

NATÁLIA LOURENÇO ROMANHOLI

**PRESENÇA E PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS DE
ESCHERICHIA COLI DIARREIOGÊNICAS OBTIDAS DE FEZES DE SUÍNOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

R758p
2018

Romanholi, Natália Lourenço, 1990-

Presença e perfil de resistência a antibióticos de *Escherichia coli* diarreiogênicas obtidas de fezes de suínos / Natália Lourenço Romanholi. – Viçosa, MG, 2018.
xi, 64 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Ricardo Seiti Yamatogi.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Escherichia coli*. 2. Antibióticos. 3. Drogas - Resistência em micro-organismos. 4. Carne de porco. 5. Alimentos de origem animal - Contaminação. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.0896926

NATÁLIA LOURENÇO ROMANHOLI

PRESENÇA E PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS DE
ESCHERICHIA COLI DIARREIOGÊNICAS OBTIDAS DE FEZES DE SUÍNOS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

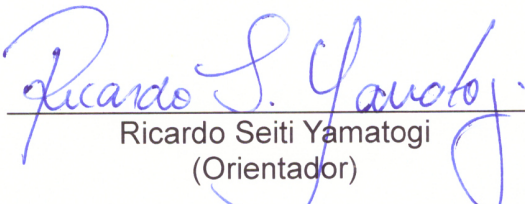
APROVADA: 19 de outubro de 2018.



Marcus Vinícius Coutinho Cossi



Luís Augusto Nero
(Coorientador)



Ricardo Seiti Yamatogi
(Orientador)



facebook.com/blogclubedamafalda



clubedamafalda.blogspot.com

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente à Deus, pela sabedoria, saúde, e por ser a maior fonte de força nos momentos mais difíceis da trajetória até aqui.

Aos meus pais, Antônio e Nilce, pelo grande incentivo e amor incondicionais.

Ao meu orientador Ricardo Seiti Yamatogi, pelo total apoio, exemplo, amizade, compreensão e confiança depositada em todas as etapas do trabalho.

Ao coorientador, Luis Augusto Nero, pelo incentivo e ensinamentos.

Ao meu namorado Laércio, por me proporcionar diversos momentos de felicidade e paz, em meio a tanto caos entre o trabalho e os estudos.

Aos colegas que participaram das coletas: Bruna, Everton e João, pelo auxílio e pelos momentos de descontração nos vários dias de trabalho juntos.

Aos demais amigos do laboratório de inspeção, pela amizade e ajuda: Bruno, Cibele, Danilo, Luana, Milimani, Natália, Rafaela, Valéria, Mallu, Kadja, Juliana.

Ao estagiário Igor, pela disposição e auxílio nos finais de semana em que trabalhei em minha última etapa. Foram dias cansativos, mas sua companhia os tornaram com certeza mais divertidos.

Aos colegas de trabalho do SIF 1629, Janderson, José Figueiredo, Maria Cecília e Joyce, e aos amigos da UTRA-Viçosa/SFA, Augusto e Marcelo, pela compreensão e torcida para que tudo desse certo.

Ao frigorífico, que nos concedeu a realização das coletas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais - FAPEMIG, pelo financiamento do projeto, e à CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 1. Revisão Bibliográfica	3
1. Mercado da carne suína	4
2. Importância da carne suína em surtos alimentares	5
3. <i>Escherichia coli</i>	9
3.1 <i>E. coli</i> diarreiogênicas	10
3.2 Grupos filogenéticos de <i>E. coli</i>	19
3.3 Resistência a antibióticos.....	20
4. Referências	23
OBJETIVOS	36
Objetivo geral	36
Objetivos específicos	36
ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	38
RESUMO.....	40
1. INTRODUÇÃO.....	42
2. MATERIAIS E MÉTODOS	43
2.1 Coleta de amostras	43
2.2 Isolamento de <i>Escherichia coli</i>	44
2.3 Identificação dos patótipos através da Reação em Cadeia da Polimerase – PCR multiplex	44
2.4 Determinação de grupos filogenéticos de <i>E. coli</i> diarreiogênicas	46

2.5	Triagem da resistência a antibióticos dos isolados de <i>Escherichia coli</i>	47
2.6	Análise Estatística.....	48
3.	RESULTADOS	48
3.1	Frequência	48
3.2	Filogrupos	48
3.3	Resistência a antibióticos.....	49
4.	DISCUSSÃO.....	50
4.3	Frequência	50
4.4	Filogrupos	52
4.5	Resistência a antibióticos.....	53
5.	CONCLUSÃO	56
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Comparação dos índices de resistência dos diferentes grupos de *E. coli* de suínos Pág. 49

FIGURA 2. PCR Multiplex para caracterização do filogrupo para os marcadores genéticos GadA, ChuA, YjaA, TspE4C2. M-Marcador de peso molecular de 100bp, 2 a 16 amostras testadas..... Pág. 52

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Patotipos de <i>E. coli</i> e marcadores de virulência frequentemente utilizados para identificação	Pág. 44
TABELA 2. Relação de primers conforme ARANDA et al. (2007) para identificação dos patotipos de <i>E. coli</i>	Pág. 45
TABELA 3. Primers conforme DOUMITH et al. (2012) para a determinação do grupo filogenético	Pág. 46
TABELA 4. Frequência de <i>E. coli</i> diarreiogênicas, STEC e EPEC encontradas em abatedouro-frigorífico de suínos da região da Zona da Mata, Minas Gerais, Brasil	Pág. 48
TABELA 5. Frequência dos filogrupos de Clermont et al. (2000) a partir dos isolados de STEC e EPEC suínos	Pág. 49
TABELA 6. Perfil de resistência aos antibióticos testados dos isolados de <i>E. coli</i> diarreiogênicas de suínos	Pág. 50

RESUMO

ROMANHOLI, Natália Lourenço, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2018. **Perfil de resistência a antibióticos de isolados de *Escherichia coli* diarreiogênica oriundos de fezes de suínos.** Orientador: Ricardo Seiti Yamatogi. Coorientador: Luís Augusto Nero.

A cadeia de produção suína tem grande importância na economia brasileira, incluindo o país no ranking dos maiores exportadores mundiais da carne. Produtos a base de carne suína são consumidos mundialmente e podem carrear diferentes perigos biológicos, como cepas patogênicas de *Escherichia coli*, responsável por uma variedade de sintomas em humanos, podendo levar à diarreia sanguinolenta e insuficiência renal. *E. coli* é caracterizada por diferentes patótipos baseados na presença de diferentes fatores de virulência, sendo *eae* e *stx* os principais genes de virulência em isolados de alimentos. O objetivo desse trabalho foi o isolamento e caracterização de isolados de *E. coli* diarreiogênica em suínos, assim como análise filogenética e avaliação da resistência a antibióticos dos isolados. Amostras de fezes de 120 suínos de terminação obtidos de abatedouro-frigorífico localizados na região da Zona da Mata, no Estado de Minas Gerais, foram obtidas com a técnica de swab. Os isolados confirmados bioquimicamente como *E. coli* foram submetidos a PCR multiplex para detecção de *stx1/stx2*, *eae*, *ipaH* e *aggR* visando a identificação dos patótipos. *E. coli* diarreiogênica foram identificados em 12 (10%) suínos, e 17 isolados foram confirmados pela PCR multiplex, sendo 70,6% EPEC (12/17) e 29,4% STEC (5/17). Um total de 37 isolados de suínos (patogênicos e não patogênicos) foram analisados quanto ao perfil de resistência à antibióticos, sendo que 100% das amostras de *E. coli* foram multirresistentes aos antibióticos testados, ou seja, foram resistentes a três ou mais classes de antibióticos e ainda, todos os isolados apresentaram resistência nas concentrações testadas, a ampicilina, tiamulina, ácido nalidíxico e tetraciclina. Constatou-se também que não houve diferença nos perfis de resistência entre os isolados diarreiogênicos e comensais. Os isolados positivos para os patótipos foram caracterizados para identificação de filogrupo de Clermont (A, B1, B2, e D) baseado em um segundo PCR multiplex, objetivando a detecção dos genes *chuA*, *yjaA*, *TspE4C2* e *gadA*.

Com base na caracterização do filogruppo, os isolados de EPEC e STEC foram categorizados como A (23,5%), B1 (23,5%) e B2 (52,9%). Cepas patogênicas de *E. coli* pertencentes ao filogruppo B2 e D são altamente virulentas, sendo uma preocupação em qualquer cadeia alimentar. A presença de *E. coli* patogênica em fezes de suínos é preocupante, uma vez que pode ocorrer uma contaminação cruzada no abate, resultando em contaminação de produtos suínos destinados ao consumo humano. Além disso, a presença de cepas multirresistentes representa uma ameaça à saúde pública, pois essas bactérias e os elementos de resistência podem ser transferidas aos humanos, implicando em maior número de doenças e falhas nos tratamentos.

ABSTRACT

ROMANHOLI, Natália Lourenço, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2018. **Antimicrobial resistance profile of diarrheogenic *Escherichia coli* isolates from swine feces.** Advisor: Ricardo Seiti Yamatogi. Co-advisor: Luís Augusto Nero.

The pork production chain generates more than one million reais each year to the Brazilian economy, ranking the country as one of the main exporters worldwide. Pork products are widely consumed worldwide, but it can carry different biological hazards, like pathogenic strains of *Escherichia coli*, responsible for a variety of symptoms in humans, such as by bloody diarrhea and renal failure. *E. coli* is characterized through different pathotypes based on a variety of virulence factors, being *eae* and *stx* the main virulence related genes in strains isolated from foods. The objective of this study was the isolation and characterization of diarrheogenic *E. coli* isolates in swine, as well as phylogenetic analysis and antimicrobial resistance evaluation of the isolates. Feces from 120 pigs obtained from a pig farm and a slaughterhouse located in the Zona da Mata, Minas Gerais state, were collected using the swab technique. The confirmed isolates in the bacteria were subjected to a multiplex PCR targeting *stx1/stx2*, *eae*, *ipaH* and *aggR* for pathotype identification. The positive isolates of the pathotypes were characterized to Clermont phylogroup identification (B1, B2, A and D) based on a second multiplex PCR targeting *chuA*, *yjaA*, *TspE4C2* and *gadA*. The Diarrheogenic *E. coli* was identified in 12 (10%) pigs, and 17 isolates were confirmed by the multiplex PCR, representing 70.6% EPEC (12/17) and 29.4% STEC (5/17). A total of 37 isolates of pigs (pathogenic and non-pathogenic) were analyzed for antibiotic resistance profile, and 100% of the *E. coli* samples were multiresistant to the antibiotics tested, that is, they were resistant to three or more classes of antibiotics and all isolates showed resistance at the concentrations tested, ampicillin, thiamulin, nalidixic acid and tetracycline. It was also verified that there was no difference in the resistance profiles between the diarrheogenic and commensal isolates. Based on the phylogroup characterization, EPEC and STEC isolates were categorized as B1 (23,5%), B2 (52,9%) and A (23,5%). Pathogenic *E. coli* strains belonging to the phylum-group B2 and D are highly

virulent, being a concern in any food chain. The presence of pathogenic *E. coli* in swine feces is of concern, since it is possible that cross-contamination does not decrease, resulting in contamination of products suitable for human consumption. In addition, the presence of multiresistant strains represents a threat to public health, since resistance can be transferred to men, implying a greater number of diseases and tasks in the treatments.

INTRODUÇÃO GERAL

A suinocultura brasileira tem se tornado cada vez mais importante no cenário econômico nacional, tanto pela elevada produção no número de animais, como pelos números expressivos na exportação deste tipo de proteína.

Por essa intensa produção, surtos de origem alimentar têm se tornado um importante problema de saúde pública. *Escherichia coli* está dentre os principais patógenos responsáveis pela causuística de surtos alimentares em todo o mundo. O patógeno é um componente da microbiota intestinal dos animais de sangue quente, porém, alguns patotipos podem ser patogênicos e causar sérios danos à saúde pública. O principal hospedeiro da bactéria é a espécie bovina, porém os suínos e seus produtos, também são importantes carreadores da espécie e das cepas patogênicas.

Dentre esses principais patotipos *E. coli* STEC, patotipo que produz a Shiga toxina, capaz de causar lesões ao endotélio renal, podendo ocasionar posteriormente diarreia sanguinolenta, colite hemorrágica e síndrome hemolítico-urêmica. A maioria dos surtos alimentares relacionados ao patotipo está associado ao sorotipo O157:H7, apesar de existirem outros reportados em associações com infecções do trato gastrointestinal em humanos.

A atual produção suínica atrelada à elevada demanda de animais, leva à adoção de um sistema intensivo de criação que apresenta alguns fatores como alta lotação de baias, contato direto entre os animais, alta densidade de fezes e compartilhamento de comedouros e bebedouros. Portanto, há facilidade de disseminação de patógenos, e ao mesmo tempo, dificuldade no controle dos mesmos quando já instalados na criação. Por tudo isso, os antibióticos são amplamente utilizados de forma preventiva na rotina das granjas. Contudo, esse amplo uso atrelado ao uso indevido dos antibióticos em humanos e animais fez com que o índice de bactérias resistentes isoladas em alimentos de origem animal tenha aumentado mundialmente nos últimos anos, o que significa uma ameaça à saúde pública pelo potencial de transferência dos genes de resistência dessas bactérias para outras de significado clínico humano - dentre outros motivos - e consequentemente aumento no número de doenças bacterianas e falhas nos tratamentos.

Pela escassez de estudos realizados abrangendo *E. coli* diarreiogênica oriundas de suínos no Brasil, e pela importância que a carne suína vem adquirindo nos últimos anos, o objetivo desse estudo foi o isolamento e caracterização de isolados de *E. coli* diarreiogênica em suínos, assim como análise filogenética e avaliação da resistência a antibióticos dos isolados.

CAPÍTULO 1. Revisão Bibliográfica
Natália Lourenço Romanholi

1. Mercado da carne suína

Durante a década de 1970, com o surgimento dos óleos vegetais e a substituição da banha pela refrigeração no processo de conservação, a produção de suínos que até então era utilizada como fonte de gordura, teve o foco voltado para a produção de carnes (ZEN, S. de et al., 2015).

A necessidade de uma maior produção, a adoção do sistema intensivo de criação e avanços em diversas áreas como, por exemplo, tecnologia de criação e genética, contribuíram para o crescimento do setor e transformaram a cadeia suinícola em um dos pilares de sustentação da produção agroindustrial brasileira, atendendo em grande escala as demandas nacionais e internacionais. Portanto, atrelado a tudo isso, os suínos puderam ser abatidos com maior peso, sem acumular gordura, como ocorria no passado, aumentando assim a eficiência da cadeia produtiva (ABCS, 2014).

A crescente produção de suínos no Brasil transformou o país em um importante polo de carne suína no mundo. Em 2017, a produção mundial foi de aproximadamente 110.928 mil toneladas de carne suína e dentre os principais produtores mundiais, o Brasil se destacou, ocupando o quarto lugar em produção e também em exportação, com aproximadamente 3.725 mil toneladas de carne suína produzida, e 786 mil toneladas exportadas, sendo que 81,5% da produção de carne suína brasileira é direcionada ao mercado interno (ABPA, 2018; USDA, 2018). Dentre os produtos exportados, os cortes e miúdos representam 86,6% e 10,8% da produção, respectivamente (ABPA, 2018).

A maior evolução no consumo e produção de proteínas de origem animal, no período analisado de 2000 a 2012, ocorreu com a carne de aves, porém, a carne suína ocupa com destaque o primeiro lugar na preferência da população mundial, sendo, portanto, a carne mais consumida no mundo (ABCS, 2014). O Brasil foi classificado como o quinto país no ranking mundial de consumidores da carne (USDA, 2018), considerando que o consumo *per capita* (Kg/hab) do produto vem aumentando desde 2007 a 2017, de 13,0 para 14,7 (ABPA, 2018). No Brasil, a carne suína gera dúvidas e certa rejeição por parte da população pelas suas propriedades nutritivas e pelo potencial de causar doenças. Porém, o crescimento nesse consumo *per capita* pode ser explicado pela desmistificação da espécie, que sofreu nos últimos anos grandes mudanças na forma de criação, e que possui em alguns

cortes, índices de gordura menores do que bovinos e aves, por exemplo, além de ser rica em vitaminas e minerais.

Entre 1995 a 2012, o aumento na produção mundial de carne suína foi de 42,7%, enquanto que nesse mesmo período, o plantel mundial de suínos cresceu apenas 7,1%, sendo que essa diferença se explica pela melhora na produtividade e ao aumento do peso de abate dos plantéis mundiais (ABCS, 2014).

