
- c) identificar a presença de enzimas para mecanismos de resistência (ESBL, KPC, MBL e AmpC cromossômica).

2 MANUSCRITO CIENTÍFICO

Este manuscrito será submetido ao Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.

2.1 MANUSCRITO

Presença de genes de virulência e perfil de sensibilidade frente aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de carne moída bovina *in natura*

Juliana Raquel da Silva Damer¹, Rosmari Hörner^{2*}

¹ Farmacêutica, Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), UFSM, Santa Maria (SM), Rio Grande do Sul (RS)/Brasil (BR).

² Doutora em Química pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Professora Associada do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, UFSM, SM, RS/BR.

* Endereço para correspondência: Hörner, R. Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Avenida Roraima, 1000, Cidade Universitária, Camobi, Santa Maria, RS, CEP 97105-900, Prédio 26, salas 1201/1206. rosmari.ufsm@gmail.com

Abstract

Meat products are great backers of pathogens due to their nutritional qualities. Contamination by *Escherichia coli*, bacteria of animal gut microbiota may occur from harvesting to the time of marketing of meat. The aim of this study was to investigate the presence of virulence genes and the sensitivity profile front antimicrobial of 262 strains of *E. coli* isolated from ground beef *in natura* marketed in municipality in the Northwest region of Rio Grande do Sul. For performing the Polymerase Chain Reaction (PCR) were performed 26 pools of DNA samples from 262 strains. The sensitivity profile front to antimicrobials was performed by disk-diffusion method, as well as the investigation of the resistance phenotypes ESBL, KPC, MBL and AmpC. Virulence genes have been identified, *bfpA*, *stx1*, *aggR*, *stx2*, *hlyA*, *eaeA*, *elt*, in percentages of 46.15%, 26.92%, 23.07%, 19.23%, 11.53%, 11.53% and 3.84%, respectively. Ampicillin, sulfamethoxazole/trimethoprim and cephalothin were the least eficiente. The resistance

enzymes were not detected. Intensification It is suggested to control the use of drugs in cattle breeding and training of inspection health authorities to improve sanitary conditions for the handling of ground beef.

Uniterms: *Escherichia coli*. Meat. Virulence. Disk Diffusion Antimicrobial Test.

Resumo

Produtos cárneos são ótimos veiculadores de patógenos devido às suas qualidades nutricionais. Contaminações por *Escherichia coli*, bactéria da microbiota intestinal animal, podem ocorrer desde o abate até o momento da comercialização da carne. O objetivo deste estudo foi investigar a presença de genes de virulência e o perfil de sensibilidade frente aos antimicrobianos, de 262 cepas de *E. coli* isoladas de carne moída *in natura*, comercializadas em município da região Noroeste do Rio Grande do Sul. Para a realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), foram realizados 26 *pools* de amostras de DNA. O perfil de sensibilidade frente aos antimicrobianos foi realizado pelo método de difusão do disco, assim como a investigação dos fenótipos de resistência ESBL, KPC, MBL e AmpC. Foram identificados os genes de virulência: *bfpA*, *stx1*, *aggR*, *stx2*, *hlyA*, *eaeA*, *elt*, nas porcentagens de 46,15%, 26,92%, 23,07%, 19,23%, 11,53%, 11,53% e 3,84%, respectivamente. Ampicilina, sulfametoxazol/trimetoprima e cefalotina foram os antimicrobianos frente aos quais as cepas apresentaram maior resistência. As enzimas de resistência não foram detectadas. Sugere-se intensificação no controle do uso de medicamentos na criação de bovinos e capacitação dos órgãos sanitários fiscalizadores para a melhoria das condições higiênico-sanitárias durante a manipulação da carne moída.

Unitermos: *Escherichia coli*. Carne. Virulência. Testes de sensibilidade a antimicrobianos por difusão do disco.

INTRODUÇÃO

Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) são intoxicações ou toxinfecções causadas pela ingestão de alimentos ou água contaminados com microrganismos, parasitas ou substâncias tóxicas (ANVISA, 2004). A diarreia é a manifestação clínica mais comum das DTA, a qual é considerada a maior causa de morte de crianças em todo o mundo (Brasil, 2010). Os maus hábitos de higiene dos manipuladores constituem um dos principais fatores (Little *et al.*, 2012).

Qualquer alimento pode veicular patógenos, porém as carnes cruas destacam-se por apresentarem elevadas taxas de contaminação microbiana (Lundgren *et al.*, 2009; Jure, *et al.*, 2010), a qual pode ocorrer durante o abate, pelos manipuladores, utensílios, recipientes, fezes do animal e local mal higienizado (Ferreira *et al.*, 2012). As qualidades nutricionais da carne agravam essa realidade, pois apresentam quantidades significativas de proteínas, gorduras, carboidratos, vitaminas e sais minerais, além de elevada atividade de água e pH próximo da neutralidade. A carne moída tem maior probabilidade de contaminação que outros cortes, pois sofre grande manipulação e contém maior relação área/volume (Souza *et al.*, 2012), além do que, ela pode estar presente na máquina de moer bem como nas mãos dos manipuladores, constituindo a contaminação cruzada (Oliveira *et al.*, 2008).

A *Escherichia coli* figura entre os agentes responsáveis pelas DTA (Brasil, 2010), uma vez que é microrganismo anaeróbio facultativo prevalente da microbiota intestinal de animais de sangue quente, mas torna-se patogênica ao adquirir genes de virulência (Nataro, Kaper, 1998). A pesquisa de *E. coli* em carne moída não é exigida pela Legislação Brasileira, a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), apesar de sua presença indicar contaminação de origem fecal e a possível presença de enteropatógenos (Lundgren *et al.*, 2009).

Assim, pesquisadores de diversos países, incluindo o Brasil, têm investigado a qualidade higiênica e/ou a presença de *E. coli* virulentas em cortes bovinos e carne moída. Os resultados revelam as condições precárias desses alimentos e o grande risco à saúde do consumidor, principalmente se não forem preparados adequadamente (Jure, *et al.*, 2010; Lundgren *et al.*, 2009; Xia *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2012; Mohammed, 2012; Mohammed *et al.*, 2014).

Os fatores de virulência, as manifestações clínicas e a epidemiologia das diarreias causadas por *E. coli* diarreiogênicas (DEC), são os critérios para sua classificação em: *E.*

coli enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* de adesão difusa (DAEC). Tais fatores de virulência são determinados pela presença de genes, os quais conferem a capacidade patogênica (Kaper et al., 2004). A diferenciação de DEC das *E. coli* não patogênicas é realizada por técnicas moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), além de testes sorológicos (Nataro, Kaper, 1998; Chen et al., 2014).

O gene *bfpA* (EPEC típica - tEPEC), codifica e media a expressão de pili, que formam feixes e dão início à lesão A/E (*attaching and effacing*). tEPEC possui também o gene *eaeA*, assim como a EPEC atípica (aEPEC) e EHEC. Este gene codifica uma proteína denominada intimina que está envolvida na adesão íntima e lesão A/E, orientando a formação do pedestal, destruição das microvilosidades e acúmulo de actina (Goosney et al., 2000; Kaper et al., 2004). Os genes *stx*, presentes em EHEC, codificam para as toxinas *Shiga-like*, causam graves enfermidades como colite hemorrágica, síndrome hemolítica-urêmica (SHU) e púrpura trombocitopênica trombótica (Nataro, Kaper, 1998; Feng, Weagant, 2002). Elas inibem a síntese de proteínas e, conseqüentemente, há morte celular. EHEC pode conter ainda o gene *hlyA* localizado no plasmídeo pO157, o qual codifica para enterohemolisina (Kaper et al., 2004).

