

PERFIL DE VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DE *ESCHERICHIA COLI* PRODUTORA DE TOXINA DE SHIGA (STEC) E MULTIRRESISTENTES PROVENIENTES DE MATADOUROS DO SUL DO RIO GRANDE DO SUL

ERIC HIROYOSHI OSSUGUI¹; ISABELA SCHNEID KRONING²; TASSIANA RAMIRES²; GRACIELA VÖLZ LOPES²; WLADIMIR PADILHA DA SILVA³

¹Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – eric.ossugui@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – isabelaschneid@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – tassianaramires@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – graciela@yahoo.com.br

⁴Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – wladimir.padilha2011@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Escherichia coli diarreiogênicas (DEC) podem ser classificados em seis patotipos, sendo *E. coli* produtora de Toxina de Shiga (STEC), o mais virulento (KAPER et al., 2004). Ao mesmo tempo em que são os agentes responsáveis por causar milhões de Doenças de Veiculação Hídrica e Alimentar (DVHA), estas bactérias são consideradas os maiores reservatórios de genes de resistência a antimicrobianos e, conseqüentemente, os maiores disseminadores desses genes no meio ambiente (POIREL et al., 2018).

A bovinocultura de corte no Brasil e no Rio Grande do Sul é uma importante atividade econômica (ABIEC, 2022). O consumo de carne *in natura* ou malpassada, ou de outros alimentos contaminados com fezes de bovinos portando STEC é um problema de saúde pública, pois, além desse animal ser o reservatório natural deste patotipo, essa importante bactéria patogênica pode também ser resistentes a antimicrobianos de uso na terapêutica humana (MULOI et., 2018).

Projeta-se que em 2050, mais de 10 milhões de mortes anuais serão por infecções causadas por microrganismos com resistência a antimicrobianos (WHO, 2021), sendo que a cadeia produtiva de alimentos é uma das possíveis rotas pela qual os genes de resistência são rapidamente disseminados (MULOI et., 2018). Diante do exposto, o presente estudo tem como objetivo caracterizar fenotipicamente e genotipicamente o perfil de virulência e de resistência a antimicrobianos de isolados de *E. coli* provenientes de amostras de carcaça e fezes de bovinos abatidos em matadouros localizados em Pelotas-RS.

2. METODOLOGIA

O isolamento e confirmação de *E. coli* foram realizados pelo método tradicional, seguindo a ISO/TS 13136 (ISO, 2012). Foram avaliados 100 animais, em quatro pontos de amostragem, totalizando 400 amostras. As coletas de superfícies de carcaças de um mesmo bovino foram realizadas nas etapas de pós-sangria, pós-evisceração e pós-lavagem final, com esponja esterilizada umedecida em solução salina (0,85%). Também foram coletadas 100 amostras de fezes destes animais, com o auxílio de suabes em meio *Cary Blair*.

A caracterização genotípica para virulência de STEC foi realizada de acordo com Paton; Paton (1998) e Morin et al. (2004), através da pesquisa de genes marcadores de virulência (*stx1*, *stx2*, *eaeA*, *hlyA*, *rfbE* e *flicH7*), além dos genes marcadores para os sorogrupos denominados Big Six, segundo Toro et al. (2013).