A produção nacional localiza-se principalmente em três regiões do Brasil, Centro-Oeste, Sudeste e Sul. Em 2017, o Estado de Minas Gerais abateu 4.010.628 animais, representando aproximadamente 11,15% dos animais abatidos no país. Número significativo, se considerarmos o grande potencial dos três estados que compõem a região Sul e que Minas Gerais é o quarto maior produtor de carne suína perdendo somente para os estados que compõem essa região (MAPA, 2017). Segundo Garcia e Aguiar (2012), dentre as principais mesorregiões de criação de suínos tecnificadas estão o Triângulo Mineiro/Alto Paranaíba (39% das matrizes), Zona da Mata (25%), Região Metropolitana de Belo Horizonte (12%), Oeste de Minas (7%) e Sul/Sudoeste de Minas (7%), correspondendo 13,76% da produção nacional e contendo 5,2 milhões de cabeças (GARCIA; AGUIAR, 2012).

A região da Zona da Mata mineira possui longa tradição na suinocultura, tendo o fortalecimento da atividade se iniciado na década de 80, nos arredores do município de Ponte Nova. Essa região também é uma das principais mesorregiões de criação de suínos tecnificadas do estado, possuindo mais de 273.000 matrizes, o que corresponde a 16% do plantel nacional, além de ocupar também o segundo lugar no rebanho de suínos do estado, com um efetivo em cabeças de 1,08 a 1,95 milhão (ABCS, 2016).

Em decorrência dos números expressivos apresentados e consequente importância na economia, os patógenos suínos que possam interferir na saúde pública precisam ser avaliados.

2. Importância da carne suína em surtos alimentares

A tecnificação e o aparecimento de diversos tipos de cortes, embutidos e defumados incorporaram e viabilizaram uma produção diferenciada ao consumidor com uma agricultura mista ligada aos mercados locais para aquisição de insumos e

melhorando a qualidade de forma a destinar o produto ao comércio global (DIETZE, 2011).

A sanidade dos animais, o controle do período de carência no uso de antibióticos, o ambiente de processamento e a manipulação dos produtos cárneos na indústria frigorífica são algumas das etapas do ciclo de produção da carne suína que podem interferir na qualidade e inocuidade do produto. Devido a rica composição química e caracteres físico-químicos deste produto e seus produtos derivados, os mesmos apresentam-se como ótimos substratos para o desenvolvimento microbiano. Os micro-organismos podem utilizar este substrato levando a deterioração do produto, diminuindo o valor nutritivo além de serem potenciais causadores de doenças (BRYAN, 1998).

A partir da implementação de programas de controle de qualidade como as Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), pode-se reduzir a contaminação e o desenvolvimento microbiano neste alimento. Esses programas, além de sugerirem a presença de patógenos e micro-organismos causadores de deterioração através do monitoramento nos ambientes de produção de alimentos, podem ser auxiliados pela pesquisa de indicadores de higiene que remetem a práticas adequadas de processamento (DOYLE & BEUCHAT, 2007).

A contaminação da carne pode se originar de práticas de higiene inadequadas durante o processo de produção. Portanto, a adesão das boas práticas de higiene no abate e produção de carne é essencial para a prevenção da contaminação microbiana das carcaças e para assegurar a qualidade da carne e a proteção da saúde pública (FAO, 2005).

Dados dos Estados Unidos representado pelo Centro para o Controle e Prevenção de Doenças - CDC (CDC, 2009), revelam que anualmente ocorrem 38,9 milhões de casos de doenças gastrointestinais causados por patógenos conhecidos e destes, 13,6 milhões são devido as doenças de origem alimentar. Estas doenças são comumente acompanhadas pelo quadro clínico de diarreia, náuseas, vômitos, dores abdominais e a presença ou não de febre, afetando principalmente pessoas imunocomprometidas como, por exemplo, crianças, idosos e gestantes.

Outros dados como os da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2015), apontam que, anualmente nas Américas, 77 milhões de pessoas adoecem por

doenças de origem alimentar, e dentre estas, mais de 9.000 vão à óbito. Além disso, as doenças diarreicas são responsáveis por 95% das doenças transmitidas na região e *E. coli* está entre as quatro principais causas.

No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde, dentre os micro-organismos envolvidos em surtos no país, de 2007 a 2016, as bactérias são as que representam 90,5% do total, sendo que, dentre essa classe de patógenos, *Escherichia coli* é a segunda maior causadora de doenças, ficando atrás apenas do gênero *Salmonella*. Nesse mesmo relatório, dentre os possíveis alimentos indicados como veiculadores dos surtos, a carne suína *in natura* e seus derivados tiveram uma representatividade de 1,5% (SVS/MS, 2016). Entretanto, a subnotificação relacionada à essas doenças no Brasil precisa ser levada em consideração, sendo que os números divulgados, portanto, não representam a totalidade ou a real situação do país, pois os diagnósticos, na maioria das vezes, não são conclusivos, assim como as investigações acerca dos surtos.

O número reduzido de registros de doenças de origem alimentar no Brasil prejudica a demonstração estatística dos surtos realmente ocorridos. Dados estatísticos de outros países demonstram o aumento de casos dessas enfermidades, principalmente pela oferta de produtos industrializados com origem em produtos a base de proteína animal. Produtos cárneos podem ser veiculadores de diversas bactérias patogênicas, destacando *E. coli*.

Estudos realizados nos Estados Unidos indicam que 78% das pessoas infectadas por *E. coli* O157, se recuperam em média em um dia sem consultar um médico enquanto que, 19% dos casos apresentam sintomas mais graves, como diarreia sanguinolenta ou doença mais prolongada, e procuram atendimento médico, mas não estão doentes o suficiente para serem hospitalizados. Essas pessoas geralmente se recuperam em uma média de 8 a 9 dias (BATZ et al., 2014).

De acordo com o Ministério da Saúde, entre 2007 e 2017, houve uma oscilação no número de surtos registrados no Brasil, estando maior parte deles distribuídos entre as regiões Sudeste e Sul (38,5% e 34,6% respectivamente), sendo que *E. coli* ocupa o segundo lugar (27,3%) como agente etiológico responsável por surtos alimentares (SVS/MS, 2018). Os surtos envolvendo a bactéria podem estar relacionados a diversos tipos de alimentos, incluindo carnes de diferentes espécies, legumes, verduras e frutas.

Um estudo epidemiológico realizado nos Estados Unidos demonstrou que entre o período de 1973 e 2012, STEC foi a principal causa de surtos de vegetais folhosos frescos. Dentre todos os surtos envolvendo o alimento, o patótipo causou quase dois terços dos surtos em vários Estados, mais de 45% das hospitalizações e quase metade das mortes (HERMAN, et al., 2015).

Em 1993, nos Estados Unidos, um grande surto envolvendo hambúrgueres mal cozidos de uma rede nacional de *fast food*, atingiu 700 pessoas, causando casos de diarreia sanguinolenta, síndrome hemolítico-urêmica (SHU) e quatro mortes (JAY et al., 2004). O surto, que teve como causa confirmada *E. coli* O157:H7, obteve grandes proporções, sendo necessário realizar o *recall* interestadual dos produtos. Devido à gravidade do ocorrido, o surto é até hoje, um dos principais relacionados à doenças de origem alimentar.

No ano de 1999, em Columbia no Canadá, um surto de *E. coli* O157:H7, associado ao consumo de salame, atingiu 143 pacientes no período de 12 semanas. No estudo de caso realizado constatou-se que o produto em questão estava significativamente associado à doença (MACDONALD et al., 2004).

Em 2007, na Itália, um surto também associado ao consumo de salame foi confirmado. Dois pacientes que ingeriram o produto apresentaram diarreia sanguinolenta e o resultado da análise das amostras confirmaram o patótipo STEC. O caso pode ser considerado o primeiro relacionado apenas ao consumo de carne suína, apesar de outras fontes não possam ser totalmente excluídas (CONEDERA et al. 2007).

Em 2011 a Alemanha sofreu o maior e mais grave surto de SHU de origem alimentar já ocorrido, sendo o mesmo relatado à OMS. O surto foi causado por *E. coli* O104:H4 produtora de toxina Shiga, causando 2.987 casos de diarreia sanguinolenta, 18 casos letais e 855 casos complicados de SHU (ROBERT KOCK INSTITUTE, 2011). Além disso, outros casos foram registrados na Europa, Suíça, Canadá e EUA, a maioria relacionados a viagens ao norte da Alemanha no período do surto. As autoridades alemãs e a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) anunciaram que os brotos contaminados produzidos a partir de sementes de feno-grego importadas do Egito em 2009 eram o veículo mais provável do patógeno nessa epidemia (ROBERT KOCK INSTITUTE, 2011). Brzuszkiewicz e colaboradores, comparando as sequências do genoma da *E. coli* O104:H4 isolada

de pacientes deste surto, com a de outras *E. coli* patogênicas, concluíram que a linhagem da cepa representa um novo patotipo, o qual denominaram *Escherichia coli* hemorrágico entero-agregativo (EAHEC) (BRZUSZKIEWICZ, et al., 2011).

Em outubro de 2011, ocorreu um surto de *Escherichia coli* O157:H7, em Ontário, no Canadá. O surto ocorreu em um evento particular, sendo que dos 59 participantes, 29 tiveram sintomas de doença gastrointestinal após o evento, seis casos apresentaram diarreia sanguinolenta e sete foram hospitalizados. Após um estudo de caso, concluiu-se que, dentre todas as potenciais fontes investigadas, STEC O157 foi isolada apenas da carne suína (TROTZ et al., 2012).

Em junho de 2012 em Limburgo, uma província da Bélgica, um surto envolveu 24 casos, dos quais 17 foram confirmados laboratorialmente sendo que cinco casos evoluíram para a SHU e 15 foram internados. Os pacientes relataram o consumo de “steak tartare”, um produto a base de carne bovina crua (BRAEYE, et al., 2014). Na França, o primeiro surto envolvendo a bactéria, ocorreu em 2002, e o patotipo identificado foi a STEC O148. O surto foi atribuído ao consumo de carne de carneiro levemente tostada (lightly roasted). Em junho de 2012 ocorreu o primeiro surto de infecção por STEC O157 no país, associado ao consumo de carne bovina moída na França, e 4 casos de SHU foram relatados em crianças (BARRET et al., 2013).

Em 2014, também no Canadá, em um surto associado ao consumo de carne suína, 119 casos foram diagnosticados com a doença e 23 pacientes foram internados, sendo que desses, 6 desenvolveram síndrome hemolítico-urêmica. Em todos os pontos-chave da cadeia foram identificados ambientes de produção de suínos e suínos contaminados por *E. coli* O157: H7, além do manuseio incorreto dos produtos cárneos, instalações de abate, processamento, varejo e restaurantes (HONISH et al., 2017).

3. *Escherichia coli*

Em 1885, *E. coli* foi descrita pela primeira vez pelo pediatra alemão Theodore Escherich, isolada de fezes de indivíduos saudáveis (MACZULAK, 2011), encontrando-as no colón, por isso o nome “*E. coli*”. Em 1919, após uma revisão de literatura, recebeu o nome de *Escherichia coli*, o qual é utilizado até os dias de hoje (LEDERBERG, 2004). Esta bactéria é pertencente à família das Enterobacteriaceae e

componente da microbiota intestinal de animais de sangue quente (ACHA; SZYFRES, 2001).

A bactéria faz parte do grupo dos bastonetes Gram-negativos, não produz esporos, é oxidase negativa, podendo ser móvel por flagelos peritríquios ou imóvel, anaeróbia facultativa capaz de fermentar a glicose e a lactose com produção de ácidos e gases (ACHA; SZYFRES, 2001).

Para cultivo da bactéria, dentre outros meios, pode-se utilizar o Ágar MacConkey, em que as colônias apresentam-se com coloração roseo-avermelhadas, devido à fermentação da lactose (KONEMAN, et al., 2001) e para testes bioquímicos, o “IMViC” (Indol [+], VM [+], VP [-] e Citrato [-]), é um método rápido e presuntivo de identificar *E. coli*, pois a combinação dos quatro testes auxilia na diferenciação de outros membros da família Enterobacteriaceae fermentadores de lactose (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005).

3.1 *E. coli* diarreio gênicas

Dois grandes grupos de *E. coli* podem ser distinguidos, dependendo da associação estabelecida para com o homem. O primeiro, chamado *E. coli* comensal, tem por habitat o intestino humano, desde o nascimento até a morte. O segundo, o da *E. coli* patogênica, pode causar diferentes tipos de infecção e é constituído por vários patótipos. Os grupos diferem evolutivamente, sendo a diferença principal a presença de genes que codificam os fatores de virulência presentes nos diferentes patótipos (FOCACCIA, 2005).

De acordo com o esquema estabelecido por Kauffmann em 1947, esta bactéria pode ser classificada sorologicamente em sorogrupos e sorotipos com base na sua composição antigênica: antígenos somáticos ou “O” para os sorogrupos, e antígenos H ou flagelares para os sorotipos, além de poder expressar antígenos capsulares ou K, importantes na patogênese (CAMPOS et al., 2004).

As cepas de *E.coli* são classificadas fundamentalmente em três grandes grupos: as linhagens relacionadas às manifestações clínicas entéricas ou diarreio gênicas, denominadas *E.coli* diarreio gênicas (DEC), linhagens associadas às infecções extraintestinais (ExPEC) e as comensais. Entre o grupo de bactérias que podem causar a doença, o grupo conhecido como *E. coli* diarreio gênica (DEC) pode

ser dividido em seis subgrupos ou patótipos. Patótipos são caracterizados por um grupo de cepas de uma mesma espécie responsável por causar um determinado tipo de doença utilizando mecanismos de virulência comum como ,por exemplo, *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* difusamente aderente (DAEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) e *E. coli* enteropatogênica (EPEC) (Nataro & Kaper, 1998). Uma nova categoria, *E. coli* enteroagregativa e entero-hemorrágica (EAHEC), foi recentemente proposta. Outros autores chamam esses organismos de "*E. coli* enteroagregativa e produtora de verotoxina" (Iowa State University Center for Food Security and Public Health, 2016).

A denominação destes subgrupos está diretamente relacionada aos mecanismos patogênicos e a presença de determinados genes de virulência (SMITH et al., 2005). Dentre os diversos fatores de virulência, um complexo mecanismo de patogenicidade está envolvido. Toxinas e adesinas são alguns dos exemplos, sendo codificados por genes localizados em elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposons, bacteriófagos e ilhas genômicas. Assim, esses genes ao serem transmitidos entre as cepas, resultam em novas combinações de genes de virulência ou transformam as cepas não patogênicas em patogênicas (KAPER et al., 2004).

Alguns patótipos como EPEC, EHEC e ETEC, podem causar doenças em animais usando muitos dos mesmos fatores de virulência que estão presentes em cepas humanas e também fatores únicos de colonização que não são encontrados em cepas humanas (KAPER et al., 2004).

As cepas de EPEC, por exemplo, são causadores de diarreia principalmente em crianças e recém-nascidos (ROBINS-BROWNE, 1987; PADHYE & DOYLE, 1992; HITCHINS et al., 1995; BETTELHEIM, 2005), sendo essa diarreia clinicamente mais grave do que aquelas provocadas por outros patógenos, acompanhada geralmente de dores abdominais, vômitos e febre (SENERWA et al., 1989; FRANCO & LANDGRAF, 1996). Esse patótipo é a maior causa de diarreia infantil em países em desenvolvimento, como Brasil, Chile e Peru (OCHOA et al., 2008) e uma das causas mais comuns de diarreia infantil em todo o mundo (LANATA et al., 2013).

EPEC são definidas como *E. coli* diarreiogênicas que produzem uma lesão histopatológica característica conhecida como *Attaching and Effacing* (A/E) nas

células intestinais, mas que não são produtoras da toxina Shiga, distinguindo-as portanto, das STEC. A lesão A/E é caracterizada por aderência íntima entre bactérias e células epiteliais e destruição das microvilosidades intestinais (KAPER et al., 1998), levando conseqüentemente, à redução da capacidade absorptiva da mucosa intestinal, com ruptura do equilíbrio eletrolítico e diarreia. Essa capacidade de causar lesões se deve à presença da intimina (codificada pelo gene *eae*) e outras proteínas.

Algumas cepas de *E. coli* que produzem toxinas Shiga (codificada pelos genes *stx1* e *stx2*) também podem produzir lesões A/E, portanto, cepas de EPEC são aquelas positivas para o gene *eae* mas negativas para o gene *stx* (ALONSO et al., 2016). Esses genes de formação da lesão A/E, são codificados em uma ilha de patogenicidade denominada de região LEE (locus of enterocycle effacement) (MCDANIEL et al., 1995).

EPEC são ainda divididas em dois grupos: *E. coli* enteropatogenicas típicas (tEPEC), que contem o plasmídeo EAF (pEAF) e diretamente relacionado a aderência deste grupo bacteriano, e *E. coli* enteropatogenicas atípicas (aEPEC), que não possuem o plasmídeo EAF. Esse plasmídeo contém o operon *bfp*, que codifica o pilus formador de feixe (BFP), para mediar a aderência inicial às células epiteliais intestinais. Além disso, plasmídeo contem o locus *Per* (regulador codificado por plasmídeo), cujos produtos regulam, além do operon *bfp*, outros genes da região LEE (KAPER et al., 2004; HERNANDES et al., 2009).