Os genes plasmidiais *elt* e *est* (ETEC) codificam a produção das enterotoxinas termolábil (LT) e termoestável (ST), respectivamente (Nataro, Kaper, 1998). Elas induzem a secreção de água e eletrólitos pelo intestino e estão associadas a um grande número de sorotipos que podem produzir ambas ou apenas uma enterotoxina (Guth, 2000). O gene *ipaH* (EIEC) determina o mecanismo de invasão celular, a qual ocorre por endocitose após alterações no citoesqueleto. Em seguida, a bactéria multiplica-se, rompe a célula e desloca-se para as células adjacentes. A célula invadida sofre acúmulo de actina e há o desarranjo da estrutura celular causando a sua morte (Kaper et al., 2004; Lan et al., 2004). O gene *aggR* (EAEC), é um ativador de transcrição que regula um “pacote” de fatores de virulência plasmidiais e cromossômicos (Nataro et al., 2006). Há adesão agregativa das fímbrias bacterianas à mucosa intestinal, assemelhando-se a uma pilha de tijolos e formando agregados heterogêneos ou cordões. Após, ocorre a produção de muco, formação de biofilme na superfície dos enterócitos e liberação de toxinas (Harrington et al., 2005).

Além dos casos de diarreia, outro fator que causa grande preocupação é o surgimento de cepas que são virulentas e ao mesmo tempo resistentes aos

antimicrobianos, pois representam fator limitante no tratamento de infecções em animais e em seres humanos (Szmolka *et al.*, 2012). O uso de antimicrobianos é uma prática comum em animais que serão destinados ao abate, tanto como medida profilática ou de tratamento, quanto como promotor de crescimento. Essa prática promove a seleção de microrganismos resistentes, os quais podem comprometer tratamentos de doenças entéricas e sistêmicas, humanas ou não (Meng *et al.*, 1998; Mota *et al.*, 2005).

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi investigar a presença de genes de virulência e o perfil de sensibilidade frente aos antimicrobianos em cepas de *E. coli* isoladas de carne moída bovina *in natura*, comercializada em um município da região Noroeste do Rio Grande do Sul (RS).

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados bacterianos

Foram utilizadas 262 cepas de *E. coli*, previamente isoladas de 31 amostras de carne moída bovina *in natura*, comercializadas em um município da região Noroeste do RS, no período de novembro de 2012 a março de 2013.

O isolamento foi realizado pelo método de Número Mais Provável NMP/g e a identificação da espécie foi realizada por meio do método IMViC (teste do indol, teste de Vermelho de Metila-Voges Proskauer e teste de utilização do citrato) segundo a *American Public Health Association* (APHA) (ABREU *et al.*, 2011).

Pesquisa dos genes de virulência pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O teste molecular utilizado para detecção dos genes de virulência nas cepas de *E. coli* foi a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), descrito por Cho *et al.* (2010), com algumas modificações.

A extração do ácido desoxirribonucleico (DNA) bacteriano foi realizada através da técnica de fervura, sem tratamento químico ou enzimático (Nogueira *et al.*, 2004). Os genes pesquisados e seus referidos *primers* estão descritos na Tabela 1.

TABELA 1. Genes, *primers* e sequências utilizados na PCR para a detecção dos genes de virulência das cepas de *E. coli* isoladas da carne moída *in natura*

Linhagem	Gene	Primer	Sequência (5'-3')	Temperatura de anelamento (°C)	Referência
ETEC	<i>Est</i>	EST-F	ATTTTTMTTCTGTATTRTCTT	50	Dias <i>et al.</i> (2012)
		EST-R	CACCCGGTACARGCAGGATT		
	<i>Elt</i>	ELT-F	GGCGACAGATTATACCGTGC	50	Dias <i>et al.</i> (2012)
		ELT-R	CGGTCTCTATATTCCCTGTT		
EAEC	<i>AggR</i>	aggR-R	TGCAAAAAGAAGAAATCAACAGT	55	Chen <i>et al.</i> (2014)
		aggR-F	CAGAATCGTCAGCATCAGCTAC		
EIEC	<i>ipaH</i>	ipaH-F3	GAAAACCCTCCTGGTCCATC	55	Chen <i>et al.</i> (2014)
EPEC/EHEC	<i>eaeA</i>	ipaH-R3	GTCTGGAAGGCCAGGTAGACTT	55	Chen <i>et al.</i> (2014)
		eaeA-F	GTAACCAGGCTTCGBTCACA		
tEPEC	<i>bfpA</i>	eaeA-R	AAGGAAAAACGCTGACCCG	69	Duda-Madej <i>et al.</i> (2013)
		BfpA-F	ATTGGTGCTTGCGCTTGCTGC		
EHEC	<i>Stx1</i>	BfpA-R	GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	55	Chen <i>et al.</i> (2014)
		stx1-F	ASAGCGGTTACATTGTCTGGT		
	<i>Stx2</i>	stx1-R	CTGCGTCAGTGAGGTTCCA	55	Chen <i>et al.</i> (2014)
		stx2-F	CATGACAACGGACAGCAGTTA		
EHEC pO157	<i>hlyA</i>	stx2-R	TCTGGTCATTGTATTACCACTGAA	58	Duda-Madej <i>et al.</i> (2013)
		HlyA-F	GCTTGCAAAGCAATCCGCTGCAAATAAA		
		HlyA-R	CTGTGTCCACGAGTTGGTTGATTAG		

Para a realização das PCRs, foram feitos 26 *pools* com as amostras de DNA bacteriano, os quais foram identificados de 01 à 26. Em cada reação de PCR, utilizaram-se os seguintes reagentes: 5 µL do *pool* de DNA, 0,25 µM de cada *primer* (GBT Oligos®), 1 U de Taq DNA polimerase, 1X de Buffer/MgCl₂ (Neo Taq®), 0,3 µM de dNTP (Ludwig Biotec®), e 13,9 µL de água mili-Q® esterilizada, totalizando um volume final de 25 µL. As condições empregadas no termociclador (Biocycler®) para a realização das PCRs foram de: desnaturação inicial a 95°C por cinco min., seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por um min., anelamento com temperatura específica para cada *primer* (Tabela 1) por 45 segundos, extensão por um min. a 72°C e extensão final a 72°C por cinco min. (Cho *et al.*, 2004).

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese (Loccus Biotecnologia®) em gel de agarose 0,8% (Agargen®) com brometo de etídio (10 µg/mL) a 80V, durante 2 h em 0,5X TBE Buffer e foto documentados (Wise Doc®) após visualização das bandas em luz ultra violeta (Cho *et al.*, 2004).

Perfil de sensibilidade frente aos antimicrobianos

O perfil de sensibilidade frente aos antimicrobianos foi determinado através de metodologia convencional (difusão do disco) e os resultados foram interpretados em sensível, intermediário e resistente, seguindo o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2014). Os antimicrobianos (Sensidisc®) testados foram: amicacina (30µg), ampicilina (10µg), ampicilina/sulbactam (10/10µg), aztreonam (30µg), cefalotina (30µg), cefazolina (30µg), cefepime (30µg), ceftazidima (20µg), ceftriaxona (30µg), ciprofloxacino (5µg), gentamicina (10µg), imipenem (10µg), levofloxacino (5µg), meropenem (10µg), piperacilina/tazobactam (100/10µg) e sulfametoxazol/trimetoprima (23,75µg/1,25).