A caracterização fenotípica para avaliar a susceptibilidade a antimicrobianos (amoxicilina, ceftiofur, ciprofloxacina, cloranfenicol, tetraciclina e sulfametoxazol/trimetoprim), foi realizada de acordo com a metodologia de diluição em ágar, segundo CLSI (2015). O perfil genotípico para os mecanismos de resistência para Beta-lactâmicos (*blaTEM*, *blaSHV*, *blaCTX-M*, *blaCYM-2*), tetraciclina (*tetA*, *tetB*), cloranfenicol (*cat1*, *cat2*, *floR*), sulfonamidas (*sul1*, *sul2*, *sul3*), trimetoprim (*dhfr1*, *dhfr5*) e quinolonas (*qnrA*, *qnrB*), foi realizado de acordo com os autores (MAYNARD et al., 2003; FRECHS; CHWARZ, 2000).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos 358 isolados de *E. coli*. Destes, 43 (43/358, 12%) foram classificados como STEC. Dentre os 43 isolados, seis (6/358, 11,76%) portavam o gene *stx1* e 13 (13/358, 25,49%) o gene *stx2*, sendo que cinco (5/358, 9,8%) portavam os dois genes simultaneamente. Em 31 STEC (31/43, 72,09%) foi detectado o gene *hlyA*, que codifica uma enterohemolisina, e em cinco STEC (5/43, 11,62%), também foi detectado o gene *eaeA*, responsável pela lesão A/E, e que os classifica como *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC), demonstrando a virulência potencial destes isolados (KAPER et al., 2004). Quanto aos sorotipos, nenhum isolado apresentou os genes *rfbE* e *flicH7*, que são marcadores de STEC O157:H7. Já o sorotipo O111 foi identificado em dois (2/43, 4,65%) isolados, sendo que esse sorotipo é responsável por 10,7% dos casos de infecção por STEC nos Estados Unidos da América (CDC, 2019). Os resultados obtidos são superiores a outros estudos brasileiros (STELLA et al., 2020) e mais próximos dos resultados de estudos realizados na Argentina (CAPPS et al., 2021).

Quanto à resistência a antimicrobianos, 51 isolados (51/358, 14%) foram resistentes a pelo menos uma classe dos antimicrobianos testados, sendo 10 (10/358, 2,8%) considerados multirresistentes. Destes, foram identificados 14 STEC resistentes (14/51, 27,45%), e dois (2/51, 3,9%) multirresistentes. Os principais perfis fenotípicos encontrados foram: tetraciclina (16/51, 31,37%), amoxicilina + tetraciclina (11/51, 21,56%), amoxicilina (8/51, 15,68%) e amoxicilina + cloranfenicol + tetraciclina (7/51, 13,72%). Estes resultados são inferiores aos resultados obtidos por Martínez-Vázquez et al. (2021), no México, e essa diferença de resultados pode ser devida aos diferentes planos de ação adotados por cada país para o controle da resistência aos antimicrobianos (TABARAN et al., 2022).

Genes de resistência a antimicrobianos foram identificados em 14 isolados (14/51, 27,45%). Meselle et al. (2022) também identificaram baixa ocorrência de genes de resistência em STEC isolados em bovinos na Austrália, o que pode ser explicado pelo fato de existirem mecanismos de resistência mediados por outros genes diferentes dos avaliados, resistência cruzada, mutação, entre outros, que não foram avaliados no presente estudo (BLAIR et al., 2015).

4. CONCLUSÕES

Os isolados de STEC provenientes de carcaças e fezes de bovinos abatidos em Pelotas, RS, apresentam genes de virulência, bem como resistência e multirresistência a diversas classes de antimicrobianos utilizados na medicina humana. Dessa forma, a circulação desses microrganismos na cadeia produtiva de carnes indica uma ameaça para a saúde pública, tanto pelo risco de DVHA, quanto

pela dificuldade de debelar infecções por esses microrganismos apresentando resistência a antimicrobianos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BLAIR, J. M.; WEBBER, M. A.; BAYLAY, A. J.; OGBOLU, D. O.; PIDDOCK, L. J. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nat Rev Microbiol.** 13(1):42-51. 2015.

Brazilian Beef Exporters Association (ABIEC). **Beef Report - 2022**. Acessado em 22 Ago 2023. Disponível: <https://www.abiec.com.br/en/publicacoes/beef-report-2022-2/>.

CAPPS, K. M.; LUDWIG, J. B.; SHRIDHAR, P. B.; SHI, X.; ROBERTS, E.; DEBROY, C.; CERNICCHIARO, N.; PHEBUS, R. K.; BAI, J.; NAGARAJA, T. G. Identification, Shiga toxin subtypes and prevalence of minor serogroups of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in feedlot cattle feces. **Sci Rep.** 21;11(1):8601. 2021.