Este patotipo tem sido isolado de uma variedade de alimentos com registros de surtos alimentares em diversos países (PARK et al., 2014). A tEPEC já foi fortemente associada a diarreia infantil, porém, a epidemiologia da infecção por EPEC vem sofrendo alterações com a inclusão da aEPEC como causadora de diarreia infantil em países subdesenvolvidos (DONNENBERG AND FINLAY, 2013). As cepas típicas de EPEC são patogênicas para humanos e não são encontradas em animais, enquanto as cepas atípicas são patogênicas para ambos (TOZZOLI AND SCHEUTZ, 2014). Portanto, atualmente existe um complexo quadro da dimensão global do patógeno e há necessidade de novos estudos para identificar o real potencial do patotipo.

E. coli produtoras de enterotoxinas são conhecidas como ETEC e possuem um número limitado de sorotipos, associados regularmente aos casos de diarreia. O

quadro clínico caracteriza-se por diarreia aquosa, acompanhada de febre baixa, dores abdominais e náuseas e a forma mais grave assemelha-se aos sinais de cólera, podendo levar à desidratação (PADHYE & DOYLE, 1992; SHUTERLAND et al., 1995; FRANCO & LANDGRAF, 1996). Esse patotipo apesar de ser uma das principais causas de diarreia do viajante, leva à dados significativos relacionados à morbidade e mortalidade em crianças de países em desenvolvimento, devido aos quadros de diarreia (CROXEN et al., 2013). ETEC coloniza a superfície da mucosa do intestino delgado e produz enterotoxinas, que dão origem à secreção intestinal. O patotipo possui dois tipos de enterotoxinas, sendo um grupo de enterotoxinas termolábeis ao calor (LTs) e as enterotoxinas termoestáveis (STs), sendo que as cepas podem expressar LT, ST, ou ambas ao mesmo tempo (KAPER et al., 2004; CROXEN et al., 2013). Além do impacto da ETEC em seres humanos, a produção suína também é afetada, já que a diarreia induzida pela ETEC em leitões neonatos e pós-desmame causa elevados índices de morbidade e mortalidade (CROXEN et al., 2013).

O grupo das *E. coli* enteroinvasivas - EIEC causam manifestações clínicas semelhantes às infecções por *Shigella*, ao penetrarem em células epiteliais do cólon. A maioria das cepas do grupo possuem características bioquímicas que fazem com que as bactérias se assemelhem mais à *Shigella* do que as demais cepas de *E. coli*. Os sintomas da infecção são semelhantes aos dos demais patotipos, acrescentando-se a eliminação de sangue e muco nas fezes (PADHYE & DOYLE, 1992; SHUTERLAND et al., 1995; FRANCO & LANDGRAF, 1996; VARNAM & EVANS, 1996; MENG et al., 2001). EIEC está subestimada nos levantamentos epidemiológicos por suas manifestações clínicas menos graves e pelo fato de também poder ser classificadas erroneamente como *Shigella*, por sua similaridade bioquímica, genética e patogênica, dificultando, portanto, os métodos de diferenciação e identificação por cultura convencional, ou ensaios bioquímicos, que são complexos e demorados (UD-DIN, et al., 2014). Por esses motivos, raros surtos são relatados associados à doença (CROXEN et al., 2013).

E. coli enteroagregativa - EAEC, desde sua identificação inicial foi reconhecida em doenças endêmicas e epidêmicas em todo o mundo (BHAN et al., 1989). EAEC são cepas com padrão de aderência agregativa e reconhecidas por causar diarreia persistente em crianças e adultos, em países desenvolvidos e em desenvolvimento.

Os mecanismos específicos da patogenicidade da EAEC não foram totalmente determinados (HEBBELSTRUP et al., 2014), contudo, atualmente são definidas como *E. coli* que secretam LT (toxina termolábil) ou ST (toxina termoestável) e que aderem às células HEp-2, em um padrão autoagregativo, no qual as bactérias aderem umas as outras, em uma configuração chamada de “stacked-brick”. Várias toxinas estão relacionadas à esse patotipo, sendo duas delas, ShET1 (enterotoxina da *Shigella* 1) e EAST1, codificadas pelo mesmo locus cromossômico em filamentos opostos (CROXEN et al., 2013).

O quinto grupo, conhecido atualmente como STEC ou *E.coli* produtoras de Shiga Toxina, já foi reconhecido como *E. coli* enterohemorrágica. Duas linhas de estudo existiram para que esses termos existissem. A primeira teve início em 1977, com Konowalchuk, Speirs e Starvic, e foi relacionada à capacidade de cepas de alguns sorogrupos produzirem toxinas que causavam efeito citopático irreversível em células Vero (KONOWALCHUK; SPEIRS; STARVIC, 1977). Alguns anos depois, outro estudo descreveu a capacidade de cepas de EPEC em produzir uma citotoxina letal para células HeLa (O'BRIEN et al., 1982). Essa citotoxina posteriormente foi chamada toxina Shiga-like, pois, da mesma forma que a toxina de Shiga, inibia a síntese protéica em células HeLa, era enterotóxica para intestino de coelho e letal para camundongos. Pelo alto grau de homologia da toxina de *E. coli* com a toxina de *Shigella dysenteriae* tipo 1, Calderwood et. al. (1996), propuseram a nomenclatura toxina Shiga/*E. coli* produtora de toxina Shiga (Stx/STEC).

A segunda linha de estudo, em 1983, foi baseada em um relato de um raro sorotipo de *E. coli*, O157:H7, que seria responsável por um surto de diarreia sanguinolenta, relacionado ao consumo de hambúrgueres contaminados e mal-cozidos, sendo o quadro clínico descrito como “colite hemorrágica” (CH) (RILEY et al., 1983). Nos anos seguintes, esse sorotipo foi associado a quadros de diarreias leves a severas e sanguinolentas, levando inclusive a síndrome hemolítico-urêmica (KARMALI et al., 1983). Devido à associação inicial de O157:H7 com colite hemorrágica, as cepas pertencentes a este sorotipo foram denominadas *Escherichia coli* enterohemorrágicas (EHEC) e, por muitos anos, EHEC permaneceu tendo o mesmo significado de *E. coli* O157:H7, agente etiológico de colite hemorrágica.

Entre os principais patotipos, o grupo produtor de Shiga-Toxina (STEC) tem emergido como um importante agente zoonótico, principalmente ligado aos

alimentos de origem animal (GYLES, 2007) e está naturalmente presente nos animais de produção, levando a uma ocorrência de infecção humana pelo consumo de carne crua ou mal passada contaminada por esse agente (ELDER et al., 2000). Apesar de haver mais de 400 sorotipos STEC identificados, apenas um subconjunto destes foi correlacionado com doença em humanos (BLANCO et al., 2004).

Estas bactérias são responsáveis por uma doença severa em humanos, que inclui desde uma diarreia aquosa ou sanguinolenta até uma colite hemorrágica e síndrome hemolítico-urêmica. Geralmente, EHEC é LEE positivo e forma lesões A/E assim como a EPEC. No entanto, o termo EHEC também tem sido usado na literatura para descrever cepas de STEC negativas para LEE, como sorotipos O91: H21, O104: H4 e O113: H21, que causaram CH e SHU (CROXEN et al., 2013). A descoberta e caracterização do LEE levou à constatação de que o termo EHEC representa um subconjunto de STEC, uma vez que nem todas as cepas de STEC contêm LEE. Embora a maioria das cepas de STEC associadas à doença humana possuam LEE e o plasmídeo, algumas cepas que não apresentam esses fatores, particularmente O104: H4, foram implicadas em doenças humanas, levando ao uso do termo mais geral STEC em vez de EHEC (KAPER AND O'BRIEN, 2014).

Desde o surto de colite hemorrágica em 1982, associada ao consumo de hambúrgueres contaminados, *E. coli* O157 tornou-se o sorotipo enterohemorrágico mais importante do ponto de vista da saúde pública e tem sido associado à morbidade e mortalidade humana em países industrializados (RANGEL et al., 2005).

A maioria dos casos de doenças diarreicas no mundo causado por STEC está associada ao sorotipo O157:H7, mas sorogrupos como O26, O103, O113 e O145 também têm sido reportados em associação com infecções do trato gastrointestinal em humanos (CAPRIOLI et al., 2005; DOS SANTOS et al., 2010). Segundo o Centro de Controle doenças e Prevenções (CDC), esses sorogrupos em adição ao O121 são responsáveis por cerca de 71% das doenças. O sorogrupo STEC mais comum é O157:H7 e foi o assunto de muitos estudos, especialmente para mecanismos moleculares de patogênese. Enquanto STEC O157:H7 foi classificado como adulterante em carne bovina desde 1994, o Departamento de Agricultura dos EUA (USDA) declarou em 2011, mais 6 sorogrupos STEC que são considerados adulterantes na carne bovina, sendo eles: O26, O45, O103, O111, O121 e O145 (também conhecidos como "Big 6"), pois são as cepas não STEC O157 mais

comumente associadas à doença grave em humanos. Deve-se notar, no entanto, que a prevalência de STEC não O157 difere geograficamente (JOHNSON et al., 2006). De acordo com Kaper e colaboradores, as cepas STEC do sorotipo O157:H7 são os patógenos STEC mais importantes na América do Norte, Reino Unido e Japão, mas vários outros sorotipos, particularmente aqueles dos sorogrupos O26 e O111, também podem causar doenças e são mais proeminentes do que O157:H7 em muitos países (KAPER et al., 2004).

Nos Estados Unidos, país no qual *E. coli* é uma das principais causas de surtos de doenças transmitidas por alimentos (GOULD et al., 2013), o prejuízo econômico direto causado por infecções por toxina Shiga possivelmente excedam um bilhão de dólares por ano (FRENZEN et al. 2005; HOFFMANN et al. 2015). Entre 2000 e 2008, estima-se que o número de casos de STEC foi de aproximadamente 175.000/ano. Dados de 2003 a 2012 do país indicam que surtos de doenças causadas por *E. coli* O157:H7 tinham como principais rotas de transmissão, os alimentos (65%) e o contato pessoa a pessoa (10%). Estas estimativas sugerem que aproximadamente 64% das infecções por STEC são causadas por estirpes não O157:H7 e que a maioria (68-82%) dos casos é de origem alimentar (SCALLAN et al. 2011). De acordo com o CDC, a incidência média de casos STEC O157 nos EUA, poderia estar entre 18.000 e 150.00 em um ano típico, enquanto a estimativa média para as mortes seria de 20/ano, podendo variar de 0 a 110 (CDC, 2011).

O principal fator de virulência conhecida como Shiga toxina (*Stx*) é codificado por genes bacteriófágicos, responsáveis pela maioria das manifestações clínicas de infecções por STEC. Também são denominadas de toxinas “Shiga-like” (SLTs), pela semelhança à toxina produzida pelo bacilo de Shiga (*Shigella dysenteriae* tipo 1), causador da disenteria bacilar. São proteínas de alto peso molecular e sua produção é determinada por dois fagos lisogênicos distintos (DOYLE & BEUCHAT, 2007). Existem pelo menos dois tipos de toxina de Shiga, *Stx1* e *Stx2*, que diferem em várias características, fazendo, inclusive, com que a *Stx2* seja mais tóxica do que *Stx1* e esteja mais freqüentemente associada à SHU (FOCACCIA, 2005), embora compartilhem aproximadamente 55% de homologia de aminoácidos (KAPER et al., 2004). Essas toxinas são assim denominadas por serem similares à toxina produzida por *Shigella dysenteriae* 1 e são conhecidas pelo nome de Verotoxinas, por possuírem efeito citotóxico em células Vero (RODRIGUES et al., 2008).

A partir do momento que é liberada, *Stx* atinge a corrente sanguínea e é transportada até os rins, ocasionando danos às células do endotélio renal, obstruindo a microvascularidade por ação direta de sua toxicidade, juntamente com a indução de citocinas locais e produção de quimiocina, resultando em uma inflamação renal. Esse dano pode levar à SHU, que é caracterizada por anemia hemolítica e trombocitopenia, acompanhadas de insuficiência renal aguda, potencialmente fatal (FOCACCIA, 2005). No rim, essas toxinas podem resultar em um dano renal crônico, levando à diálise e eventual necessidade de transplante em casos de SHU. Doenças neurológicas também podem ocorrer após a infecção ou como parte de sequelas causadas pela púrpura trombótica trombocitopênica, podendo ser fatal, pelo desenvolvimento de coágulos nos pacientes (KAPER et al., 2004).

Além de *stx*, a maioria das cepas EHEC também contém a ilha de patogenicidade LEE que codifica um sistema de secreção tipo III e proteínas efetoras que são homólogas àquelas produzidas por EPEC. Embora mais de 200 sorotipos de *E. coli* possam produzir *Stx*, a maioria desses sorotipos não contém a ilha de patogenicidade LEE e não está associada a doenças em humanos. Isso levou ao uso de “*E. coli* produtora de toxina Shiga” (STEC) ou “*E. coli* produtora de verotoxina” (VTEC) como termos gerais para qualquer cepa de *E. coli* que produz *Stx*, e o termo EHEC é usado para denotar apenas o subconjunto de cepas de *Stx* positivo que também contêm o LEE (KAPER et al., 2004).

O principal reservatório deste agente são os bovinos e consequentemente os alimentos derivados podem carrear o patógeno. No entanto, os suínos podem apresentar este patótipo bacteriano assim como seus produtos alimentícios como a carne de porco, sendo então, um importante veículo transmissor de STEC, relatado em alguns trabalhos (CDC, 1995a, b; PATON et al. 1996; WILLIAMS et al.; 2000, MACDONALD et al.; 2004, CONEDERA et al, 2007; TROTZ-WILLIAMS et al., 2012; CHA et al, 2018).

Brooks et al. (2001) encontraram uma porcentagem de 4.0% de presença de *E. coli* STEC em amostras de carne suína, em Dunedin na Nova Zelândia, enquanto JO et al. (2004), e Li et al. (2011) obtiveram um índice de 2.5% na Coreia e 2.0% de *E. coli* STEC não O157 na China, respectivamente. Apesar da publicação de alguns resultados como os apresentados, os dados sobre este patógeno ainda são

escassos. Os alimentos de origem animal podem ser contaminados a partir do processamento, uma situação que pode ser agravada se o alimento não for adequadamente manuseado durante o abate e etapas consequentes, dando lugar a patógenos para se multiplicarem. As condições sob as quais esses alimentos são manipulados levantam questões sobre sua qualidade microbiológica. Estudos realizados com diferentes países para investigar a qualidade microbiológica do alimento análogo relatam a presença de potenciais patógenos humanos (Akoachere et al., 2009; Davies et al., 2004).

Existem implicações importantes da STEC na microbiologia veterinária (animais como reservatórios), microbiologia ambiental (terra e água), microbiologia dos alimentos (contaminação, manipulação, e preparação), e microbiologia clínica (saúde pública, vigilância, e doença humana). A riqueza e diversidade da literatura desse patotipo exemplificam seu impacto em muitos campos de estudo (CROXEN et al., 2013).

O mais recente patotipo de *E. coli* descrito até o momento, EAHEC, possui muitas características semelhantes à EHEC, como, capacidade de causar colite hemorrágica, produzir shiga toxina, e colonizar e aderir ao intestino humano. Esse último fator de virulência, apesar de ser comum entre os patotipos, ocorre de forma diferente entre eles. A EAHEC transporta diferentes fatores de virulência e adere às células intestinais humanas através de fímbrias de aderência agregativa (Iowa State University Center for Food Security and Public Health, 2016).

Esse patotipo foi descoberto através de um grande surto ocorrido na Alemanha, em 2011, que atingiu 3.368 pessoas e causou 50 mortes (ECDC, 2011). A cepa infectante apresentou uma combinação incomum de características de virulência compreendendo o repertório de colonização de EAaggEC acoplado com a produção de uma toxina tipicamente produzida por *E. coli* produtora de *Vtx* (VTEC) (BRZUSZKIEWICZ et al., 2011).

3.2 Grupos filogenéticos de *E. coli*

Filogenia pode ser conceituada pelo estudo da relação evolutiva dentre os vários grupos de organismos (PASTORE, 2014). No ramo da microbiologia, as análises filogenéticas servem como importante ferramenta para se conhecer a ancestralidade de um patógeno e sua relação com a patogenicidade e epidemiologia das diversas doenças. Dessa forma, permitem diferenciar diversos isolados microbianos conforme a similaridade genética entre eles, ou seja, é possível identificar se um determinado conjunto de cepas isoladas pertencem à uma mesma família clonal e, por consequência, se um grupo filogenético específico é mais frequente em determinados quadros infecciosos e/ou em determinadas regiões (CLERMONT et al., 2013).