As cepas da *American Type Culture Collection* (ATCC), utilizadas para o controle de qualidade dos discos, foram: *E. coli* (25922 e 35218), *Staphylococcus aureus* (25923) e *Pseudomonas aeruginosa* (27853) (CLSI, 2014).

Ensaio fenotípico por difusão do disco para detecção de enzimas de resistência

β-lactamase de espectro ampliado (*Extended-Spectrum β-Lactamase* - ESBL)

A produção de ESBL, mediada por plasmídeos, foi investigada através do aparecimento de uma zona de sinergismo, ou zona fantasma entre o disco central de amoxicilina/ácido clavulânico (20/10µg) e um ou mais dos outros discos de antimicrobianos, aztreonam (30µg), cefepime (30µg), ceftazidima (20µg) e ceftriaxona (30µg), os quais foram dispostos a 20mm (centro a centro) do disco central (Santos, 2014).

β-lactamase carbapenemase do tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase)

A pesquisa da produção de KPC foi realizada conforme a Nota Técnica nº 01/2013 (ANVISA, 2013). Utilizou-se discos de imipenem (10µg), suplementados ou não com ácido fenilborônico (40mg/mL). Cepas que apresentaram diferença de diâmetro ≥ 5 mm entre os halos de inibição dos discos suplementados e não suplementados, foram consideradas positivas para produção de KPC.

Metalo β -lactamases (MBL)

A investigação das enzimas MBL foi realizada utilizando o método de disco combinado, com dois discos de ceftazidima (20 μ g) e dois discos de imipenem (10 μ g), impregnados e não impregnados com 4 μ L de solução de ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA 0,5mM). Uma diferença \geq a 7mm entre os halos de inibição dos discos combinados e não combinados indicaram a produção de MBL (Mayer, 2011).

β -lactamase cromossômica cefalosporinase (AmpC induzível)

A pesquisa da produção de AmpC induzível, foi realizada utilizando os discos de imipenem (10 μ g) e cefoxitina (30 μ g), os quais foram dispostos a 20mm (centro a centro) do disco central de ceftazidima (20 μ g). O achatamento do halo da cefalosporina de 3ª geração seria indicativo de teste positivo (Santos, 2014).

RESULTADOS

Dos 26 *pools* analisados, 18 (69,23%) continham genes de virulência, sendo que um grupo (3,84%) apresentou positividade para cinco genes; um grupo (3,84%) para quatro genes; três grupos (11,53%) para três genes; seis grupos (26,07%) para dois genes e sete grupos (26,92%) para um gene apenas (Tabela 2).

Dos nove genes de virulência pesquisados, o que apresentou maior positividade foi o *bfpA* (EPEC típica - tEPEC), estando presente em 12 (46,15%) dos 26 grupos; seguido de *stx1* (EHEC) em sete grupos (26,92%); *aggR* (EAEC) em seis grupos (23,07%); *stx2* (EHEC) em cinco grupos (19,23%); *hlyA* (EHEC pO157) e *eaeA* (EPEC/EHEC) em três grupos cada (11,53%) e *elt* (ETEC) em um grupo apenas (3,84%). Os genes *est* (ETEC) e *ipaH* (EIEC) não foram detectados nas cepas analisadas. Assim, EPEC foi encontrada em 14 *pools* (53,84%), e EHEC em 11 *pools* (42,30%) (Tabela 2).

TABELA 2. Genes de virulência, identificados por PCR, nos *pools* de DNA de *E. coli* isoladas de carne moída *in natura*

<i>Pools</i>	Linhagens bacterianas e seus respectivos genes de virulência								
	EHEC			EPEC		ETEC		EAEC	EIEC
	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>hlyA</i>	<i>eaeA</i>	<i>bfpA</i>	<i>est</i>	<i>elt</i>	<i>aggR</i>	<i>ipaH</i>
01	+	-	-	-	-	-	-	-	-
02	-	-	-	-	-	-	-	-	-
03	-	-	-	+	-	-	-	-	-
04	-	-	-	-	-	-	-	-	-
05	-	-	-	-	-	-	-	-	-
06	-	-	-	-	-	-	+	-	-
07	-	-	-	+	-	-	-	-	-
08	-	-	-	-	-	-	-	-	-
09	-	-	-	+	+	-	-	-	-
10	-	-	-	-	+	-	-	+	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	+	-	-	-	-
13	+	-	+	-	+	-	-	+	-
14	-	+	-	-	-	-	-	+	-
15	-	+	-	-	-	-	-	-	-
16	+	-	-	-	+	-	-	-	-
17	+	-	-	-	+	-	-	-	-
18	-	+	-	-	+	-	-	+	-
19	-	+	-	-	+	-	-	-	-
20	-	-	-	-	+	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	+	-	+	-	+	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	+	+	+	-	+	-	-	+	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	+	-	-	-	+	-	-	+	-

Quanto ao perfil de sensibilidade frente aos antimicrobianos (Tabela 3), as 262 cepas de *E. coli* apresentaram 100% de sensibilidade frente a cinco dos 17 antimicrobianos testados: aztreonam, ceftazidima, gentamicina, meropenem e piperacilina/tazobactam. Ainda, apresentaram grande sensibilidade, acima de 98%, frente à oito antimicrobianos. Entretanto, demonstraram perfil intermediário frente à cefalotina e ampicilina e resistência à ampicilina, sulfametoxazol/trimetoprima e cefalotina.

Das 262 cepas analisadas, 29 (11,06%) delas foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano; quatro (1,52%) a dois; duas (0,76%) a três; e apenas uma (0,38%) à quatro antimicrobianos, totalizando assim, três amostras (1,14%) resistentes a três ou mais antimicrobianos, considerado resistência à múltiplas drogas (MDR).

Em relação à detecção de enzimas de resistência, nenhuma cepa foi produtora de ESBL, KPC, MBL e AmpC induzível.

TABELA 3. Perfil de sensibilidade frente aos antimicrobianos, pelo método de difusão do disco, das 262 cepas de *E. coli* isoladas de carne moída *in natura*

Antimicrobiano	Sensível n (%)	Intermediário n (%)	Resistente n (%)
Amicacina 30 µg	260 (99,24)	2 (0,76)	0 (0,00)
Ampicilina 10 µg	205 (78,24)	35 (13,36)	20 (7,63)
Ampicilina/sulbactam 10/10 µg	259 (98,85)	3 (1,14)	0 (0,00)
Aztreonam 30 µg	262 (100,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
Cefalotina 30 µg	202 (77,10)	51 (16,46)	9 (3,43)
Cefazolina 30 µg	247 (94,27)	13 (4,96)	2 (0,76)
Cefepime 30 µg	260 (99,24)	2 (0,76)	0 (0,00)
Cefoxitina 30 µg	257 (98,09)	2 (0,76)	3 (1,14)
Ceftazidima 20 µg	262 (100,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
Ceftriaxona 30 µg	261 (99,62)	1 (0,38)	0 (0,00)
Ciprofloxacino 5 µg	258 (98,47)	2 (0,76)	2 (0,76)
Gentamicina 10 µg	262 (100,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
Imipenem 10 µg	261 (99,62)	1 (0,38)	0 (0,00)
Levofloxacino 5 µg	260 (99,24)	2 (0,76)	0 (0,00)
Meropenem 10 µg	262 (100,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
Piperacilina/tazobactam 100/10 µg	262 (100,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
Sulfametoxazol/Trimetoprima 23,75µg/1,25µg	243 (92,74)	5 (1,90)	14 (5,34)