Center for Disease Control and Prevention (CDC). **National enteric disease surveillance: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) annual report, 2016**. Acessado em: 22 Ago. 2023. Disponível em: <https://www.cdc.gov/ecoli/surv2016/index.html>.

Clinical And Laboratory Standards Institute (CLSI). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition**. CLSI document M07-A10. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA. 2015.

FRECH, G.; SCHWARZ, S. Molecular analysis of tetracycline resistance in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhimurium, Enteritidis, Dublin, Choleraesuis, Hadar and Saintpaul: Construction and application of specific gene probes. **Journal of Applied Microbiology.** 89, 633–641. 2000.

International Organization for Standardization – ISO/TS 13136. **Microbiology of food and animal feed**. International Organization for Standardization: Geneve, Switzerland, 2012.

KAPER, J.; NATARO, J.; MOBLEY, H. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Review Microbiology.** 2, 123–140, 2004.

MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, A. V.; VÁZQUEZ-VILLANUEVA, J.; LEYVA-ZAPATA, L. M.; BARRIOS-GARCÍA, H.; RIVERA, G.; BOCANEGRA-GARCÍA, V. Multidrug Resistance of *Escherichia coli* Strains Isolated from Bovine Feces and Carcasses in Northeast Mexico. **Front Vet Sci.** 23;8:643802. 2021.

MAYNARD, C.; FAIRBROTHER, G. M.; BEKAL, S.; SANSCHAGRIN, F.; LEVESQUE, R. C.; BROUSSEAU, R.; MASSON, L.; LARIVIERE, L.; HAREL, J. Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149: K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs. **Antimicrob. Agents Chemother.** 47, 3214-3221. 2003.

MESSELE, Y. E.; ALKHALLAWI, M.; VELTMAN, T.; TROTT, D. J.; MCMENIMAN, J. P.; KIDD, S. P.; LOW, W. Y.; PETROVSKI, K. R. Phenotypic and Genotypic Analysis of Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Recovered from Feedlot Beef Cattle in Australia. **Animals** (Basel). 12(17):2256. 2022.

MORIN, N. J.; GONG, Z.; LI, X. F. Reverse transcription-multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio cholerae* O1, and *Salmonella* Typhi. **Clin Chem.** 50, 2037–2044. 2004.

MULOI, D.; WARD, M. J.; PEDERSEN, A. B.; FÈVRE, E. M.; WOOLHOUSE, M. E. J.; VAN BUNNIK, B. A. D. Are Food Animals Responsible for Transfer of Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* or Their Resistance Determinants to Human Populations? A Systematic Review. **Foodborne Pathogens Disease.** 15(8):467-474, 1455, 2018.

PATON, A. W.; PATON, J. C. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. **J Clin Microbiol.** 36(2):598-602. 1998.

POIREL, L.; MADEC, J. Y.; LUPO, A.; SCHINK, A. K.; KIEFFER, N.; NORDMANN, P.; SCHWARZ, S. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. **Microbiology Spectrum.** 6(4), 2018.

STELLA, A. E.; PÁDUA, G. T.; MOREIRA, C. N.; MARTINS, P. S.; MONTES, M. C.; LIMA, T. F.; SILVEIRA, A. V. B. Frequency of antibiotic resistant enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in bovine carcasses at a slaughterhouse in Brazil. **Research, Society and Development.** 9(7):1-15. 2020.

TABARAN, A.; SOULAGEON, V.; CHIRILA, F.; REGET, O. L.; MIHAIU, M.; BORZAN, M.; DAN, S. D. Pathogenic *E. coli* from Cattle as a Reservoir of Resistance Genes to Various Groups of Antibiotics. **Antibiotics** (Basel). 11(3):404. 2022.

TORO, M.; NAJJAR, M. B.; JU, W.; BROWN, E.; ZHAO, S.; MENG, J. Molecular serogrouping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* using suspension array. **Foodborne Pathogens and Disease,** 10(5), 478–480. 2013.

World Health Organization. **Antimicrobial Resistance.** 2021. Acessado em: 22 Ago. 2023. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>>