Para auxiliar na identificação da origem evolutiva de *E. coli* extra intestinais, uma nova ferramenta tem sido utilizada. Esta ferramenta baseia-se na análise da distribuição dos marcadores de patogenicidade para classificação dos isolados em grupos filogenéticos. A caracterização em grupos filogenéticos é realizada através da detecção de três genes (CLERMONT et al., 2000). Este método é bastante útil na classificação de cepas desconhecidas de *E. coli*, identificando-as como patogênicas ou comensais.

Inicialmente, quatro grupos filogenéticos principais de *E. coli* foram definidos: A, B1, B2 e D (HERZER et al., 1990). O protocolo proposto por Clermont et al. (2000), baseia-se na pesquisa dos genes *chuA*, *yjaA* e no fragmento de DNA autônomo TSPE4.C2. Clermont constatou que o gene *chuA* estava presente em todas as estirpes pertencentes ao grupo B2 e D, mas ausente em todas as estirpes dos grupos A e B1, possibilitando a separação dos grupos B2 e D dos grupos A e B1. Assim como o gene *yjaA* permitiu a discriminação entre os grupos B2 e D. Ao final, o marcador TspE4.C2 estava presente em todos, menos em B1 e A. Os resultados das 3 amplificações por PCR permitiram o estabelecimento de uma árvore dicotômica para determinação do grupo filogenético, sendo o método considerado satisfatório e adotado em muitos trabalhos (GORDON et al., 2008).

As cepas destes quatro grupos filogenéticos diferem entre si em diversos aspectos como as características fenotípicas, incluindo a capacidade de metabolizar

diferentes açúcares, os perfis de resistência a antibióticos e as taxas de crescimento quando relacionados às temperaturas distintas (GORDON, 2004).

As cepas virulentas geralmente classificam-se no grupo B2, porém algumas podem ser classificadas no grupo D. Por outro lado, os isolados considerados comensais pertencem aos grupos A e B1 (CLERMONT, BONACORSI et al. 2000).

Outros grupos filogenéticos surgiram, pois os extensos conjuntos de dados de sequências de multi-locus disponíveis e, em menor extensão, o crescente corpo de dados do genoma, também melhoraram a compreensão da extensão da subestrutura em *E. coli*. A existência do filo-grupo E, anteriormente um pequeno conjunto de cepas não-designadas das quais O157: H7 é o membro mais conhecido, é agora bem reconhecido (TENAILLON et al., 2010). Um filo-grupo F também é agora documentado e consiste em cepas que formam um grupo irmão para o grupo filo B2 (JAUREGUY et al., 2008; CLERMONT et al., 2011a). Mais recentemente, um filo-grupo C foi proposto para um grupo de cepas intimamente relacionadas, mas distintas do grupo filo B1 (CLERMONT et al., 2011a).

3.3 Resistência a antibióticos

Os agentes antibióticos são amplamente utilizados como medidas preventivas contra infecções bacterianas em animais de produção, beneficiando a cadeia produtiva pela redução nos índices de mortalidade e morbidade, na terapia de infecções bacterianas (BERGE et al., 2009). Entretanto, isso resultou em um problema geral de saúde pública pela resistência aos antibióticos por bactérias patogênicas (GLASS-KAASTRA et al, 2014. MACKENZIE et al, 2014). Essa resistência aos antibióticos é um tema que é revisto continuamente e a cada ano surgem novos estudos que podem redefinir nossa perspectiva com relação ao problema (BERGLUND, 2015; SEIFFERT et al, 2013).

A resistência antimicrobiana em bactérias isoladas de alimentos, particularmente aqueles de origem animal, aumentou mundialmente nos últimos anos (FRYE et al., 2013; KOLUMAN et al., 2013). Os principais fatores que explicam esse aumento são o uso indevido dos antibióticos em humanos e animais e a utilização dos mesmos como promotores de crescimento em animais de produção (ADENIPEKUN et al, 2015). Consequentemente, os animais de produção têm sido constantemente relatados como reservatórios de bactérias resistentes e

considerados como fonte de infecções alimentares em humanos (ZORN et al., 2012; HAMMERUM et al., 2009).

Alguns países possuem políticas para o controle do uso dos antibióticos na produção. Na Europa existem também diversos sistemas de vigilância antimicrobiana, porém, há um grande desafio devido à falta de concordância entre os programas sobre o que se entende por resistência através do uso de diferentes critérios interpretativos (SILLEY et al., 2011). Outros países, adotam políticas de uso semi restrito aos antibióticos como, por exemplo, Mexico, Rússia, Coreia do Sul e Japão. Neste último, o uso é regulamentado pela Lei de Assuntos Farmacêuticos (Lei nº 145 de 1960) do Ministério da Agricultura, Florestas e Pescas Japonês (JMAFF) e também pela Comissão de Segurança Alimentar (FSC), criada em 2003 para realizar avaliações de risco de resistência antimicrobiana em alimentos com base na Lei Básica de Segurança Alimentar (Lei No. 48 de 2003) (ASAI et al., 2014). Outros países ainda, como Brasil, Canadá e Austrália, não têm restrições atuais sobre os antibióticos promotores de crescimento e possuem apenas requisitos limitados para obter prescrições veterinárias (MARON et al., 2013).

Particularmente no Brasil, o uso dos antibióticos como promotores de crescimento é excessivo se comparado a outros países de expressão no setor. É evidente que houve grande melhora na produtividade com a utilização dos mesmos, porém o engajamento de todos envolvidos no setor produtivo associado ao uso racional dos medicamentos, qualidade do diagnóstico de doenças de rebanho e utilização de outros aditivos, são possibilidades que minimizariam os riscos de resistência.

Bactérias presentes em animais tratados com antibióticos podem desenvolver resistência ao medicamento, e conseqüentemente, carrear genes de resistência, potencialmente transmitidos de animais para humanos (LANDERS et al., 2012). As bactérias resistentes a antibióticos podem ser adquiridas pelos seres humanos através da cadeia alimentar ou através do contato com animais infectados, suas fezes ou ambientes contaminados (CHENEY et al., 2015). Durante o processo de abate, a prevalência de isolados resistentes pode ser ampliada através da contaminação cruzada de produtos cárneos (XU, et al., 2014), por falhas no processo, como na evisceração ou por contaminação cruzada através de utensílios. Os genes de resistência antimicrobiana têm sido considerados um dos fatores de

virulência (DAVIES E DAVIES, 2010) e podem também ser transferidos entre espécies bacterianas, através de plasmídeos, transposons e integrons (EFSA and ECDC, 2011). Estudos indicam que a transferência de plasmídeos portadores de integrons de classe 1 com cassetes gênicos inseridos pode ser o principal mecanismo para a rápida disseminação da resistência a múltiplas drogas em bactérias, especialmente entre as Enterobacteriaceae (LIU et al., 2015).

E. coli tem a capacidade de trocar material genético com outras espécies bacterianas e é possível que este organismo passe genes de resistência a antibióticos a patógenos bacterianos transitórios que causam doenças em humanos (ALEXANDER et al., 2010). Esta bactéria é considerada um microorganismo indicador efetivo para monitorar a prevalência de resistência em diferentes populações e avaliação da transferência da resistência entre distintos ecossistemas (ALONSO et al., 2016). Esse patógeno pode muitas vezes adquirir plasmídeos conjugativos que transportam os genes de resistência, facilitando a disseminação da resistência a outras bactérias entéricas.

As informações sobre a verotoxicidade e resistência a múltiplos fármacos são especialmente escassas para os isolados de *E. coli* (SCHODER et al., 2014; BEUTLICH et al., 2014), fazendo-se necessária a continuidade da pesquisa sobre a tendência à resistência aos antibióticos e novos métodos de combate a esses patógenos (WANG et al., 2016). A monitorização da resistência antimicrobiana como indicador de *E. coli* de suínos em vários países da UE demonstrou uma variação considerável nas frequências de resistência entre países (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2014).

A resistência aos antibióticos continua sendo um grande problema na saúde humana e animal e é cada vez mais reconhecida em patógenos isolados de alimentos (AKOACHERE et al., 2009; ARLET, et al., 2007; SHEKH et al., 2013). Dados dos Estados Unidos estimam que o uso de antibióticos em alimentos represente 80% do consumo anual de antibióticos do país (FDA, 2010). A contaminação de alimentos por bactérias resistentes a antibióticos pode, portanto, ser uma grande ameaça à saúde pública, pois os determinantes de resistência a antibióticos podem ser transferidos para outras bactérias de significado clínico humano (VAN, et al., 2007; ADESIJI, et al., 2011). Além disso, a transferência dessas bactérias resistentes para humanos tem implicações significativas na saúde

pública aumentando o número de doenças bacterianas e o potencial para falha nos tratamentos (ADESIJI, et al., 2011). Ao mesmo tempo em que o mundo tem observado o surgimento acelerado de resistência a cada nova classe de antibióticos, a descoberta, o desenvolvimento e o investimento limitado de novas drogas antimicrobianas diminuíram, à medida em que o desenvolvimento da resistência aos antibióticos está agora excedendo a disponibilidade de novos agentes antibióticos, tornando a resistência uma ameaça global à saúde (TALBOT, et al., 2006; NORRBY et al., 2005; FAO/OIE/WHO, 2012).

4. Referências

ABCS. Associação Brasileira de Criadores de Suínos. **Produção de Suínos: teoria e prática** (1ª Edição). ABCS, Brasília, DF, p. 908, 2014.

ABCS. Mapeamento da suinocultura brasileira. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas; Associação Brasileira dos Criadores de Suínos, Brasília, DF, 2016. 376p.

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Annual, 2018.

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales: Bacterioses e micoses. 3.ed. Washington: OPAS, 2001. 416p.

ADENIPEKUN, E.O.; JACKSON, C. R.; OLUWADUN, A.; IWALOKUN, B. A.; FRYE, J. G.; BARRETT, J. B.; HIOTT, L. M.; WOODLEY, T. A. Prevalence and Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* from Food Animals in Lagos, Nigeria. **Veterinary Microbiology**, v. 21, n. 3, 2015.

ADESIJI, Y. O.; ALLI, O. T.; ADEKANLE, M. A.; JOLAYEMI, J. B. Prevalence of Arcobacter, *Escherichia coli*, Staphylococcus aureus and Salmonella species in retail raw chicken, pork, beef and goat meat in Osogbo, Nigeria. **Journal of Biomedical Research**, v. 3, n. 1, p. 8–12, 2011.

AGUIAR, M. R.; GARCIA, S. K.; GONÇALVES, J. P. M. Sistemas de produção de suínos em Minas Gerais: situação e biossegurança das granjas em 2010. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 49., 2012, Brasília. Anais. Brasília: SBZ, 2012, 3p.

AKOACHERE, J., TANIH, N., NDIP, L., NDIP, R. Phenotypic characterization of *Salmonella typhimurium* isolates from food-animals and abattoir drains in Buea, Cameroon”. **Journal of Health, Population, and Nutrition**, v. 27, n. 5, p. 612–618, 2009.

ALEXANDER, T.W.; INGLIS, G.D.; YANKE, L.J.; TOPP, E.; READ, R.R.; REUTER, T.; MCALLISTER, T.A. Farm-to fork characterization of *Escherichia coli* associated with feedlot cattle with a known history of antimicrobial use. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, n. 40, p. 48, 2010.

ALONSO, M. Z.; SANZ, M. E.; IRINO, KRÜGER, A.; LUCCHESI, P. M. A.; PADOLA, N. L. Isolation of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* from chicken and chicken derived products. **British Poultry Science**, 2016.

ARLET, G.; BARRET, T. J.; BUTAYE, P.; CLOECKAERT, A.; MULVEY, M. R.; WHITE, D. G. *Salmonella* resistant to extended-spectrum cephalosporins: prevalence and epidemiology. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 7, p. 1945–54, 2006.

ASAI, T.; HIKI, M.; OZAWA, M.; KOIKE, R.; EGUCHI, K.; KAWANISHI, M.; KOJIMA, A.; ENDOH, Y. S.; HAMAMOTO, S.; SAKAI, M.; SEKIYA, T. Control of the development and prevalence of antimicrobial resistance in bacteria of food animal origin in Japan: A new approach for risk management of antimicrobial veterinary medicinal products in Japan. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 11, p. 171–176, 2014.

BARRET, A. S.; CHARRON, A. S.; KURKDJIAN, M. P.; GOUALI, M.; LOUKIADIS, E.; LEROUX, P. B.; GODRON, A.; GAULT, G.; FAURE, M.; MAILLES, A. Shopper cards data and storage practices for the investigation of an outbreak of

Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O157 infections. **Medecine et maladies infectieuses**, v. 43, n. 9, p. 368–73, 2013.

BATZ, M. B.; SANDRA, A. H.; MORRIS, J. G. Disease-Outcome Trees, EQ-5D Scores, and Estimated Annual Losses of Quality-Adjusted Life Years (QALYs) Due to 14 Foodborne Pathogens in the United States. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 11, n. 5, p. 395–402, 2014.

BERGE, A. C. B.; MOORE, D. A.; BESSER, T. E.; SISCHO, W. M. Targeting therapy to minimize **antimicrobial** use in preweaned calves: effects on health, growth, and treatment costs. **Journal of dairy science**, v. 92, n. 9, p. 4707–4, 2009.

BERGLUND, B. Environmental dissemination of antibiotic resistance genes and correlation to anthropogenic contamination with antibiotics. **Infection ecology and epidemiology**, v. 5, 2015.

BETTELHEIM, K. A.; KUZEVSKI, A.; GILBERT, R. A.; KRAUSE, D. O.; McSWEENEY, C. S. The diversity of *Escherichia coli* serotypes and biotypes in cattle faeces. **Journal of Applied Microbiology**, n. 98, p.699–709, 2005.

BHAN, M. K. ; SAZAWAL, S. ; RAJ, P. ; BHANDARI, N. ; KUMAR, R. ; BHARDWAJ, Y. ; SHRIVASTAVA, R.; BHATNAGAR, S. Aggregative *Escherichia coli*, Salmonella, and Shigella are associated with increasing duration of diarrhea. **The Indian Journal of Pediatrics**, v. 56, n. 1, p. 81–6, 1989.

BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; MORA, A.; DAHBI, G.; ALONSO, M. P.; GONZÁLEZ, E.A.; BERNÁRDEZ, M. I.; BLANCO, J. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (eae-xi). **Journal of Clinical microbiology**, v. 42, p. 645–651, 2004.

BRAEYE, T.; DENAYER, S.; DE RAUW, K.; FORIER, A.; VERLUYTEN, J.; FOURIE, L. et al. Lessons Learned from a Textbook Outbreak: EHEC-O157:H7

Infections Associated with the Consumption of Raw Meat Products, June 2012, Limburg, Belgium. **Archives of Public Health**, v. 72, 2014.

BRYAN, F. L. **Risks of practices and processes that lead to outbreaks of food-borne diseases**. Journal of Food Protection, v.51, n.8, p.663–673, 1998.

BRZUSZKIEWICZ, ELZBIETA et al. Genome Sequence Analyses of Two Isolates from the Recent *Escherichia coli* Outbreak in Germany Reveal the Emergence of a New Pathotype: Entero-Aggregative-Haemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC). **Archives of Microbiology**, v. 193, n. 12, p. 883–891, 2011.

CAMPOS, L. C.; FRANZOLIN, M. R.; TRABULSI, L. R. Diarrheagenic *Escherichia coli* among the traditional enteropathogenic *E. coli* groups – a review. **Memórias do. Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 6, p. 545–552, 2004.

CENTER FOR DISEASES CONTROL (US). 2009. **Food Safety**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/briefing/fncidod/eid/voln05/mead.htm>>. Acesso em: 07 mai. 2017.

CLERMONT O.; BONACORSI S.; BINGEN E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4555–58, 2000.

CLERMONT, O.; CHRISTENSON, J.K.; DENAMUR, E.; GORDON, D.M. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups, **Environmental Microbiology Reports**. v.5, n.1, p. 58–65, 2013.

CONEDERA, G.; MATTIAZZI, E.; RUSSO, F.; CHIESA E. SCORZATO, I; GRANDESSO, S.; BESSEGATO, A.; FIORAVANTI, A.; CAPRIOLI, A. A family outbreak of *Escherichia coli* O157 haemorrhagic colitis caused by pork meat salami. **Epidemiology and Infection**, v. 135, p. 311–314, 2007.

CROXEN, M. A.; LAW, R. J.; SCHOLZ, R.; KEENEY, K. M.; WLODARSKA, M.; FINLAY, B.B. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, p. 822–80, 2013.

DIETZE, K. **Pigs for prosperity**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. v. 15, 2011.

DONNENBERG, MICHAEL S.; B. BRETT FINLAY. Combating Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Infections: The Way Forward. **Trends in microbiology**, v.7, n. 21, p. 317–319, 2013.

DOYLE, MICHAEL P.; BUCHANAN, ROBERT L. Food Microbiology: **Fundamentals and Frontiers**. 3. ed. New York: Asm Press, 2007.