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos revelaram grande porcentagem de cepas de *E. coli* isoladas da carne moída que apresentaram genes de virulência, sendo patogênicas aos humanos. Diferentemente desta pesquisa, que obteve maior percentual de *pools* positivos para gene *bfpA* (tEPEC), um estudo realizado por Alonso *et al.* (2012) demonstrou elevadas taxas de contaminação (20%) por cepas contendo gene *eaeA* (EPEC) em produtos de frango comercializados na Argentina. EHEC foram identificadas em menor percentual, com predomínio do gene *stx1*, resultado importante já que há maior relação do gene *stx2* com SHU. A maior positividade de EHEC em produtos oriundos de açougues comuns do que em produtos oriundos de lojas específicas para carne de frango, sugeriu a ocorrência de contaminação cruzada a partir de cortes bovinos (Alonso *et al.*, 2012). Na Nigéria, diversos grupos sorológicos de EHEC foram identificados em fezes, carnes de bovinos, ovinos, caprinos e suínos, enfatizando que práticas anti-higiênicas contribuem para a contaminação dos produtos cárneos (Ojo *et al.*, 2010).

Em nossa pesquisa, foram detectados os três genes que podem estar presentes em EHEC (*stx1*, *stx2* e *hlyA*), diferindo do estudo realizado por Timm *et al.* (2009) na região sul do Brasil, que não encontraram tais genes em carne moída e leite cru. Estes autores

referiram os resultados obtidos à baixa prevalência de doenças de origem alimentar causadas por EHEC no país.

Diferentemente dos resultados desta pesquisa, em estudo realizado no Egito, um elevado percentual (37,5%) de cepas de *E. coli* isoladas de produtos cárneos, continham genes de virulência com predomínio de cepas ETEC, com 15,63% de positividade. Das demais cepas virulentas, 9,38% foram de EHEC, 6,26% de EPEC e 3,13% de EIEC, sendo que, esta última não foi identificada em nosso estudo. O autor afirmou que tais linhagens nem sempre estão relacionadas com doenças, mas estão presentes em uma parte normal das populações bacterianas intestinais dos animais (Mohammed, 2012). Neste mesmo país, EHEC foram identificadas em cortes de carne, carne moída e hambúrgueres, sendo estes os produtos cárneos mais contaminados (Mohammed *et al.*, 2014).

Na Argentina, *E. coli* contendo os genes *stx1*, *stx2* e *eae* foram isoladas de fezes de gado saudável e carcaça de bovinos, ressaltando a elevada probabilidade de contaminação cruzada durante o abate e processamento. Cepas contendo o gene *aggR* (EAEC) não foram identificadas (Pizarro *et al.*, 2013), diferindo desta pesquisa. Kagambèga *et al.*, (2012) demonstraram que fezes de bovinos, frangos e suínos saudáveis em abatedouros, continham cepas EAEC, além de EHEC, EPEC e ETEC. Cepas EIEC foram identificadas somente em amostras de frango, ratificando que estes animais são reservatórios de cepas virulentas.

E. coli O157 são as mais frequentemente pesquisadas em alimentos de origem animal devido à sua elevada capacidade patogênica. Nesta pesquisa, o gene *hlyA* foi encontrado juntamente com *stx*, configurando assim, a presença de EHEC O157. Esta estirpe foi detectada em carcaças de bovinos, na Dinamarca, bem como EHEC não-O157, ambas em elevadas porcentagens (Breum, Boel, 2010). Jure *et al.* (2010) identificaram *E. coli* O157:H7 em amostras de carne moída comercializada na Argentina. *E. coli* O157 também foi encontrada em fezes e carcaças de bovinos na Sérvia (Nastasijevic *et al.*, 2009).

Chaves *et al.* (2015) relataram maior prevalência de EHEC em amostras de carne bovina oriundas de abatedouros e açougues de regiões rurais do que aqueles de regiões urbanas, indicando que práticas de higiene são mais falhas nestes locais levando à maior frequência de contaminação. Nos Estados Unidos da América (EUA), amostras de carne moída apresentaram grande contaminação por isolados contendo genes *stx* (EHEC), sendo que alguns deles continham o gene *hlyA*, entretanto não apresentaram o gene *eae*, corroborando com o presente estudo. Em contrapartida, EPEC (*eaeA*) foram identificadas

em carne moída, além de carne de frango e suína (Xia *et al.*, 2010). Estudos realizados em EHEC não O157 isoladas de alimentos, seres humanos e animais, na China, revelaram uma grande variedade sorológica das cepas e grande presença de sorotipos patogênicos, principalmente nas amostras alimentares, evidenciando que são potenciais veiculadores de doenças para os humanos (Shen *et al.*, 2015).

Vários trabalhos têm descrito a presença de *E. coli* resistentes aos antimicrobianos em alimentos cárneos e seus produtos, em leites e derivados lácteos, bem como em DECs (Alcântara *et al.*, 2012; Dias *et al.*, 2012; Nespolo *et al.*, 2014). A investigação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos em *E. coli* isoladas de animais ou seus produtos se torna importante, pois além de ser um alvo de monitoramento e identificação de genótipos emergentes, direciona as medidas de controle sanitário, tanto para a saúde humana quanto animal (Mantilla, Franco, 2012; Szmolka *et al.*, 2012).

Os resultados obtidos no presente estudo divergem de outros trabalhos, pois as taxas de resistência aos antimicrobianos foram bem inferiores. Tan *et al.* (2014) avaliaram *E. coli* isoladas de mãos de manipuladores de alimentos de escola primária, as quais foram altamente resistentes à penicilina e cloranfenicol (85,71%), Sulfametoxazol/trimetoprima, ampicilina e trimetoprima (57,14%) e ciprofloxacino (14,29%), sendo que todos os isolados foram sensíveis à gentamicina, corroborando com o obtido nesta pesquisa.

Elevada resistência à ampicilina (40%) foi identificada em EPEC isoladas de queijo minas frescal comercializado na cidade do Rio de Janeiro (Dias *et al.*, 2012). Cepas EHEC oriundas de diversas fontes (fezes diarreicas humanas, de bovinos, ovinos e frango; de infecção urinária humana; água doce; frutos do mar; produtos cárneos processados; produtos lácteos), apresentaram elevada resistência à ampicilina (75%), cefazolina (55,1%), ciprofloxacino (52,1%), gentamicina (42%), além de outros medicamentos (Selim *et al.*, 2014). Para estes pesquisadores, imipenem foi o antimicrobiano mais eficiente (71%) contra as cepas testadas, assemelhando-se aos nossos resultados.