ELDER, R. O.; KEEN, J. E.; SIRAGUSA, G. R.; BARKOCY-GALLAGHER, G. A.; KOOHMARAIE, M.; LAEGREID, W. W. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcass of beef cattle during processing. **Applied Biological Sciences**, v.97, n.7, p. 2999–3003, 2000.

FAO, Food and Agriculture Organization. 2005. **Code of hygienic practice for meat**. (CAC/RCP 58–2005). Codex Alimentarius, FAO, Rome.

FAO/OIE/WHO. High-Level Technical Meeting to Address Health Risks at the Human-Animal-Ecosystems Interfaces. **Geneva: World Health Organization**, 2012.

FDA Center for Veterinary Medicine . 2010 Summary Report on Antimicrobials Sold or Distributed for Use in Food-Producing Animals. US Food and Drug Administration, 2010.

FOCACCIA, R. V. **Tratado de Infectologia**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2005. p. 984–989.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182p.

FRENZEN, P. D.; DRAKE, A.; ÂNGULO, F. J. Economic cost of illness due to *Escherichia coli* O157 infections in the United States. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 12, p. 2623–2630, 2005.

FRYE, J.G., AND C.R. Jackson. 2013. Genetic mechanisms of antimicrobial resistance identified in *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, and *Enterococcus* spp. Isolated from U.S. food animals. **Front. Microbiol.** v.4, p.135.

GLASS-KAASTRA, S. K. PERAL, D. L.; REID-SMITH, R.; et al. Multiple-class antimicrobial resistance surveillance in swine *Escherichia coli* F4, *Pasteurella multocida* and *Streptococcus suis* isolates from Ontario and the impact of the 2004–2006 Porcine Circovirus type-2 Associated Disease outbreak. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 113, n. 2, p. 159–64, 2014.

GORDON, D. M.; CLERMONT, O.; TOLLEY, H.; DENAMUR, E. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. **Environmental Microbiology**, v. 10, p. 2484–96, 2008.

GOULD, L. H.; MODY, R. K.; ONG, K. L.; CLOGHER, P.; CRONQUIST, A. B.; GARMAN, K. N. et al. Increased recognition of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States during 2000-2010: epidemiologic features and comparison with *E. coli* O157 infections. **Foodborne Pathogens and Diseases**, v. 10, p. 453–460, 2013.

GYLES C.L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 45–62, 2007.

HAMMERUM, A.M., HEUER, O.E. **Human health hazards from antimicrobial-resistant *Escherichia coli* of animal origin.** Clin. Infect. Dis. 48:916–921, 2009.

HEBBELSTRUP, J. B.; OLSEN, K. E.; STRUVE, C.; KROGFELT, K. A., PETERSEN, A. M. Epidemiology and Clinical Manifestations of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 3, p. 614–630, 2014.

HERMAN, K. M.; HALL, A. J; GOULD, L. H. Outbreaks Attributed to Fresh Leafy Vegetables. **Epidemiology and infection**, v. 143, n. 14, p. 3011–3021, 2015.

HERNANDES, R. T.; ELIAS, W. P.; VIEIRA, M. A. M.; GOMES, T. A. T. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 297, p. 137–149, 2009.

HERZER, P.J.; INOUE, S.; INOUE, M.; WHITTAN, T.S. Phylogenetic distribution of branched RNS-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 172, p. 6175–81, 1990.

HITCHINS, A. D.; FENG, P.; WATKINS, W. D.; RIPPEY, S. R.; CHANDLER, L. A. *Escherichia coli* and the coliform bacteria. In: Food and Drug Administration. **Bacteriological Analytical Manual**, p. 401–406, 1995.

HOFFMANN, S.; MACULLOCH, B.; BATZ, M. Economic Burden of Major Foodborne Illnesses Acquired in the United States. **Economic Information Bulletin EIB-140**. 2005. 59 p.

HONISH, L.; PUNJA, N.; NUNN, S.; NELSON, D.; HISLOP, N.; GOSSELIN, G.; STASHKO, N.; DITTRICH, D. *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with contaminated pork products. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 43, n. 1, p. 21–24, 2017.

Iowa State University Center for Food Security and Public Health. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* and Other *E. coli* Causing Hemolytic Uremic Syndrome. **Center for Food Security and Public Health Technical Factsheets**, 2016.

JAUREGUY, F.; LANDRAUD, L.; PASSET, V.; DIANCOURT, L.; FRAPY, E.; GUIGON, G. et al. Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. **BMC Genomics**, v. 9, p. 560, 2008.

JAY, M. T.; GARRETT, V.; MOHLE-BOETANI, J. C.; BARROS, M.; FARRAR, J. A.; RIOS, R.; ABBOTT, S.; SOWADSKY, R.; KOMATSU, K.; MANDRELL, R.; SOBEL, J.; WERNER, S. B. A Multistate Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infection Linked to Consumption of Beef Tacos at a Fast-Food Restaurant Chain. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, p. 1–7, 2004.

JO M. Y., KIM J. H. , LIM J. H. , KANG M. Y., KOH H. B., PARK Y. H. , YOON D. Y., CHAE J. S., EO S. K., LEE J. H. Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* O157 from major food animals in Korea. **International Journal of Food Microbiology**, v. 95, p. 41–49, 2004.

JOHNSON, K. E.; THORPE, C. M.; SEARS, C. L. The emerging clinical importance of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, p. 1587–1595, 2006.

KAPER, J.B., NATARO, J.P., & MOBLEY, H.L.T. **Pathogenic *Escherichia coli***. *Nature Reviews of Microbiology*, v. 2, p.123–140, 2004

KARMALI, M. A.; STEELE, B. T.; PETRIC, M.; LIM, C. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. **Lancet**, v. 19, n. 1, p. 619–20, 1983.

KOLUMAN, A., and DIKICI, A. **Antimicrobial resistance of emerging foodborne pathogens: status quo and global trends**. *Crit. Rev. Microbiol.* 39:57–69, 2013.

KONOWALCHUK, J.; SPEIRS, J. L.; STARVIC, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 18, n. 3, p. 775–779, 1977.

LANATA, C. F.; FISCHER-WALKER, C. L.; OLASCOAGA, A. C.; TORRES, C. X.; ARYEE, M. J.; BLACK, R. E, CHILD HEALTH EPIDEMIOLOGY REFERENCE GROUP OF THE WORLD HEALTH ORGANIZATION AND UNICEF. Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. **PLoS ONE**, v. 8, 2013.

LI M.C., WANG F., LI F. **Identification and molecular characterization of antimicrobial-resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from retail meat products.** *Foodborne Pathogens and Disease*, v. 8, p. 489–493, 2011.

LIU, Z.; ZHANG, Z.; YAN, H.; LI, J.; SHI, L. Isolation and molecular characterization of multidrug-resistant Enterobacteriaceae strains from pork and environmental samples in Xiamen, China. *Journal of Food Protection*, v. 78, p. 78–88, 2015.

MACDONALD, D. M.; FYFE M.; PACCAGNELLA, A.; TRINIDAD, A.; LOUIE, K.; PATRICK, D. *Escherichia coli* O157: H7 outbreak linked to salami, British Columbia, Canada, 1999. *Epidemiology and Infection*, v. 132, p. 283–289, 2004.

MACKENZIE, M.; RAE, N.; NATHWANI, D. Outcomes from global adult outpatient parenteral antimicrobial therapy programmes: A review of the last decade. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 43, n. 1, p. 7–16, 2014.

MACZULAK, ANNE. *Encyclopedia of microbiology*. New York: Facts On File. 858 p., 2011.

MAINIL, J. G.; DAUBE, G. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animal, humans and foods: who's who? *Journal of Applied Microbiology*, v. 99, n. 6, p. 1332–44, 2005.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Quantitativo de Animais Abatidos por Categoria e UF, 2017. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/sif/servico-de-inspecao-federal-sif#section-2>. Acesso em: 18 jul. 2018.

MARON, D. F.; SMITH, T. J. S.; NACKMAN, K. E. Restrictions on antimicrobial use in food animal production: an international regulatory and economic survey. *Global Health*, v. 9, p. 48, 2013.

MCDANIEL, T. K.; JARVIS, K. G.; DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, p. 1664–68, 1995.

MENG, J.; DOYLE, M.P.; ZHAO, T.; ZHAO S. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. p. 193–213, 2001.

MS/SVS. Ministério da Saúde; Secretaria de Vigilância em Saúde. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, 2017.

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

NORRBY, S. R.; NORD, C. E.; FINCH, R.; European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Lack of development of new antimicrobial drugs: a potential serious threat to public health. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 5, n. 2, p. 115–9, 2005.

O'BRIEN, A. D.; LA VECK, G. D.; THOMPSON, M. R.; FORMAL, S. B. Production of Shigella dysenteriae type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 146, n. 6, p. 763–69. 1982.

OCHOA T. J.; BARLETTA, F.; CONTRERAS, C, et al. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, p. 852–6, 2008.

PADHYE, N. V.; DOYLE, M. P.. *Escherichia coli* O157:H7: epidemiology, pathogenesis and methods for detection in food. **Journal of Food Protection**, v. 55, p. 555–65, 1992.

PASTORE, A. P. W. Análise da resistência a antibióticos e determinação dos grupos filogenéticos em isolados de *Escherichia coli* de origem ambiental, humana e

animal. 2015.Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, 2014.

RANGEL, J. M., P. H. SPARLING, C. CROWE, P. M. GRIFFIN, AND D. L. SWERDLOW. 2005. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982–2002. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, p. 603–609, 2005.

RILEY, L. W.; REMIS, R. S.; HELGERSON, S. D.; MCGEE, H. B.; WELLS, J. G.; DAVIS, B. R.; HEBERT, R. J.; OLCOTT, E. S.; JOHNSON, L. M.; HARGRETT, N. T.; BLAKE, P. A.; COHEN, M. L. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **New England Journal of Medicine, Waltham**. v. 308, n. 12, p. 681–85, 1983.

ROBERT KOCH INSTITUTE. Report: Final presentation and evaluation of epidemiological findings in the EHEC O104:H4 outbreak, Germany 2011, 2011.

ROBINS-BROWNE, R. M. Traditional enteropathogenic *Escherichia coli* of infantile diarrhea. **Reviews of infectious diseases**, v. 9, n. 1.p. 28–53, 1987.

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R. M.; ÂNGULO, F. J.; TAUXE, R.V.; WIDDOWSON, M. A.; ROY, S. L.; JONES, J. L.; GRIFFIN, P. M. Foodborne illness acquired in the United States -major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 7–15, 2011

SEIFFERT, S. N.; HILTY, M.; PERRETEN, V.; ENDIMIANI, A. Extended-spectrum cephalosporin-resistant Gram-negative organisms in livestock: an emerging problem for human health? **Drug resistances updates**, v. 16, n.1-2, p. 22–45, 2013.

SENERWA, D.; OLSVIK, O.; MUTANDA, L. N.; LINDQVIST, K. J.; GOTHUMA, J. M.; FOSSUM, K.; WACHSMUTH, K. Enteropathogenic *Escherichia coli* serotype O111:HNT isolated from preterm neonates in Nairobi, Kenya. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 307–311, 1989.

SHEKJ, C. S.; DESHMUKH, V. V.; WAGHAMARE, R. N.; MARKANDEYA, N. M.; VAIDYA, M. S. Isolation of pathogenic *Escherichia coli* from buffalo meat sold in Parbhani city, Maharashtra, India. **Veterinary World**, v. 6, n. 5, p. 277–79, 2013.

SILLEY, P.; JONG, A.; SIMJEE, S. Harmonisation of resistance monitoring programmes in veterinary medicine: an urgent need in the EU? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 37, p. 504–12, 2011.

TALBOT, G. H.; BRADLEY, J.; EDWARDS, J. E.; GILBERT, D.; SCHELD, M.; BARTLETT, J. G. Bad Bugs Need Drugs: An Update on the Development Pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America, **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. 5, p. 657–668, 2006.

TENAILLON, O.; SKYRNIK, D.; PICARD, B.; DENAMUR, E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 207–17, 2010.

TOZZOLI, R.; GRANDE, L.; MICHELACCI, V.; FIORAVANTI, R.; GALLY, D.; XU, X.; LA RAGIONE, R.; ANJUM, M.; WU, G.; CAPRIOLI, A.; MORABITO, S. Identification and characterization of a peculiar vtx2-converting phage frequently present in verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 isolated from human infections. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 7, p. 3023–32, 2014.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 5ª ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

TROTZ-WILLIAMS, L. A.; MERCER, N. J.; WALTERS, J. M.; MAKI, A. M.; JOHNSON, R. P. Pork implicated in a Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 outbreak in Ontario, Canada. **Canadian Journal of Public Health**, v. 103, n. 5, p. 322–6, 2012.

UD-DIN, ABU.; SYEDA, W. Relationship among Shigella Spp. and Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and Their Differentiation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 4, p.1131–1138, 2014.

USDA. United States Department of Agriculture. World agricultural outlook board. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/advQuery>. Acesso em: 22 de maio de 2018.

VAN, T. T. H.; MOUTAFIS, G.; COLOE, P. J. Antibiotic resistance in food-borne bacterial contaminants in Vietnam. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 24, p. 7906–11, 2007.

VARNAM, A. H.; EVANS, M. G. Foodborne pathogens. An illustrated text. Marison Publishing, 501p., 1996.

WANG, L.; NAKAMURA, H.; KAGE-NAKADAI, E.; HARA-KUDO, E.; NISHIKAWA, Y. Comparison by multilocus variable-number tandem repeat analysis and antimicrobial resistance among atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from food samples and human and animal faecal specimens. **Journal of Applied. Microbiology**, v. 122, p. 268–278, 2016.

XU, X., CUI, S., ZHANG, F., LUO, Y., GU, Y., YANG, B., et al. Prevalence and characterization of cefotaxime and ciprofloxacin co-resistant *Escherichia coli* isolates in retail chicken carcasses and Ground Pork, China. **Microbial Drug Resistance**, v. 20, p. 73–81, 2014.

ZEN, S. de et al. **Suinocultura brasileira avança no cenário mundial**. CNA Brasil – Boletim Ativos Suinocultura, CNA em parceria com o Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (Cepea/Esalq-USP), v. 1, n. 1, 2015.

ZORN, B. G., ESCUDERO, J.A. **Ecology of antimicrobial resistance: humans, animals, food and environment**. International Microbiology, v. 15, p.101–109, 2012.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Investigar e identificar os diferentes patotipos de *E. coli* diarréiogênica em fezes de suínos coletados em abatedouro-frigorífico da região da Zona da Mata – MG e avaliar o grau de resistência a antibióticos destes isolados.

Objetivos específicos

1. Identificar os diferentes patotipos de *E.coli* isoladas de fezes de suínos;
2. Determinar o grupo filogenético (A, B1, B2, D) dos patotipos identificados;
3. Classificar fenotipicamente a resistência a antibióticos dos patotipos isolados.

CAPÍTULO 2. Presença e perfil de resistência a antibióticos de *Escherichia coli* diarreiogênicas obtidas de fezes de suínos

Natália Lourenço Romanholi

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

Trabalho científico a ser enviado à revista Zoonosis and Public Health.

Normas de publicação para o trabalho científico

Zoonosis and Public Health é uma publicação científica internacional publicada em inglês pela empresa John Wiley & Sons. A revista publica artigos de pesquisa e revisão sobre as fontes, transmissão, prevenção e controle de zoonoses relacionados a áreas como microbiologia, virologia, parasitologia e epidemiologia.

O artigo científico deverá conter: Título, Agradecimentos, Resumo e palavras-chave, Impactos, Texto principal contendo: Resumo, Introdução, Materiais e métodos, Resultados, Discussão, Declaração de conflito de interesses, Referências, Legenda (s) da figura, Tabelas com título e notas, Legendas das figuras.

***Escherichia coli* diarreiogênica em suínos**

Presença e perfil de resistência a antibióticos de *Escherichia coli* diarreiogênicas obtidas de fezes de suínos.

ROMANHOLI, N. L.; STRELOW, I. M.; DE AZEVEDO, E. C.; DE ARAÚJO, J. P. A.; MARTINS, B. T. F.; NERO, L. A. ; YAMATOOGI, R. S.*

Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Veterinária, Campus UFV, 36570- 000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

***Escherichia coli* diarreiogênica em suínos**

Palavras-chave: *E. coli*, resistência antimicrobiana, carne suína, PCR multiplex.

*Autor para correspondência: Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Veterinária, Campus UFV, 36570- 000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. RS Yamatogi, Email: ryamatogi@ufv.br

RESUMO

Produtos a base de carne suína são consumidos mundialmente e podem carrear diferentes perigos biológicos, como cepas patogênicas de *Escherichia coli*, responsável por uma variedade de sintomas em humanos, podendo levar à diarreia sanguinolenta e insuficiência renal. O objetivo desse trabalho foi identificar os diferentes patótipos de *E. coli* diarreiogênica em fezes de suínos de animais de terminação em abatedouro-frigorífico localizado na região da Zona da Mata Mineira, determinando os filogrupos patogênicos dos mesmos e avaliando o grau de resistência a antibióticos dos isolados pela classificação fenotípica. *E. coli* diarreiogênica foram identificadas em 12 (10%) suínos, e 17 isolados foram confirmados com PCR multiplex, sendo 70,6% EPEC ($n = 12/17$) e 29,4% ($n = 5/17$) STEC. Os isolados de EPEC e STEC foram caracterizados para identificação de filogrupos (B1, B2, A e D) por PCR multiplex, sendo encontrados os grupos A (23,5%), B1 (23,5%) e B2 (52,9%). Foram comparados dois grupos de isolados, sendo o grupo 1 incluindo cepas de *E. coli* diarreiogênicas e o grupo 2 de *E. coli* comensais. Entre os grupos constatou-se que não houve diferença significativa nos perfis de resistência aos antibióticos. Apesar da baixa ocorrência de *E. coli* diarreiogênica encontrada no presente estudo, destaca-se o potencial patogênico do microorganismo associado à elevada produção de suínos no país, assim como os altos índices de resistência a antibióticos encontrados nos isolados.

Palavras-chave: *E. coli*, resistência antimicrobiana, carne suína, PCR multiplex.

ABSTRACT

Pork products are widely consumed worldwide, but it can carry different biological hazards, like pathogenic strains of *Escherichia coli*, responsible for a variety of symptoms in humans, such as by bloody diarrhea and renal failure. This study aimed the identification of diarrheogenic *E. coli* in feces of farm pigs of finishing and slaughterhouse animals located in the region of Zona da Mata, Minas Gerais, determining the pathogenic phylogenies of the same and evaluating the degree of resistance to antimicrobials of the isolates by phenotypic classification. Diarrheogenic *E. coli* were identified in 12 (10%) pigs, and 17 isolates were confirmed with multiplex PCR, being 70.6% EPEC (n = 12/17) and 29.4% (n = 5/17) STEC. The isolates of EPEC and STEC were characterized to Clermont et al. (2000) phylogroup identification (B1, B2, A and D) based on a second multiplex PCR, and the groups A (23,5%), B1 (23,5%) and B2 (52,9%) were found. Two groups of isolates were compared, with group 1 including pig diarrheogenic *E. coli* and commensal *E. coli* group 2. Among the groups that are unable to achieve in our antibiotic resistance profiles. In spite of the low occurrence of diarrheogenic *E. coli* found in the present study, the pathogenic potential of the microorganism associated with the high pig production in the country is highlighted, as well as the high antimicrobial resistance indexes found in the isolates.

Keywords: *Escherichia coli*, antimicrobial resistance, pork meat, multiplex PCR

1. INTRODUÇÃO

O crescimento da suinocultura no Brasil transformou o país em um importante polo de carne suína no mundo, ocupando o 4º lugar em exportação e também em produção da proteína (ABPA, 2018). De acordo com dados do Ministério da Saúde, dentre os microorganismos envolvidos em surtos no Brasil, de 2007 a 2016, as bactérias são as que representam 90,5% do total, sendo que, dentre essa classe de patógenos, *Escherichia coli* é a segunda maior causadora de doenças (SVS/MS, 2016).

Dois grandes grupos de *E. coli* podem ser distinguidos, dependendo da associação estabelecida para com o homem. O primeiro, chamado *E. coli* comensal, tem por habitat o intestino humano, desde o nascimento até a morte. O segundo, o da *E. coli* patogênica, pode causar diferentes tipos de infecção e é constituído por vários patótipos. Os grupos diferem evolutivamente, sendo a diferença principal a presença de genes que codificam os fatores de virulência presentes nos diferentes patótipos (FOCACCIA, 2005).

Ligado a este patógeno, o atual sistema de produção suínica atrelada à elevada demanda de animais, leva à adoção de um sistema intensivo de criação que apresenta alguns fatores como alta lotação de baias, contato direto entre os animais, alta densidade de fezes e compartilhamento de comedouros e bebedouros. Portanto, há facilidade de disseminação de patógenos, e ao mesmo tempo, dificuldade no controle dos mesmos quando já instalados na criação. Os agentes antibióticos são amplamente utilizados como medidas preventivas contra infecções bacterianas em animais de produção, beneficiando a cadeia produtiva pela redução nos índices de mortalidade e morbidade, na terapia de infecções bacterianas (BERGE et al., 2009). Contudo, esse amplo uso atrelado ao uso indevido dos antibióticos em humanos e animais fez com que o índice de bactérias resistentes isoladas em alimentos de origem animal tenha aumentado mundialmente nos últimos anos, o que significa uma ameaça à saúde pública pelo potencial de transferência dos genes de resistência dessas bactérias para outras de significado clínico humano - dentre outros motivos - e consequentemente aumento no número de doenças bacterianas e falhas nos tratamentos.

Dentre as cepas resistentes à antibióticos, algumas são consideradas bactérias multidroga resistentes (MDR) e possuem essa caracterização quando apresentam não suscetibilidade a pelo menos um agente em 3 ou mais classes de antibióticos (MAGIORAKOS et al., 2012). As cepas resistentes de *E. coli* estão emergindo globalmente como uma ameaça ao resultado favorável de infecções comuns em ambientes comunitários e hospitalares. Essas condições, particularmente, estão aumentando nos países em desenvolvimento ou nos de terceiro mundo, que freqüentemente usam agentes antibióticos em animais e humanos, onde pessoas sem supervisão e sem tomar a prescrição médica consomem antibióticos (BASHIR et al., 2011; CAO et al., 2011).

Considerando que o principal reservatório de *E. coli* é a espécie bovina, mas que a carne suína é a mais consumida no mundo e que existem poucos dados relacionados à frequência de *E. coli* diarreiogênica em suínos no Brasil e no mundo, o presente estudo foi identificar e caracterizar os patótipos de *E. coli* em fezes suínas e verificar o perfil de resistência a diversos antibióticos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta de amostras

Durante o período de julho a outubro de 2017, foram coletados um total de 120 amostras de fezes oriundas de suínos de terminação abatidos em abatedouro-frigorífico sob inspeção federal da região da Zona da Mata. No total, 6 coletas em dias diferentes foram realizadas e a cada lote foram amostrados 6 animais provenientes das cidades de Ponte Nova, Piranga, Urucânia e Jequeri. As amostras de fezes foram adquiridas por meio da técnica de suabe na região retal, durante a etapa de inspeção do intestino. O material coletado foi armazenado em tubos de ensaio contendo 7 mL do meio de transporte Cary Blair estéril, previamente identificados, e alocados em caixas isotérmicas refrigeradas com gelo reciclável para análises posteriores no laboratório de produtos de origem animal - INSPOA no Departamento de Veterinária – DVT/UFV. Os lotes pertencentes às amostras coletadas foram identificados no momento da coleta para a identificação da origem e obtenção dos dados locais de manejo.

2.2 Isolamento de *Escherichia coli*

As amostras (meio de transporte + *swabs*) oriundas do frigorífico foram semeadas em Ágar MacConkey, apropriado para o isolamento de *E. coli* e incubados por aproximadamente 24 horas a 35°C (±2°C). Decorrido esse tempo, foram selecionadas 5 colônias fermentadoras de lactose com morfologia típicas para *E. coli* e uma colônia não fermentadora de lactose de cada tipo morfológico, sendo cada colônia previamente identificado. Posteriormente, todas as colônias suspeitas selecionadas foram identificadas bioquimicamente como *E. coli* por meio do EPM (Escola Paulista de Medicina), MILi (motilidade, indol e lisina) e Citrato de Simmons (TOLEDO et al., 1982a; TOLEDO et al., 1982b). As amostras confirmadas como *E. coli* foram armazenadas em ágar nutriente e caldo BHI (Infusão de cérebro coração) com glicerol 15% e incubados a 35°C/24h.

2.3 Identificação dos patótipos através da Reação em Cadeia da Polimerase – PCR multiplex

As cepas identificadas bioquimicamente como *E. coli* foram investigadas quanto a presença de genes de virulência associados aos diferentes patótipos através da PCR e classificados conforme tabela 1. Cabe salientar que o patótipo ETEC são patogênicos aos suínos e devido ao abate somente de animais sadios a pesquisa deste patótipo foi descartado.

Tabela1. Patotipos de *E. coli* e marcadores de virulência frequentemente utilizados para identificação

Patotipo de <i>E. coli</i>	Marcadores de virulência
<i>E. coli</i> enteropatogênica (EPEC)	Região LEE (<i>eae</i>)
<i>E. coli</i> produtoras da toxina stx (STEC)	Gene Stx (<i>stx1/stx2</i>)
<i>E.coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	Região LEE (<i>eae</i>) e gene <i>Stx</i>
<i>E.coli</i> enteroinvasiva (EIEC)	Plasmídeo Inv (<i>ipaH</i>)
<i>E.coli</i> enteroagregativa (EAEC)	Plasmídeo EAEC (<i>aggR</i>)

A partir do material armazenado em caldo BHI, foi separada uma alíquota de 200 µL em um microtubo de 0,5 mL. O produto foi centrifugado a 10.000g por 10 minutos e o sobrenadante desprezado. O pelete foi ressuspensionado em água nuclease free, homogenizado e aquecido até a temperatura de 99°C em bloco seco

para o rompimento da parede bacteriana e liberação do material genético. Em seguida, o produto foi centrifugado a 10.000g por 5 minutos e o sobrenadante coletado e armazenado a -20°C em microtubo de 1,5 mL. O restante do caldo BHI cultivado foi congelado em temperatura adequada (-20°C) para etapas posteriores.

Para a realização da amplificação foi utilizado o mix GoTaq® Green Master Mix (Promega) conforme recomendações do fabricante e primers conforme Toma et al. (2013) visualizados na tabela 1. O programa utilizado foi desnaturação inicial de 95°C por 7 minutos, 30 ciclos de desnaturação de 95° por 20 segundos, anelamento de 52°C por 20 segundos e extensão de 72°C por 30 segundos. Após os ciclos, foi realizado uma extensão final de 72°C por 7 minutos.

Tabela 2. Relação de primers conforme Aranda et al. (2007) para identificação dos patótipos de *E. coli*.

Genes de virulência	Primers (5'-3')	Alvo	Amplicom (pb)	Conc. (pmol)
eae1	CTGAACGGCGATTACGCGAA	eae	917	10
eae2	CGAGACGATACGATCCAG			
aggRks1	GTATACACAAAAGAAGGAAGC	aggR	254	2,5
aggRks2	ACAGAATCGTCAGCATCAGC			
IpaH1	GTTCCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC	ipaH	600	1
IpaH2	GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC			
Vtcom-u	GAGCGAAATAATTTATATGTG	stx1/stx2	518	6
Vtcom-d	TGATGATGGCAATTCAGTAT			

Os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão 0,5X de ácido bórico-Tris-EDTA (TBE) e revelados com Unisafe® conforme recomendação do fabricante. Os fragmentos de DNA foram analisados comparativamente com marcadores de DNA de 100 bp (Promega), sendo analisados e fotografados em analisador de imagens (L PIX – Loccu Biotecnologia). Em todas as reações realizadas foram utilizados um controle negativo, através da substituição da amostra por água livre de nucleases e um controle positivo para cada gene incorporado na identificação dos patótipos. Como controle interno, foi utilizada nas amostras, a avaliação do marcador genético *RNA 16S* com auxílio dos primers segundo Greisen et al. (1994).

2.4 Determinação de grupos filogenéticos de *E. coli* diarreio gênicas

Os isolados considerados *E. coli* diarreio gênicos foram testadas para os genes *chuA*, *YjaA*, *TspE4C2* and *gadA* através da PCR multiplex para caracterização em grupos filogenéticos (A, B1, B2 e D) conforme Doumith et al. (2012). O DNA foi obtido conforme o item 2.3. Para a realização da amplificação foi utilizado o mixGoTaq® Green Master Mix (Promega®) conforme recomendações do fabricante e primers visualizados na tabela 4. O programa utilizado para a realização da reação consistiu em: desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos; 30 ciclos de 94°C por 30s, 65°C por 30s e 72°C por 30s; e extensão final de 72°C por 7 minutos. Os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão 0,5X de ácido bórico-Tris-EDTA (TBE) e revelados com Syber Green® (0,5 mg/ml - Invitrogen). Os fragmentos de DNA foram analisados comparativamente com marcadores de DNA de 100 bp (Promega), sendo analisados e fotografados em analisador de imagens (L PIX – Loccu Biotecnologia). Em todas as reações realizadas foram utilizados um controle negativo, através da substituição da amostra por água livre de nucleases e um controle positivo para cada gene incorporado na identificação dos patótipos.

Os resultados obtidos a partir da PCR foram classificados conforme árvore decisória de Clermont et al. (2000).

Tabela 3. Primers conforme Doumith et al. (2012) para a determinação do grupo filogenético.

Genes	Primers (5'-3')	Amplicom (pb)
ChuA1	ATGATCATCGCGGCGTGCTG	281
ChuA2	AAACGCGCTCGCGCCTAAT	
YjaA1	TGTTGCGGATCTTGAAAGCAAACGT	216
YjaA2	ACCTGTGACAAACCGCCCTCA	
TspE4C2.1	GCGGGTGAGACAGAAACGCG	152
TspE4C2.2	TTGTCGTGAGTTGCGAACCCG	
gadA1	GATGAAATGGCGTTGGCGCAAG	373
gadA2	GGCGGAAGTCCCAGACGATATCC	

2.5 Triagem da resistência a antibióticos dos isolados de *Escherichia coli*

Um total de 48 isolados de *E. coli* de origem suína (*E. coli* diarreio gênicas; *E. coli* comensais) foram testados quanto à resistência a antibióticos de diferentes classes pela técnica do *breakpoint* (BAE et al., 2005). As concentrações mínimas inibitórias de diferentes antibióticos para determinação de resistência por enterobactérias, foram adquiridas do CLSI (2017), sendo estes: **Ansamicinas:** Rifampicina – RIF (8 µg/mL); **Glicopeptídeos:** Vancomicina – VAN (16 µg/mL); **Aminoglicosídeos:** Gentamicina – GEN (16 µg/mL); Kanamicina – KAN (64 µg/mL); Neomicina – NEO (6 µg/mL); Estreptomicina – EST (32 µg/mL); **Beta-lactâmicos:** Ampicilina – AMP (32 µg/mL); Amoxilina - AMC (32 µg/mL); **Carbapenemas:** Imipenem – IPM (4 µg/mL); **Fenicóis:** Cloranfenicol - CLO (32 µg/mL); **Pleuromutilinas:** Tiamulina – TIA (32 µg/mL); **Quinolonas:** Ácido Nalidíxico – NAL (32 µg/mL) e Ciprofloxacina – CIP (4 µg/mL); **Tetraciclínas:** Tetraciclina – TET (16 µg/mL);

Para a realização do teste, utilizou-se ágar Mueller-Hinton (BD) suplementado com os antibióticos supracitados, em suas concentrações mínimas inibitórias para enterobactérias conforme CLSI (2017) e distribuído em placas de Petri com 150 mm de diâmetro. Posteriormente, alíquotas de 20 µL de cada isolado foram distribuídas em poços de uma placa de ELISA de 96 poços, contendo previamente 180 µL de BHI (BD), e incubados a 35°C por 24h. Após incubação, as culturas obtidas foram transferidas com o auxílio de um *pin-replicator* para as placas contendo ágar Mueller-Hinton suplementado com os diferentes antibióticos. As placas foram incubadas a 35°C e avaliadas quanto ao crescimento de colônias após 24h. Os isolados que apresentaram crescimento foram considerados resistentes ao antibiótico na concentração testada. Todos os testes foram conduzidos em duplicata, e considerando os seguintes controles: uma placa de Ágar Mueller-Hinton sem antibióticos foi utilizada para verificação da viabilidade das culturas avaliadas, poços não inoculados foram utilizados como controle de contaminação em cada placa e *E. coli* ATCC 25922 foi utilizado como controle de resistência.

2.6 Análise Estatística

A frequência dos patótipos de *E. coli* diarreio gênica assim como dos filogrupos foram avaliados na forma descritiva. Para avaliação da resistência antimicrobiana entre os isolados patogênicos e não patogênicos, utilizou-se o teste de Chi-Quadrado para comparar a proporção de resistência a cada antibiótico testado (1 = resistente e 0 = sensível). A análise estatística foi realizada com o programa R (STUDIO, 2012), sendo a significância estatística definida como $P < 0.05$.

3. RESULTADOS

3.1 Frequência

Foram obtidos 471 isolados compatíveis com *E. coli*, após realização de análises bioquímicas das amostras coletadas. Através da técnica de PCR multiplex para pesquisa de genes de patogenicidade, *E. coli* diarreio gênicas foram identificadas em 12 suínos (10%), sendo 12 isolados pertencentes ao patótipo EPEC ($n = 12/17$) e 5 ao patótipo STEC ($n = 5/17$).