Nespolo *et al.* (2014), no Brasil, identificaram cepas O157:H7 e não-O157 MDR em um matadouro frigorífico de bovinos, sendo ampicilina e cefalotina os antimicrobianos menos eficientes em ambos os grupos, corroborando com o presente trabalho. Já o cefepime, cefoxitina, ciprofloxacino e sulfametoxazol/trimetoprima foram os mais eficientes (Nespolo *et al.*, 2014). Cepas O157:H7 isoladas de produtos cárneos por Abongo, Momba (2009) apresentaram elevada resistência à gentamicina (80%) e eritromicina (100%), um perfil intermediário à ceftriaxona (60%), e 100% de

sensibilidade frente à amicacina. Esta elevada resistência à gentamicina e à ceftriaxona divergem dos resultados obtidos na presente pesquisa, pois estes antimicrobianos foram 100% eficientes contra as cepas estudadas, demonstrando a grande variabilidade de perfis de resistência em *E. coli*.

Neste trabalho, não foram detectadas cepas produtoras das enzimas de resistência ESBL, KPC, MBL e AmpC induzível. Entretanto, outras pesquisas revelaram a presença de *E. coli* virulentas em alimentos, e que apresentavam genes que codificam as enzimas de resistência ESBL e AmpC (Ojer-Usoz *et al.*, 2012; Stuart *et al.*, 2012; Petternel *et al.*, 2014).

Genes para a produção de ESBL foram encontrados em 84% das amostras de carne de frango orgânico e em 100% das carnes de frango provenientes de criação convencional, na Holanda (Stuart *et al.*, 2012). Na Áustria, genes para diferentes ESBL em mistura de carne bovina e suína também foram identificados (Petternel *et al.*, 2014). Ojer-Usoz *et al.* (2012) avaliaram enterobactérias presentes em carnes bovina, suína e de aves e encontraram os genes responsáveis pela produção de ESBL. *E. coli* foi o microrganismo predominante, e um elevado percentual (93,8%) de resistência a um ou mais β -lactâmicos foi encontrado.

E. coli produtoras de ESBL foram identificadas em carne de frango e em fezes de pacientes ambulatoriais que apresentaram doenças gastrointestinais, entretanto, os autores relataram não haver relação entre os diferentes genótipos encontrados, e que a carne de frango não seria o principal contribuinte para a colonização humana de cepas ESBL (Campos *et al.*, 2014).

Na Suécia, Egervärn *et al.* (2014) verificaram maior incidência de *E. coli* contendo genes de resistência para ESBL e AmpC em carnes importadas da América do Sul, principalmente nas de frango. Já na Holanda, foram identificados genes plasmidiais para a produção de β -lactamase AmpC em 12% das amostras de carne de frango e em 25% das amostras clínicas de seres humanos. Os autores relataram uma estreita relação genética entre as cepas, sugerindo a existência de uma via de transmissão de origem alimentar (Voets *et al.*, 2013).

CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou uma elevada contaminação das carnes moídas *in natura* analisadas, por DECs, principalmente por EPEC e EHEC, a qual possui elevado potencial patogênico. Sua presença nos alimentos é de extrema relevância pois representa grande risco à saúde pública.

A resistência aos antimicrobianos ampicilina, sulfametoxazol/trimetoprima e cefalotina, reflete a prática clínica do uso de antimicrobianos nas fazendas de criação de gado de corte da região. Assim, faz-se necessário maior monitoramento dos medicamentos utilizados no tratamento dos animais, bem como melhoria nas práticas higiênicas durante a manipulação a fim de evitar a contaminação dos produtos cárneos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABONGO, B. O.; MOMBA, M. N. B. Prevalence and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from meat and products sold in Amathole District, Eastern Cape Province of South Africa. *Food Microbiology*, v.26, p.173-176, 2009.

ABREU, C. O.; MERLINI, L. S.; BEGOTTI, I. L. Pesquisa de *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus* e coliformes termotolerantes em carne moída comercializada no município de Umuarama – PR. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*. V. 14, n. 1, p.19-23, 2011.

ALCÂNTARA, M. A.; GATTO, I. R. H.; KOKUSNY-ANDREANI, D. I. Ocorrência e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de micro-organismos isolados de cortes de carne bovina. *Veterinária em Foco*, v.10, n.1, p.80-92, 2012.

ALONSO, M. Z.; LUCCHESI, P. M. A.; RODRÍGUEZ, E. M.; PARMA, A. E.; PADOLA, N. L. Enteropathogenic (EPEC) and Shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) in broiler chickens and derived products at different retail stores. *Food Control*, v.23, p.351-355, 2012.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Cartilha sobre boas práticas para serviços de alimentação*. Resolução RDC nº 216, 2004. Brasília: ANVISA, 2004. 44 p. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/alimentos/cartilha_gicra_final.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2014.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota Técnica nº1/2013. *Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multirresistentes*. Brasília: ANVISA, 2013. 22 p. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ea4d4c004f4ec3b98925d9d785749fbd/Microsoft+Word+-+NOTA+T%C3%89CNICA+ENTEROBACTERIAS+17+04+2013\(1\).pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ea4d4c004f4ec3b98925d9d785749fbd/Microsoft+Word+-+NOTA+T%C3%89CNICA+ENTEROBACTERIAS+17+04+2013(1).pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em: 23 mai. 2014.

BREUM, S. Ø.; BOEL, J. Prevalence of *Escherichia coli* O157 and verocytotoxin producing *E. coli* (VTEC) on Danish beef carcasses. *International Journal of Food Microbiology*, v.141, p.90-96, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos*. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 158 p. Disponível em: <http://www.dee.ensino.eb.br/novo/arquivos/manual_doencas_transmitidas_por_alimentos_pdf.pdf>. Acesso em: 22 jun. 2013.

CAMPOS, C. B.; FENNER, I.; WIESE, N.; LENSING, C.; CHRISTNER, M.; ROHDE, H.; AEPFELBACHER, M.; FENNER, T.; HENTSCHKE, M. *International Journal of Medical Microbiology*, 7 p., 2014.

CHAVES, B. D.; ECHEVERRY, A.; MILLER, M. F.; BRASHERARS, M. M. Prevalence of molecular markers for *Salmonella* and Shiga toxigenic *Escherichia coli* (STEC) in whole-muscle beef cuts sold at retail markets in Costa Rica. *Food Control*, v.50, p.497-501, 2015.

CHEN, Q.; SHI, X.; LI, Y.; JIANG, Y.; LIN, Y.; QIU, Y.; LI, Q.; HU, Q. Rapid genetic typing of diarrheagenic *Escherichia coli* using a two-tube modified molecular beacon based multiplex real-time PCR assay and its clinical application. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, v.13, n.30, 9 p., 2014.

CHO, S. H.; OH, K. H.; KIM, S. H.; OH, H. B.; PARK, M. S. Distribution of virulence genes and their association of serotypes in pathogenic *Escherichia coli* isolates from diarrheal patients in Korea. *Public Health Res Perspect*, v.1, n.1, p.29-35, 2010.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-fourth Informational Supplement Approved Standard M100-S24*. CLSI, Wayne, Pennsylvania, USA, 2014.

DIAS, M. T.; BRICIO, S. M. L.; ALMEIDA, D. O.; OLIVEIRA, L. A. T.; FILLIPS, I.; MARIN, V. A. Molecular characterization and evaluation of antimicrobial susceptibility of enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from minas soft cheese. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.32, n.4, p.747-753, 2012.

DUDA-MADEJ, A.; GOŚCINIAK, G.; ANDRSEJEWSKA, B.; DUDA, A. K.; SOBIESZCZAŃSKA, B. Association of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) strains with persistente diarrhea in children from the region of Lower Silesia in Poland. *Polish Journal of Microbiology*, v.62, n.4, p.461-464, 2013.