A ocorrência apresentada de *E. coli* diarreio gênica nos 120 animais amostrados, foi de 6,6% para EPEC e 3,3% STEC. A partir dos lotes (granjas) avaliados, 15,4% apresentaram o patótipo STEC, enquanto 38,5% apresentaram EPEC.

Tabela 4. Frequência de *E.coli* diarreio gênicas, STEC e EPEC encontradas em abatedouro-frigorífico de suínos da região da Zona da Mata, Minas Gerais, Brasil

Amostras	TOTAL	STEC	EPEC	ECD
Colônias	471	1,1% (5)	2,6% (12)	3,6% (17)
Animais	120	3,3% (4)	6,6% (8)	10% (12)
Lotes	13	15,4% (2)	38,5% (5)	53,8% (7)

3.2 Filogrupos

Os dados relacionados à caracterização do filogrupo a partir dos 17 isolados de suínos (EPEC e STEC), foram realizados através da PCR multiplex e apresentaram

o grupo B2 (52,9%) como os mais frequentes, seguidos dos grupos A e B1, com a representatividade de 23,5% cada (tabela 5).

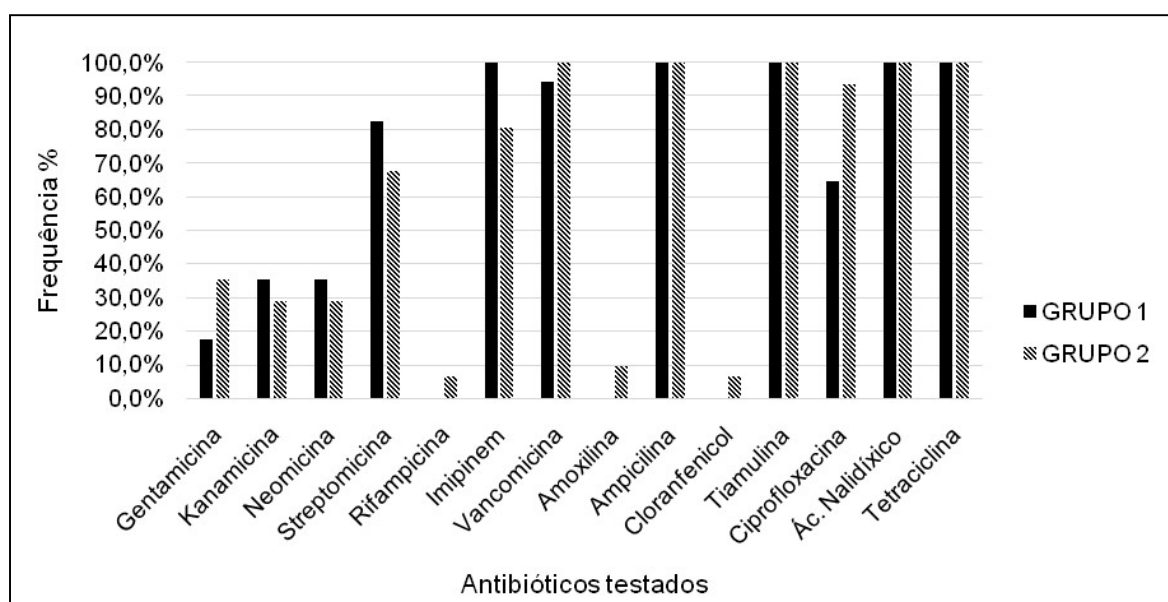
Tabela 5. Frequência dos filogrupos de Clermont et al. (2000) a partir dos isolados de STEC e EPEC suínos

Tipos de amostra	FILOGRUPO % (n)				Total de Isolados
	A	B1	B2	D	
ECD*	23,5% (4)	23,5% (4)	52,9% (9)	0% (0)	17
STEC	25% (1)	25% (1)	50% (2)	0% (0)	4
EPEC	23,1% (3)	23,1% (3)	53,8% (7)	0% (0)	13

* ECD - *E. coli* diarreio gênicas

3.3 Resistência a antibióticos

E. coli STEC e EPEC encontradas neste estudo apresentam um padrão de resistência preocupante. Avaliando os resultados apresentados na Figura 1, verifica-se que independente da característica do isolado (*E. coli* diarreio gênicas - ECD, *E. coli* comensais), os mesmos apresentaram um padrão de resistência bem semelhantes ($P>0,05$).



GRUPO 1: *E. coli* diarreio gênicas. GRUPO 2: *E. coli* comensais

Figura 1. Comparação dos índices de resistência dos diferentes grupos de *E. coli* de suínos

Além da alta resistência entre os antibióticos testados, um ponto preocupante foi o alto número de resistência quanto à classe dos antibióticos testados,

possibilitando classificar as cepas em Multidroga Resistentes – MDR e com perfis multivariados (Tabela 6). Segundo dados do Departamento de Agricultura dos estados Unidos (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos) - USDA (2012), bactérias multidroga resistentes - MDR são aquelas que apresentam resistência à no mínimo três classes de antibióticos.

Tabela 6. Perfil de resistência aos antibióticos testados dos isolados de *E.coli* diarreio gênicas de suínos

Cepas	Nº isolados	Perfil de resistência
Suíno	5	STR+IPM+VAN+AMP+TIA+CIP+NAL+TET
	3	STR+IPM+VAN+AMP+TIA+NAL + TET
	2	KAN+NEO+STR+IPM+VAN+AMP+TIA+NAL+TET
	1	GEN+KAN+NEO+STR+IPM+VAN+AMP+TIA+CIP+NAL + TET
	1	GEN+NEO+STR+IPM+VAN+AMP+TIA+CIP+NAL + TET
	1	GEN+STR+IPM+VAN+AMP+TIA+CIP+NAL + TET
	1	KAN+NEO+IPM+AMP+TIA+CIP+NAL+TET
	1	KAN+NEO+STR+IPM+VAN+AMP+TIA+CIP+NAL+TET
	1	CAN+IPM+VAN+AMP+TIA+NAL + TET
	1	IPM+VAN+AMP+TIA+CIP+NAL+TET

Estreptomicina (EST), imipenem (IPM), vancomicina (VAN), ampicilina (AMP), tiamulina (TIA), ciprofloxacina (CIP), ácido nalidíxico (NAL), tetraciclina (TET), kanamicina (KAN), neomicina (NEO), gentamicina (GEN), amoxicilina (AMC).

4. DISCUSSÃO

4.3 Frequência

A baixa frequência descrita neste trabalho parece ser comum em suínos. Estudos realizados no Brasil, especificamente no estado do Mato Grosso, Martins e colaboradores encontraram também uma baixa ocorrência, descrevendo 1,4% (uma amostra positiva) para STEC, um total de 74 amostras fecais obtidas de intestino suíno em abatedouros (MARTINS et al., 2011). No estado de São Paulo, estudo executado por Borges e colaboradores obteve uma prevalência de 0,4% (um isolado) STEC, recuperado de 215 amostras de carcaças de suínos e 3,5% / 3,2% EPEC, obtidos nas fezes e carcaças suínas, respectivamente (BORGES et al., 2012).

Os dados internacionais para esses patótipos não diferem do foi encontrado neste trabalho. Na China, um estudo relatou 10 (2,1%) isolados de STEC

recuperados de 487 swabs retais de suínos em uma instalação de abate em Hong Kong (LEUNG et al., 2001). No Japão, um relatório da vigilância nacional do país, afirmou que 32 (14%) isolados de STEC foram recuperados de 179 amostras fecais de suínos, em um estudo realizado durante o período de 1999 a 2001 (KIJIMA-TANAKA et al., 2005). Em um amplo estudo realizado entre o período de 1985 a 2000, onde foram analisadas, dentre outras espécies, amostras de suínos dos Estados Unidos, Porto Rico, Coréia do Sul e Hungria, foi encontrado uma baixa prevalência, de 5.7% (n=70) de STEC (SCHROEDER et al., 2002). Em alguns países a prevalência desses agentes é tão reduzida que não são detectados como, por exemplo, no Peru que após análise de 112 animais não se encontrou os patótipo STEC (RIVERA et al., 2012).

No entanto, alguns estudos apresentaram dados com uma maior frequência. Estudos conduzidos na Itália, encontraram em amostras de fezes suína um total de 38,6% de amostras positivas e 13,8% das carcaças contaminadas por este mesmo agente (ERCOLI et al., 2016). Outro estudo conduzido nos Estados Unidos também apresentou uma alta prevalência de STEC, sendo que 68,3% dos animais amostrados (n=120) eliminaram o patógeno no mínimo uma vez durante o período de terminação (CHA et al., 2018).

Diversos fatores como raça, idade, sexo e estado imunológico dos animais afetam diretamente a frequência do patógeno (Callaway et al., 2009; Farrokh et al., 2013; Kulow et al., 2012), assim como diversos estudos apontam a sazonalidade como um fator principal, sendo que, em suínos, autores como Cha et al., (2018) obtiveram uma frequência de STEC 30% maior no inverno, e Khan et al., (2018), encontraram uma maior frequência e uma maior eliminação do patógeno no verão.

Outro ponto que pode-se especular pela baixa frequência é a ausência de animais *super shedding*. A grande maioria dos artigos apresentam baixa frequência e não existem relatos destes tipos de animais no caso de *E. coli* dirreioigênicas. O termo *super shedding* caracteriza indivíduos que por um determinado período produzem uma alta quantidade do patógeno do que se comparado à outros indivíduos da mesma espécie e são comuns na espécie bovina, eliminando cerca de até 10^4 UFC/g de fezes (CHASE-TOPPING ET AL., 2008).

4.4 Filogrupos

Considerando o estudo de Clermont, et al. (2000), os resultados sugerem que os isolados estão bem divididos entre o grupo dos comensais e daqueles associados a doenças extraintestinais, já que os grupos A e B1 são associados a isolados comensais e B2 e D, relacionados a doenças extraintestinais.

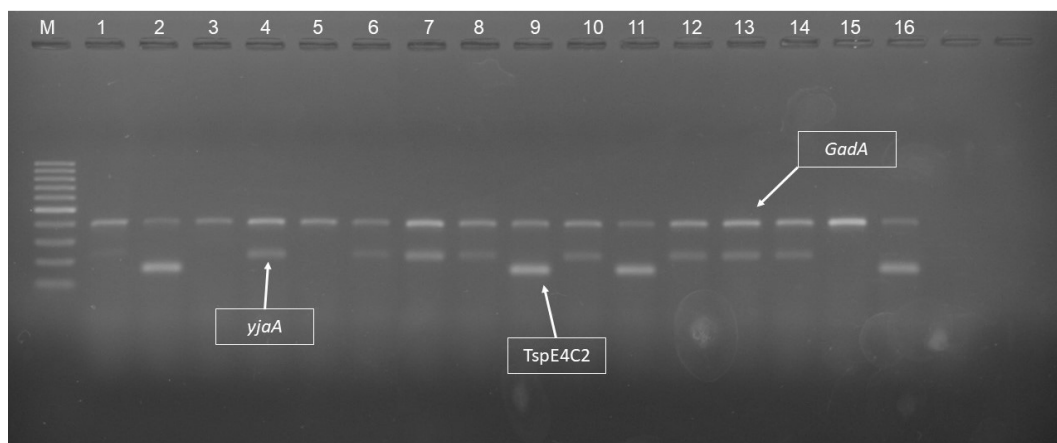


Figura 2. PCR Multiplex para caracterização do filogrupos para os marcadores genéticos *GadA*, *ChuA*, *YjaA*, *TspE4C2*. M-Marcador de peso molecular de 100bp, 2 a 16 amostras testadas.

Em suínos, estudos que relacionem os filogrupos predominantes e *E. coli* ainda são escassos. Alguns estudos conduzidos por (TORRES LUQUE et al., 2017; ZHU et al., 2017) descrevem os grupos A e B2 como os mais prevalentes, corroborando o encontrado neste estudo. No entanto, em suínos, o grupo A parece ser mais frequente, contradizendo os nossos dados, que apresentam o grupo B2 com ocorrência maior.

Um ponto importante dos filogrupos B2 e D identificados nos isolados suínos é a associação destes grupos a doenças extra intestinais. O grupo B2, o mais frequente neste projeto e associado a isolados patogênicos, está diretamente relacionado a problemas de infecções urinárias em humanos (LEE et al., 2016; MIRANDA-ESTRADA et al., 2017) demonstrando que sua circulação estende a vários ambientes e hospedeiros. Além da alta circulação, dados da literatura também apresentam uma alta resistência a diversos antibióticos nestes filogrupos de bactéria, gerando grandes preocupações relacionados a saúde pública.

4.5 Resistência a antibióticos

Os genes de resistência a antibióticos são frequentemente transferidos através de elementos genéticos móveis como plasmídeos e transposons, que garantem a disseminação pela transferência horizontal de genes. De acordo com Stokes & Gillings, (2011), elementos móveis como plasmídeos abrigam muitos genes de resistência que foram encontrados em patógenos clinicamente relevantes no solo e na água como *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Aeromonas*, *Pseudomonas* e *Klebsiella*. Os autores citam ainda que os genes de resistência a antibióticos são uma característica quase universal da biosfera microbiana.

A resistência a diversos antibióticos em *E. coli* isoladas de suínos parece estar bem presente. No Brasil, por exemplo, um estudo envolvendo amostras de carne e dejetos suínos provenientes dos estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais, Paraná e Santa Catarina, encontrou resistência de até 70,6% das cepas com relação à tetraciclina. Já outro estudo conduzido na Irlanda, em que 160 isolados provenientes de 39 leitões foram avaliados, apresentou isolados com até 10% para o cloranfenicol, corroborando os dados deste experimento (Franco et al., 2010; Gibbons et al., 2015). No entanto, estes mesmos pesquisadores encontraram resultados distintos ao presente trabalho, apresentando uma baixa resistência ao antibiótico ampicilina. Franco et al., (2010) apresentaram uma resistência em seus isolados de aproximadamente 23,5 e Gibbons et al., (2015), encontraram até 24,4% dos isolados resistentes à ampicilina.

Estudos realizados na Europa, envolvendo 11 países, 2.000 isolados e um período de 3 anos (2002-2004), encontraram também resultados semelhantes a este estudo. Observou-se um elevado nível de resistência as tetraciclinas (Dinamarca: 91,0% em 2004; Inglaterra: 85% em 2002; Portugal: 98,0% em 2004), estreptomicina (Letônia: 92,0% em 2004; Portugal: 79% em 2002), e ampicilina (Espanha : 72,2% em 2004, Holanda: 93,0% em 2003) (HENDRIKESSEN et al., 2008).

Trabalhos em outros países também apresentam cepas patogênicas com alta resistência. Exemplo disto é o trabalho realizado por Wang et al. (2016) ao analisarem amostras de fezes de 41 suínos em Osaka, no Japão, para isolados de EPEC, em que dentre os antibióticos testados, encontraram o maior índice de resistência para a tetraciclina (51%). Porém, com relação à ampicilina e ácido

nalidíxico, os resultados divergiram deste estudo, pois foram encontrados baixos índices, 7,3% e 7,3% (WANG et al., 2016).

Schroeder et al. (2002) analisaram cepas de *E. coli* O157 isoladas de seres humanos, bovinos, suínos e de alimentos e verificaram que a maior ocorrência de resistência antimicrobiana foi encontrada entre as cepas isoladas de suínos, provenientes dos Estados Unidos, Porto Rico, Coréia do Sul e Hungria. Neste estudo 71% das amostras foram resistentes a tetraciclina, e 24% mostraram-se resistentes a ampicilina.

Neste trabalho, a maioria dos isolados foram classificados como MDR, não diferindo do encontrado na literatura. Diversos pesquisadores também relatam a alta presença de ECD-MDR, principalmente os produtores da toxina shiga (AHMED; SHIMAMOTO, 2015; KENNEDY et al., 2017; NAGY et al., 2015; TORRES LUQUE et al., 2017). Esta situação gera muita preocupação, pois uma infecção por algumas destas bactérias pode ter um tratamento ineficiente devido ao padrão de resistência.

Esta conjuntura é visível na medicina humana para o tratamento de infecções urinárias recorrentes causadas por UPEC. Este grupo bacteriano corresponde ao principal causador de infecção urinária em mulheres e apresenta em sua grande maioria, cepas resistentes, sendo algumas delas MDR (KAHLMETER; POULSEN, 2012; MUTTERS et al., 2018; SCHITO et al., 2009; TABASI et al., 2015). Isto provoca um tratamento complexo, pois até a realização de um antibiograma, o paciente testa alguns protocolos de eleição favorecendo a infecção recorrente.

UPEC estão classificadas como infecções extraintestinais, levantando à hipótese da possível circulação de cepas MDR em humanos originários dos animais, já que no caso de alguns isolados deste trabalho, pertencentes aos grupos B2 e D, são relacionados a doenças extraintestinais.

Os antibióticos testados que apresentaram altos índices de resistência são frequentemente utilizados na prática veterinária e inseridos em algumas granjas da região onde foi realizado este estudo. Esta relação é possível devido às informações obtidas no boletim sanitário do Serviço de Inspeção Federal (SIF). Os antibióticos estão entre os mais utilizados nas granjas, de forma preventiva na fase de terminação, sendo alguns deles: Amoxilina, Tilosina, Doxiciclina, Tiamulina, Colistina, Florfenicol, Enramicina, Norflaxacina, Neomicina e Enrofloxacina. Quanto à tiamulina e neomicina, tal fato coincide com o esperado, pois, à medida que os

medicamentos são cada vez mais utilizados na rotina das granjas, maior a chance de ocorrer resistência nos animais. Para o antibiótico amoxicilina, no entanto, apesar de ser um dos principais medicamentos utilizados rotineiramente, o índice de resistência para suínos, obtido no estudo, foi baixa.

Sabe-se que a resistência a antibióticos é uma característica bacteriana antiga, existente em bactérias do solo e carregada por plasmídeos a milhões de anos antes do início da agricultura, e que, portanto, ela não teve origem na produção de antibióticos agrícolas (MARTINEZ, et al., 2012; ALLEN et. al., 2010). Contudo, o uso inadequado de antibióticos em animais foi reconhecido pela ONU, em 2016, como uma das principais causas do aumento da resistência antimicrobiana. Patógenos resistentes a antibióticos são encontrados em humanos, animais, alimentos e no meio ambiente (na água, no solo e no ar). Eles podem ser transmitidos entre pessoas e animais, incluindo alimentos de origem animal e o contato de pessoa para pessoa. O controle deficiente da infecção, as condições sanitárias inadequadas e o manejo inadequado dos alimentos estimulam a disseminação da resistência antimicrobiana (WHO, 2018).

A esses fatos, pode-se inferir que a resistência em isolados suínos encontrada nesse estudo se deve principalmente ao disseminado uso dos antibióticos em diversas fases da criação dos animais, como comprovado em diversas literaturas (WHO, 2000; LANDERS, et al., 2012; CALLAWAY, et al., 2011; TANG, et al., 2017) e também pelos dados do Serviço de Inspeção Federal, através dos boletins sanitários contendo diversas classes de antibióticos. Nos resultados apresentados, 100% das cepas de suínos apresentaram certa resistência, ainda que mínima, a todos os antibióticos testados.

Uma das outras possíveis origens da resistência a antibióticos discutidas na literatura são o solo e a água. Resíduos sólidos gerados nas fazendas dos animais de produção são usados principalmente como esterco para fertilizar o solo (Ramesh, 2016). No entanto, a maioria dos antibióticos desaparece durante o escoamento e acaba em sistemas aquáticos, como rios e lagos. No ambiente, o solo apresenta-se como o único reservatório de alto potencial de genes de resistência antimicrobiana e a partir desta hipótese, a resistência quando transmitida aos patógenos, poderá relacionar o meio ambiente e a saúde humana em grande extensão (Allen et al., 2010).

Dessa forma, mais trabalhos devem ser realizados na área no intuito de elucidar as diversas causas de resistência a antibióticos em animais de produção, e ao mesmo tempo conciliar a medicina preventiva à produção animal, sem prejuízo à medicina humana no que tange aos tratamentos contra infecções bacterianas.

5. CONCLUSÃO

Os dados obtidos no presente trabalho permitem concluir que os suínos podem ser carreadores de cepas patogênicas de *E. coli*, especialmente STEC, patotipo de maior relevância que os demais pelo seu potencial zoonótico e pela possibilidade de ocasionar quadros clínicos de grande seriedade em humanos.

Os isolados diarreiogênicos apresentaram multiressistência aos antibióticos testados, o que pode ser explicado pelo amplo uso dos medicamentos na produção de suínos. Portanto, o uso racional dos antibióticos, as condições sanitárias na produção e as boas práticas de fabricação na produção dos alimentos são de extrema importância no controle da disseminação dos genes de resistência, uma vez que há um amplo desafio na suinocultura intensiva.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCS. Associação Brasileira de Criadores de Suínos. **Produção de Suínos: teoria e prática** (1ª Edição). ABCS, Brasília, DF, p. 908, 2014.

AHMED A, M.; SHIMAMOTO T. Molecular analysis of multidrug resistance in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated from meat and dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 193, p. 68–73, 2015.

AKOACHERE, J-FTK.; TANIH, N.F., NDIP, L.M., NDIP, R.N. Phenotypic Characterization of Salmonella Typhimurium Isolates from Food-animals and Abattoir Drains in Buea, Cameroon. **Journal of Health, Population, and Nutrition**, v. 27, n. 5, p. 612–618, 2009.

ALLEN H. K.; DONATO, J.; WANG, H. H.; CLOUD-HANSEN, K. A.; DAVIES, J.; HANDELSMAN, J. 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 251–59, 2010.

ALLEN, H. K.; DONATO, J.; WANG, H. H.; CLOUD-HANSEN, K. A.; DAVIES, J., & HANDELSMAN, J. 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 251–259, 2010.

ARANDA, K. R.; FABBRICOTTI, S. H.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETISKY, I. C. Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. **FEMS Microbiology letters**, v.267, n. 2, p. 145-50, 2007.

BASHIR, S.; SARWAR, Y.; ALI, A. et al. Multiple drug resistance patterns in various phylogenetic groups of Uropathogenic *E. coli* isolated from Faisalabad region of Pakistan. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.42, p. 1278-83, 2011.

BHAN, M. K.; RAJ, P.; LEVINE, M. M.; KAPER, J. B.; BHANDARI, N.; SRIVASTAVA, R.; KUMAR, R.; SAZAWAL, S. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with persistent diarrhea in a cohort of rural children in India. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 159, p. 1061–1064, 1989.

BORGES, C.A.; BERALDO, L. G.; MALUTA, R.P.; CARDOZO, M. V.; GUTH, B. E.; RIGOBELLO, E.C.; DE AVILA, F. A. Shiga toxigenic and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in the feces and carcasses of slaughtered pigs. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, p.1119–1125, 2012.

CABAL, A.; PORRERO, M.; DE LA CRUZ, M.; SAEZ, J.; BARCENA, C.; LOPEZ, G.; GORTAZAR, C.; DOMINGUEZ, L.; ALVAREZ, J. Molecular characterization and antimicrobial resistance of STEC strains isolated from healthy cattle in 2011 and 2013 in Spain. **Epidemiology and Infection**, v. 144, n. 14, p. 2956–66, 2016.

CALDERWOOD, S. B.; ACHESON, D. W. K.; KEUSCH, G. T.; BARRETT, T. J.; GRIFFIN, P. M.; STOCKBINE, N. A.; SWAMINATHAN, B.; KAPER, J. B.; LEVINE, M. M.; KAPLAN, B. S.; KARCH, H.; O'BRIEN, A. D.; OBRIG, T. G.; TAKEDA, Y.; TARR, P. I.; WACHSMUTH, I. K. Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. **ASM News, Ann Arbor**, v. 62, p. 118–119, 1996

CALLAWAY, T. R.; EDRINGTON, T. S.; BRABBAN, A.; KUTTER, B.; KARRIKER, L.; STAHL, C. et al. Evaluation of phage treatment as a strategy to reduce *Salmonella* populations in growing swine. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, p. 261–266, 2011.

CAO, X.; CAVACO, L. M.; YUAN, L. V. et al. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility testing of *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections in 20 Chinese hospitals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, p. 2496-501, 2011.

CAPRIOLI, A.; MORABITO, S.; BRUGERE, H. et al. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* emerging issues on virulence and modes of transmission. **Veterinary Research**, v.36, p.289–311, 2005.

CARVALHO, T. M. Diagnostico dos empreendimentos suínos na bacia do rio piranga e o índice de qualidade de águas superficiais, 2014. Dissertação (Mestrado em Sustentabilidade Socioeconômica e Ambiental) – Universidade Federal de Ouro Preto, UFOP, Ouro Preto, 2014.

CENTER FOR DISEASES CONTROL (US). Estimates of Foodborne Illness in the United States. Disponível em: <http://www.cdc.gov/foodborneburden/>. Acesso em: 16 jul. 2018.

CHA, W.; FRATAMICO, P. M.; RUTH, L. E.; BOWMAN, A. S.; NOLTING, J. M.; MANNING, S. D.; FUNK, J. A. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in finishing pigs: implications on public health. **International Journal of Food Microbiology**, v. 264, p. 8–15, 2018.

CHASE-TOPPING, M.; GALLY, D.; LOW, C.; MATTHEWS, L. & WOOLHOUSE, M. Supershedding and the link between human infection and livestock carriage of *Escherichia coli* O157. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 904–912, 2008.

CHENEY, T. E.; SMITH, R. P.; HUTCHINSON, J. P.; BRUNTON, L. A. et al. Cross-sectional survey of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from diseased farm livestock in England and Wales. **Epidemiology and Infection**, v.143, n. 12, p. 2653–59, 2015.

CONEDERA, G.; MATTIAZZI, E.; RUSSO, F.; CHIESA, E.; SCORZATO, I.; GRANDESSO, S.; BESSEGATO, A.; FIORAVANTI, A.; CAPRIOLI, A. A family outbreak of *Escherichia coli* O157 haemorrhagic colitis caused by pork meat salami. **Epidemiology and Infection**, v. 135, p. 311–314, 2007.

DOUMITH, M.; DAY, M. J.; HOPE, R.; WAIN, J.; WOODFORD, N. Improved multiplex PCR strategy for rapid assignment of the four major *Escherichia coli* phylogenetic groups. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, p. 3108-10, 2012.

ERCOLI, L.; FARNETI, S.; ZICAVO, A.; MENCARONI, G.; BLASI, G.; SCUOTA, S. Prevalence and characteristics of verotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from pigs and pork products in Umbria and Marche regions of Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 232, p. 7–14, 2016.

FARROKH, C. et al. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 162, n. 2, p. 190–212, 2013.

FRANCO, R. M.; MANTILLA, S. P. S.; GOUVÊA, R.; OLIVEIRA, L. A.; T. Resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* isoladas de carne e dejetos de suínos. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v. 4, n. 1, p. 31–36, 2010.

KAHLMETER, G.; POULSEN, H. O. Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* from community-acquired urinary tract infections in Europe: the ECO-SENS study

revisited. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 39, n. 1, p. 45–51, 2012.

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

KENNEDY, C. A.; FANNING, S.; KARCZMARCZYK, M.; BYRNE, B.; MONAGHAN, A.; BOLTON, D.; SWEENEY, T. Characterizing the Multidrug Resistance of non – O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates from Cattle Farms and abattoirs. **Microbial Drug Resistance**, v. 23, n. 6, 2017.

KHAN, S. B. *et al.* Prevalence, quantification and isolation of pathogenic shiga toxin *Escherichia coli* O157:H7 along the production and supply chain of pork around Hubei Province of China. **Microbial Pathogenesis**, v. 115, p. 93–99, 2018.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR, W. C. **Diagnostico microbiológico – Texto e atlas colorido**. 5. Ed.; Rio de Janeiro: Medsi, 1465 p, 2001.

KULOW, M. J *et al.* Differences in colonization and shedding patterns after oral challenge of cattle with three *Escherichia coli* O157:H7 strains. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 22, p. 8045–55, 2012.

LANDERS, T. F. A Review of antibiotic use in food animals: perspective, policy and potential. **Public Health Reports**, v. 127, p. 4–22, 2012.

LEE, J. H., SUBHADRA, B., SON, Y. J., KIM, D. H., PARK, H. S., KIM, J. M., & CHOI, C. H. Phylogenetic group distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infections in South Korea. **Letters in applied microbiology**, v. 62, n. 1, p. 84-90, 2016.

LEUNG, P. H.; YAM, W. C.; NG, W. W.; PEIRIS, J. S. The prevalence and characterization of verotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and pigs in an abattoir in Hong Kong. **Epidemiology and Infection**, v. 126, p. 173–179, 2001.

LUQUE, A. T.; MORENO, C. G.; PASTERIS, S. E.; ORDEN, J. A.; DE LA FUENTE, R.; OTERO, M. C. Antimicrobial resistant *Escherichia coli* in the reproductive tract microbiota of cows and sows. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 55, p. 13–19, 2017.

MAGIORAKOS, A. P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B. et al. Multidrug-resistant, extensively drug resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**. v.18, p. 268-81, 2012.

MARTINEZ, J. L. Natural antibiotic resistance and contamination by antibiotic resistance determinants: the two ages in the evolution of resistance to antimicrobials. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, 2012.

MARTINS, R. P.; DA SILVA, M. C.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; LEITE, DDA. S. Prevalence of enterotoxigenic and Shiga toxinproducing *Escherichia coli* in pigs slaughtered in Mato Grosso, Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 5, p. 123–127, 2011.

MIRANDA-ESTRADA L. I.; RUÍZ-ROSAS, M.; MOLINA-LÓPEZ, J.; PARRA-ROJAS, I.; GONZÁLEZ-VILLALOBOS, E.; CASTRO-ALARCÓN, N. Relationship between virulence factors, resistance to antibiotics and phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* in two locations in Mexico. **Enfermedades infecciosas y microbiología clinica**, v. 35, n. 7, p. 426-33, 2017.

MUTTERS, N. T. et al. Treating urinary tract infections due to MDR *E. coli* with Isothiocyanates – a phytotherapeutic alternative to antibiotics? **Fitoterapia**, v. 129, p. 237–240, 2018.

NAGY, B.; SZMOLKA A.; SMOLE, M. S.; KOVAC, J.; STRAUSS, A.; SCHLAGER, S.; BEUTLICH, J.; APPEL, B et al. Virulence and antimicrobial resistance determinants of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and of multidrug-resistant *E. coli* from foods of animal origin illegally imported to the EU by flight passengers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 209, p. 52–9, 2015.

PARK, J. H.; OH, S. S.; OH, K. H.; SHIN, J.; JANG, E. J.; JUN, B. Y.; YOUN, S. K.; CHO, S. H. Diarrheal outbreak caused by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* O157:H45 in South Korea. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 11, p. 775–781, 2014.

RAMESH, S. Antibiotic usage patterns in animal husbandry and food safety: Regulations and practice. CIBA Report, 2016.

RIVERA, F. P.; SOTELO, E.; MORALES, I.; MENACHO, F.; MEDINA, A. M.; EVARISTO, R. Short communication: detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle and pigs in Lima, Peru. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 1166–1169, 2012.

SCHITO, G. C. et al. The ARESC study: an international survey on the antimicrobial resistance of pathogens involved in uncomplicated urinary tract infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, n. 5, p. 407–413, 2009.

SCHROEDER, C. M.; ZHAO, C.; DEBROY, C. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from humans, cattle, swine, and food. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 2, p. 576–581, 2002.

SOUTO, M. DE SOUZA. Sensibilidade aos agentes antibióticos de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* diarreio gênica isoladas de bezerros do Centro Oeste e Alto Paranaíba de Minas Gerais, 2011. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

STOKES, H. W., & GILLINGS, M. R. Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. **FEMS microbiology reviews**, v. 35, n. 5, p. 790–819, 2011.

STUDIO, R. RStudio: integrated development environment for R. **RStudio Inc**, Boston, Massachusetts, p. 74, 2012.

TABASI, M. *et al.* Phenotypic Assays to Determine Virulence Factors of Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Isolates and their Correlation with Antibiotic Resistance Pattern. **Osong Public Health and Research Perspectives**, v. 6, n. 4, p. 261–268, 2015.

TANG, K. L.; CAFFREY, N. P.; NÓBREGA, D. B.; CORK, S. C.; RONKSLEY, P. E.; BARKEMA, H. W.; PLACHEK, A. J. *et al.* Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Planetary Health**, v. 1, n. 8, p. 316–27, 2017.

TOMA, C.; LU, Y.; HIGA, N.; NAKASONE, N.; CHINEN, I.; BASCHKIER, A.; RIVAS, M.; IWANAGA, M. Multiplex PCR Assay for Identification of Human Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 2669–71, 2003.

TORRES LUQUE, A. *et al.* Antimicrobial resistant *Escherichia coli* in the reproductive tract microbiota of cows and sows. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 55, p. 13–19, 2017.

USDA. United States Department of Agriculture. World agricultural outlook board. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/advQuery>. Acesso em: 22 de maio de 2018.

WANG, L.; NAKAMURA, H.; KAGE-NAKADAI, E.; HARA-KUDO, E.; NISHIKAWA, Y. Comparison by multilocus variable-number tandem repeat analysis and antimicrobial resistance among atypical enteropathogenic *Escherichia coli*

strains isolated from food samples and human and animal faecal specimens. **Journal of Applied. Microbiology**, v. 122, p. 268–278, 2016.

WHO. Global principles for the containment of antimicrobial resistance in animals intended for food: report of a WHO consultation with the participation of the Food and Agriculture Organization of the United Nations and the Office International des Epizooties, World Health Organization, Geneva, 2000.

ZHU, Y. *et al.* Characterization and virulence clustering analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from swine in China. **BMC Veterinary Research**, v. 13, n. 1, p. 94, 2017.