EGERVÄRN, M.; BÖRGESSON, S.; BYFORS, S.; FINN, M.; KAIPE, C.; ENGLUND, S.; LINDBLAD, M. *Escherichia coli* with extended-spectrum beta-lactamases or transferable AmpC beta-lactamases and *Salmonella* on meat imported into Sweden. *International Journal of Food Microbiology*, v.171, p.8-14, 2014.

FENG, P.; WEAGANT, S. D. Bacteriological Analytical Manual – BAM: Diarrheagenic *Escherichia coli*, 8th ed., Revision A, Chapter 4, 2002. Disponível em: <<http://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm070080.htm>>. Acesso em: 4 set. 2015.

FERREIRA, R. J.; SIMM, E. M. Análise microbiológica da carne moída de um açougue da região central do município de Pará de Minas/MG, *SynThesis Revista Digital FAPAM*, v.37, p.37-61, 2012.

GOOSNEY, D. L.; DeVINNEY, R.; PFUETZNER, R. A.; FREY, E. A.; STRYNADKA, N. C.; FINLAY, B. B. Enteropathogenic *Escherichia coli* translocated intimin receptor, Tir, interacts directly with α -actinin. *Current Biology*, v.10, n.12, p.735-738, 2000.

GUTH, B. E. C. Enterotoxigenic *Escherichia coli* – An Overview. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.95, p.95-97, 2000.

HARRINGTON, S. M.; STRAUMAN, M. C.; ABE, C. M.; NATARO, J. P. Aggregative adherence fimbriae contribute to the inflammatory response of epithelial cells infected with enteroaggregative *Escherichia coli*. *Cellular Microbiology*, v.7, n.11, p.1565-1578, 2005.

JURE, M. A.; CONDORI, S.; LEOTTA, G. A.; CHINEN, I.; MILIWEBSKY, E.; ALLORI, C.; AULET, O.; CASTILLO, M. C. Detección, aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga a partir de carne molida fresca proveniente de carnicerías de Concepción, provincia de Tucumán, *Revista Argentina de Microbiología*, v.42, p.284-287, 2010.

KAGAMBÈGA, A.; MARTIKAINEN, O.; SIITONEN, A.; TRAORÉ, A. S.; BARRO, N.; HAUKKA, K. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* virulence genes in the feces of slaughtered cattle, chickens, and pigs in Burkina Faso, *Microbiology Open*, v.1, n.3, p.276-284, 2012.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*, *Nature*, v. 2, p. 123-140, 2004.

LAN, R.; ALLES, M. C.; DONOHOE, K.; MARTIEZ, M. B.; REEVES, P. R. Molecular evolutionary relationships of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *Infection and Immunity*, v.72, n.8, p.5080-5088, 2004.

LITTLE, C. L.; AMAR, C. F. L.; AWOFISAYO, A.; GRANT, K. A. Hospital-acquired listeriosis associated with sandwiches in the UK: a cause for concern. *Journal of Hospital Infection*, v.82, p.13-18, 2012.

LUNDGREN, P. U.; SILVA, J. A.; MACIEL, J. F.; FERNANDES, T. M. Perfil da qualidade higiênico-sanitária da carne bovina comercializada em feiras livres e mercados públicos de João Pessoa/PB-Brasil. *Revista Alimentos e Nutrição Araraquara*, v.20, n.1, p.113-119, 2009.

MANTILLA, S. P. S.; FRANCO, R. M. Perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* de linhagens patogênicas de *Escherichia coli* isoladas de carne bovina. *Colloquium Agrariae*, v.8, n.1, p.10-17, 2012.

MAYER, L. E. *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.: Perfil de sensibilidade e detecção de metalo- β -lactamases no hospital universitário de Santa Maria. 2011. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

MENG, J.; ZHAO, S.; DOYLE, M. P. Virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from food, animals and humans. *International Journal of Food Microbiology*, v.45, n.3, p.229-235, 1998.

MOHAMMED, M. A. M. Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from meat products sold at Mansoura city, Egypt. *Food Control*, v.25, p.159-164, 2012.

MOHAMMED, M. A.; SALLAM, K. I.; ELDALYy, E. A. Z.; AHDY, A. M.; TAMURA, T. Occurrence, serotypes and virulence genes of non-O157 Shiga toxin producing *Escherichia coli* in fresh beef, ground beef, and beef burger. *Food Control*, v.37, p.182-187, 2014.

MOTA, R. A.; SILVA, K. P. C.; FREITAS, M. F. L.; PORTO, W. J. N.; SILVA, L. B. G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência

bacteriana. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.42, n.6, p.465-470, 2005.

NASTASIJEVIC, I.; MITROVIC, R.; BUNCIC, S. The occurrence of *Escherichia coli* O157 in/on faeces, carcasses and fresh meats from cattle. *Meat Science*, v.82, p.101-105, 2009.

NATARO, J. P.; MAI, V.; JOHNSON, J.; BLACKWELDER, W. C.; HEIMER, R.; TIRREL, S.; EDBERG, S. C.; BRADEN, C. R.; MORRIS JR., J. G.; HIRSHON, J. M. Diarrheagenic *Escherichia coli* infection in Baltimore, Maryland, and New Haven, Connecticut. *Clinical Infectious Diseases*, v.43, p.402-402, 2006.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, v.11, n.1, p.142-201, 1998.

NESPOLO, N. M.; SABA, R. Z.; ROSSATELI, D. A.; FAIRBROTHER, J. M.; ROSSI JR., O. D. Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 e O26 sorbitol negativas em matadouro frigorífico de bovino e susceptibilidade a antimicrobianos. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.81, n.3, p.209-217, 2014.

NOGUEIRA, C. A. M.; MOMESSO, C. A. S.; MACHADO, R. L. D.; ALMEIDA, M. T. G.; ROSSIT, A. R. P. Desempenho de kits comerciais e protocolos laboratoriais para a extração de DNA genômico bacteriano. *Revista Panamericana de Infectologia*, v.6, n.2, p.35-38, 2004.

OJER-USOZ, E.; GONZÁLEZ, D.; VITAS, A. I.; LEIVA, J.; GARCÍA-JALÓN, I.; FEBLES-CASQUERO, A.; ESCOLANO, M. S. Prevalence of extended-spectrum B-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in meat products sold in Navarra, Spain. *Meat Science*, v.93, p.316-321, 2013.

OJO, O. E.; AJUWAPE, A. T. P.; OTESILE, E. B.; OWOADE, A. A.; OYEKUNLE, M. A.; ADETOSOOYE, A. I. Potentially zoonotic shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups in the faeces and meat of food-producing animals in Ibadan, Nigeria. *International Journal of Food Microbiology*, v.142, p.214-221, 2010.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; MENDONÇA, A. T.; PICCOLI, R. H. Condições higiênico-sanitárias de máquinas de moer carne, mãos de manipuladores e qualidade microbiológica da carne moída. *Revista Ciência e Agrotecnologia*, v.32, n.6, p.1893-1898, 2008.

PETTERNEL, C.; GALLER, H.; ZARFEL, G.; LUXNER, J.; HAAS, D.; GRISOLD, A. J.; REINTHALER, F. F.; FEIERL, G. Isolation and characterization of multidrug-resistant bacteria from minced meat in Austria. *Food Microbiology*, v.44, p.41-46, 2014.

PIZARRO, M. A.; OROZCO, J. H.; DEGARBO, S. M.; CALDERÓN, A. E.; NARDELLO, A. L.; LACIAR, A.; RÜTTLER, M. E. Virulence profiles of shiga toxin-producing *Escherichia coli* and other potentially diarrheagenic *E. coli* of bovine origin, in Mendoza, Argentina. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.44, n.4, p.1173-1180, 2013.

SANTOS, S. O. Estudo de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. multirresistentes do Hospital Universitário de Santa Maria. 2014. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

SELIM, S. A.; AHMED, S. F.; AZIZ, M. H. A.; ZAKARIA, A. M.; KLENA, J. D.; PANGALLO, D. Prevalence and characterization of shiga-toxin O157:H7 and non-O157:H7 enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolated from different sources. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, p. 3834-3842, 2004.

SHEN, J.; RUMP, L.; JU, W.; SHAO, W.; ZHAO, S.; BROWN, E.; MENG, J. Virulence characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from food, humans and animals. *Food Microbiology*, v.50, p.20-27, 2015.

SOUZA, T. M.; CUNHA NETO, A.; HERNANDES, T.; SOUTO, P. C. S. Microrganismos patogênicos e indicadores de condições higiênico-sanitária em carne moída comercializada na cidade de Barra do Garças, MT. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.6, n.2, p.124-130, 2012.

STUART, J. C.; MUNCKHOF, T.; VOETS, G.; SCHARRINGA, J.; FLUIT, A.; HALL, M. L. V. Comparison of ESBL contamination in organic and conventional retail chicken meat. *International Journal of Food Microbiology*, v.154, p.212–214, 2012.

SZMOLKA, A.; ANJUM, M. F.; RAGIONE, R. M. L.; KASZANYITZKY, É.; NAGI, B. Microarray based comparative genotyping of gentamicin resistant *Escherichia coli* strains from food animals and humans. *Veterinary Microbiology*, v.156, p.110–118, 2012.

TAN, S. L.; LEE, H. Y.; MAHYUDIN, N. A. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from food handler's hands. *Food Control*, v.44, p.2013-207, 2014.

TIMM, C. D.; CONCEIÇÃO, F. R.; MENIN, A.; CONCEIÇÃO, R. C. S.; DELLAGOSTIN, O. A.; ALEIXO, J. A. G. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in southern Brazil isolated from ground beef and raw milk. *Ciência Animal Brasileira*, v.10, n.2, p.641-649, 2009.

VOETS, G. M.; FLUIT, A. C.; SCHARRINGA, J.; SCHAPENDONK, C.; MUNCKHOF, T.; HALL, M. L. V.; STUART, J. C. Identical plasmid AmpC beta-lactamase genes and plasmid types in *E. coli* isolates from patients and poultry meat in the Netherlands. *International Journal of Food Microbiology*, v.167, p.359–362, 2013.

XIA, X.; MENG, J.; McDERMOTT, P. F.; AYERS, S.; BLICKENSTAFF, K.; TRAN, T.; ABBOT, J.; ZHENG, J.; ZHAO, S. Presence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and other potentially diarrheagenic *E. coli* strains in retail meats. *Applied and Environmental Microbiology*, v.76, n.6, p.1709-1717, 2010.

3 CONCLUSÃO

- Foi identificado grande percentual de *pools* de DNA de *E. coli*, isoladas de carne moída *in natura*, contendo genes de virulência;
- Das cinco linhagens de DECs pesquisadas, quatro foram identificadas, sendo as mais prevalentes EPEC e EHEC;
- Os genes *ipaH* (EIEC) e *elt* (ETEC) não foram detectados nas *E. coli* em estudo;
- O maior índice de resistência bacteriana foi encontrado frente à ampicilina, sulfametoxazol/trimetoprima e cefalotina;
- Um pequeno percentual (1,14%) de cepas com perfil de MDR foi identificado;
- Não foram detectadas, fenotipicamente, enzimas de resistência ESBL, KPC, MBL e AmpC cromossômica;
- Assim, melhorias no controle higiênico-sanitário devem ser realizadas, bem como a conscientização sobre o uso indiscriminado de medicamentos na criação de gado de corte, a fim de evitar a contaminação dos produtos cárneos durante sua manipulação e processamento, principalmente por bactérias patogênicas e resistentes aos antimicrobianos.

REFERÊNCIAS

ALIKHANI, M. Y. et al. Prevalence and antibiotic pattern of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from adolescents and adults in Hamedan, Western Iran. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 42-47, Mar. 2013.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Cartilha sobre boas práticas para serviços de alimentação**. Resolução RDC nº 216, 2004. Brasília: ANVISA, 2004. 44 p. Disponível em:
<http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/alimentos/cartilha_gicra_final.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2014.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota Técnica nº1/2013. **Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multirresistentes**. Brasília: ANVISA, 2013. 22 p. Disponível em:
<[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ea4d4c004f4ec3b98925d9d785749fbd/Microsoft+Word+-NOTA+T%C3%89CNICA+ENTEROBACTERIAS+17+04+2013\(1\).pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ea4d4c004f4ec3b98925d9d785749fbd/Microsoft+Word+-NOTA+T%C3%89CNICA+ENTEROBACTERIAS+17+04+2013(1).pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em: 23 mai. 2014.

BRONER, S. et al. Sociodemographic inequalities and outbreaks of foodborne diseases: An ecologic study. **Food Control**, v. 21, p. 947–951, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 83, de 21 de novembro de 2003. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Carne Bovina em Conserva (Corned Beef) e Carne Moída de Bovino. **Diário Oficial da União**. Brasília, 2003. Anexo II. 4 p. Disponível em:
<<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=4317>>. Acesso em: 01 jun. 2013.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2001. 68 p. Disponível em:
<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 20 jun. 2013.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 158 p. Disponível em:
<http://www.dee.ensino.eb.br/novo/arquivos/manual_doencas_transmitidas_por_alimentos_pdf.pdf>. Acesso em: 22 jun. 2013.

CHATTAWAY, M. A. et al. Investigating the link between the presence of enteroaggregative *Escherichia coli* and infectious intestinal disease in the United Kingdom, 1993 to 1996 and 2008 to 2009. **Euro Surveill**, v. 18, n. 37, 2013.

- CHEN, Q. et al. Rapid genetic typing of diarrheagenic *Escherichia coli* using a two-tube modified molecular beacon based multiplex real-time PCR assay and its clinical application. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 13, n. 30, 9p., 2014.
- CHO, S. et al. Distribution of virulence genes and their association of serotypes in pathogenic *Escherichia coli* isolates from diarrheal patients in Korea. **Public Health Res Perspect**, v. 1, n. 1, p. 29-35, 2010.
- COSTA, M. M. et al. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 1, p. 5-8, jan./mar. 2006.
- DEHKORDI, F. S. et al. Virulence factors, serogroups and antimicrobial resistance properties of *Escherichia coli* strains in fermented dairy products. **BMC Research Notes**, v. 7, n. 217, p. 1-8, 2014.
- DIAS, M. T. et al. Molecular characterization and evaluation of antimicrobial susceptibility of enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from minas soft cheese. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n. 4, p. 747-753, out./dez. 2012.
- DUTTA, S. et al. Trends in the prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* among hospitalized diarrheal patients in Kolkata, India. **Plos One**, v. 8, n. 2, p. 1-5, Feb. 2013.
- FENG, P.; WEAGANT, S. D. **Bacteriological Analytical Manual – BAM: Diarrheagenic *Escherichia coli***, 8th ed., Revision A, Chapter 4, 2002. Disponível em: <<http://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm070080.htm>>. Acesso em: 4 set. 2015.
- FERREIRA, R. J.; SIMM, E. M. Análise microbiológica da carne moída de um açougue da região central do município de Pará de Minas/MG, **SynThesis Revista Digital FAPAM**, n. 37, p. 37-61, abr. 2012.
- FRANÇA, F. L. S. et al. Genotypic and phenotypic characterisation of Enteroaggregative *Escherichia coli* from children in Rio de Janeiro, Brazil. **Plos One**, v. 8, n. 7, p. 1-9, Jul. 2013.
- GARCIA, D. P.; DUARTE, D. A. Perfil epidemiológico de surtos de doenças transmitidas por alimentos ocorridos no Brasil. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 6, n. 1, p. 545-554, 2014.
- GOOSNEY, D. L. et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* translocated intimin receptor, Tir, interacts directly with α -actinin. **Current Biology**, v. 10, n. 12, 735-738, Jun. 2000.
- GUTH, B. E. C. Enterotoxigenic *Escherichia coli* – An Overview. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 95-97, 2000.

- HARRINGTON, S. M. et al. Aggregative adherence fimbriae contribute to the inflammatory response of epithelial cells infected with enteroaggregative *Escherichia coli*. **Cellular Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 1565-1578, 2005.
- HERZOG, K. et al. Diarrheagenic enteroaggregative *Escherichia coli* causing urinary tract infection and bacteremia leading to sepsis. **Infection**, v. 42, p. 441-444, 2014.
- JANUZZI, W. A. et al. Detecção genética e prevalência de linhagens enteropatogênicas de *Escherichia coli* em amostras fecais diarreicas de crianças em Juiz de Fora. **Principia – Caminhos da Iniciação Científica**, v. 1, p. 15-28, 2009.
- JURE, M. A. et al. Detección, aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga a partir de carne molida fresca proveniente de carnicerías de Concepción, provincia de Túcumán. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 42, p. 284-287, 2010.
- KAGAMBÈGA, A. et al. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* virulence genes in the feces of slaughtered cattle, chickens, and pigs in Burkina Faso, **Microbiology Open**, v. 1, n. 3, p. 276-284, 2012.
- KAPER, J. B. et al. Pathogenic *Escherichia coli*, **Nature**, v. 2, p. 123-140, 2004.
- KONEMAN, E. W. et al. **Diagnóstico Microbiológico**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2008. 1780 p.
- LAN, R. et al. Molecular evolutionary relationships of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 8, p. 5080-5088, Sept. 2004.
- LEVINE, M. M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohemorrhagic, and Enteroadherent. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 155, n. 3, Mar. 1987.
- LITTLE, C. L. et al. Hospital-acquired listeriosis associated with sandwiches in the UK: a cause for concern. **Journal of Hospital Infection**, v. 82, p. 13-18, 2012.
- LIU, Y. et al. Phylogenetic group, virulence factors and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* associated with bovine mastitis. **Research in Microbiology**. Article in press., 2014.
- LUNDGREN, P. U. et al. Perfil da qualidade higiênico-sanitária da carne bovina comercializada em feiras livres e mercados públicos de João Pessoa/PB-Brasil. **Revista Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 20, n. 1, p. 113-119, jan./mar. 2009.
- MANTILLA, S. P. S.; FRANCO, R. M. Perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* de linhagens patogênicas de *Escherichia coli* isoladas de carne bovina. **Colloquium Agrariae**, v. 8, n. 1, p. 10-17, jan./jun. 2012.
- MARCHI, D. M. et al. Ocorrência de surtos de doenças transmitidas por alimentos no município de Chapecó, Estado de Santa Catarina, Brasil, no período de 1995 a 2007. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 3, p. 401-407, jul./set. 2011.

- MENG, J.; ZHAO, S.; DOYLE, M. P. Virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from food, animals and humans. **International Journal of Food Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 229-235, Dec. 1998.
- MOHAMMADI, P. et al. Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from raw milk in Kermanshah, Iran. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 42-47, Mar. 2013.
- MOHAMMED, A. M. et al. Occurrence, serotypes and virulence genes of non-O157 Shiga toxin producing *Escherichia coli* in fresh beef, ground beef, and beef burger. **Food Control**, v. 37, p. 182-187; 2014.
- MOHAMMED, M. A. M. Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from meat products sold at Mansoura city, Egypt. **Food Control**, v. 25, p. 159-164, 2012.
- MOMTAZ, H. et al. Molecular characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ruminant and donkey raw milk samples and traditional dairy products in Iran. **The Scientific World Journal**, 13 p., 2012.
- MOMTAZ, H. et al. Incidence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups in ruminant's meat. **Meat Science**, v. 95, p. 381-388, 2013.
- MOTA, R. A. et al. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, n. 6, p.465-470, 2005.
- MURRAY, P. R. et al. **Microbiologia Médica**. 7. Ed. Rio de Janeiro: Ed. Elsevier, 2014. 888 p.
- NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.
- NATARO, J. P. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* infection in Baltimore, Maryland, and New Haven, Connecticut. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, p. 402-402, 2006.
- OLIVEIRA, M. M. M. et al. Condições higiênic-sanitárias de máquinas de moer carne, mãos de manipuladores e qualidade microbiológica da carne moída. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 6, p. 1893-1898, nov./dez. 2008.
- PETER-GETZLAFF, S. et al. Detection of AmpC beta-lactamase in *Escherichia coli*: comparison of three phenotypic confirmation assays and genetic analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 8, p. 2924–2932, Aug. 2011.
- PETTERNEL, C. et al. Isolation and characterization of multidrug-resistant bacteria from minced meat in Austria. **Food Microbiology**, v. 44, p. 41-46, 2014.
- PIZARRO, M. A. et al. Virulence profiles of shiga toxin-producing *Escherichia coli* and other potentially diarrheagenic *E. coli* of bovine origin, in Mendoza, Argentina. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1173-1180, 2013.

SOUZA, T. M. et al. Microrganismos patogênicos e indicadores de condições higiênico-sanitária em carne moída comercializada na cidade de Barra do Garças, MT. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 6, n. 2, p. 124-130, 2012.

STUART, J. C. et al. Comparison of ESBL contamination in organic and conventional retail chicken meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 154, p. 212–214, 2012.

SZMOLKA, A. et al. Microarray based comparative genotyping of gentamicin resistant *Escherichia coli* strains from food animals and humans. **Veterinary Microbiology**, v. 156, p. 110–118, 2012.

VOETS, G. M. et al. Identical plasmid AmpC beta-lactamase genes and plasmid types in *E. coli* isolates from patients and poultry meat in the Netherlands. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, p. 359–362, 2013.

WELKER, C. A. D. et al. Análise microbiológica de alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 1, p. 44-48, jan./mar. 2010.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial resistance: global report on surveillance**, 2014. 234 p. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf>. Acesso em: 25 jan. 2015.

XIA, X. et al. Presence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and other potentially diarrheagenic *E. coli* strains in retail meats. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 6, p. 1709-1717, Mar. 2010.