

Perfil de susceptibilidade antimicrobiana e identificação de patótipos diarreioagênicos entre amostras de *Escherichia coli* isoladas de alimentos*

Antimicrobial susceptibility profile and identification of pathotypes diarrheagenic between *Escherichia coli* strains isolated from food

Leandro Leão Faúla,** Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira,*** Paula Prazeres Magalhães****

Resumo

O presente estudo objetivou avaliar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana e a ocorrência de patótipos diarreioagênicos (*E. coli* entoropatogênica/EPEC, *E. coli* enterotoxigênica/ETEC, *E. coli* produtora de shiga toxina/STEC, *E. coli* enteroinvasiva/EIEC e *E. coli* enteroagregativa/EAEC) em amostras de *Escherichia coli*, isoladas de diversos alimentos destinados ao consumo humano e naqueles envolvidos em surtos de Doença de Transmissão Alimentar (DTA), em Minas Gerais, Brasil. O perfil de susceptibilidade antimicrobiana das amostras de *E. coli* foi avaliado por meio da técnica de Concentração Mínima Inibitória e os patótipos de *E. coli* diarreioagênica pela Reação em Cadeia de Polimerase, utilizando-se os marcadores de virulência *eae*, *bfpA*, *eitB*, *estA*, *st1*, *stx1*, *stx2*, *ipaH* e *aatA*. Dentre as 220 amostras de *E. coli* analisadas, 60 (27,3%) apresentaram-se resistentes ou com resistência intermediária. Entre estas, oito (13,3%) foram consideradas multirresistentes. Os fármacos amicacina e gentamicina foram os mais eficazes, diferentemente da ampicilina, que apresentou o maior percentual de amostras resistentes (10,9%). Não foram identificados os patótipos de EPEC, STEC, EIEC e EAEC. Duas amostras de *E. coli* (0,9%), isoladas de um salgado (pão de queijo) e de uma refeição mista (galinhada), foram classificadas como ETEC. Ambas albergavam os marcadores de virulência *eitB*, *estA* e *st1*. Estas foram caracterizadas como pertencentes sorotipos O9:H10 e O9:H33. Conclui-se que entre as amostras de *E. coli*, isoladas de alimentos destinados ao consumo humano em Minas Gerais e naqueles envolvidos em surtos de DTA, existem de amostras consideradas multirresistentes e diarreioagênicas.

Palavras-chave: *Escherichia coli* diarreioagênica e susceptibilidade antimicrobiana.

Abstract

This study aimed to evaluate the profile of antimicrobial susceptibility and the occurrence of diarrheagenic pathotypes (*E. coli* entoropatogênica/EPEC, *E. coli* enterotoxigenic/ETEC, *E. coli* producing shiga toxin/STEC, *E. coli* enteroinvasive/EIEC and *E. coli* enteroagregativa/EAEC) in *Escherichia coli* isolated from different foods intended for human consumption and those involved in foodborne disease outbreaks, in Minas Gerais, Brazil. The antimicrobial susceptibility of strains of *E. coli* was evaluated by the Minimum Inhibitory Concentration technique and pathotypes of *E. coli* diarrheagenic by polymerase chain reaction, using the virulence markers *eae*, *bfpA*, *eitB*, *st1*, *stx1*, *stx2*, *ipaH* and *aatA*. Among the 220 strains of *E. coli* analyzed, 60 (27.3%) were resistant or intermediate resistance. Among these, eight (13.3%) were considered multiresistant. The amikacin and gentamicin drugs were the most effective, unlike ampicillin, which had the highest percentage of resistant strains (10.9%). Pathotypes of EPEC, STEC, EIEC and EAEC were not identified. Two strains of *E. coli* (0.9%) isolated from a salty (cheese bread) and a mixed meal (chicken meal) were classified as ETEC. Both harbored the virulence markers *eitB*, *estA* and *st1*. These were characterized as serotypes O9:H10 and O9:H33. We conclude that among samples of *E. coli*, isolated from foods for human consumption in Minas Gerais and those involved in outbreaks of DTA, there are samples considered multiresistant and diarrheagenic.

Keywords: diarrheagenic *Escherichia coli* and antimicrobial susceptibility.

Introdução

Escherichia coli destaca-se como um dos contaminantes microbiológicos mais comuns em alimentos e constitui um dos principais parâmetros para avaliação da qualidade sanitária

(Silva et al., 2010). Além de ser utilizada como indicador sanitário, outro relevante papel deste micro-organismo, diz respeito ao seu emprego como bactéria indicadora para o monitoramento da disseminação da resistência aos antimicrobianos (Guillen et al., 2014) e, também, como potencial causadora de DTA, por meio

*Recebido em 2 de agosto de 2016 e aceito em 14 de março de 2017.

**Fundação Ezequiel Dias, Laboratório Central de Saúde Pública, Serviço de Microbiologia de Produtos, Belo Horizonte, MG-Brasil. Autor para correspondência: leandro.faula@funed.mg.gov.br

***Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Departamento de Inspeção e Tecnologia de Produtos de Origem Animal, Belo Horizonte, MG-Brasil.

****Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia, Laboratório de Microbiologia oral e de anaeróbios, Belo Horizonte, MG-Brasil.

de seus patótipos diarréio-gênicos (*E. coli* enteropatogênica/EPEC; *E. coli* enterotoxigênica/ETEC; *E. coli* produtora de toxina de shiga/STEC; *E. coli* enteroinvasiva/EIEC; *E. coli* enteroagregativa/EAEC e *E. coli* difusamente aderente/DAEC) (Croxen et al., 2013).

O monitoramento da resistência antimicrobiana em *E. coli* baseia-se na constatação de ser uma bactéria amplamente disseminada no ambiente (solo, água e alimentos) e entre vários hospedeiros (seres humanos e animais), pela grande facilidade de transferência de genes de resistência inter e intra espécie e por apresentar elevada relevância para Saúde Pública (Tadesse et al., 2012; ECDC, 2016). O Tratamento de infecções causadas por *E. coli* têm apresentado limitações terapêuticas devido a disseminação da resistência antimicrobiana (Rasheed et al., 2014). Em todo o mundo, 700.000 pessoas morrem, anualmente, de infecções associadas a micro-organismos resistentes e, até 2050, estima-se que ocorrerão cerca de 10 milhões de mortes/ano em consequência desta resistência (O'Neill, 2016).

No que se refere à presença de patógenos alimentares, *E. coli* diarréio-gênica tem sido considerada um dos principais causadores de doença diarréica no mundo (Croxen et al., 2013). Nos EUA, entre 1998 e 2014, foram investigados 18.211 surtos de DTA, 2,9% deles ocasionados por *E. coli* diarréio-gênica (CDC, 2016). No Brasil, em período similar, de 2000 a 2013, foram notificados 8.857 surtos de DTA (Ritter e Tongo, 2014). Entretanto, não há estatística oficial que associe a presença de *E. coli* diarréio-gênica com estes eventos, em grande parte devido à dificuldade na detecção dos patótipos, apontando uma fragilidade do Sistema Nacional de Vigilância em Saúde.

Considerando a importância de se monitorar a resistência antimicrobiana e a ocorrência de *E. coli* diarréio-gênica em alimentos, este trabalho avaliou o perfil de susceptibilidade antimicrobiana e a ocorrência dos patótipos EPEC, ETEC, STEC, EIEC e EAEC entre amostras de *E. coli* isoladas de diversos alimentos em Minas Gerais, Brasil.

Material e métodos

Nos anos de 2014 e 2015, foram coletados 396 alimentos, incluindo massas e salgados diversos, produtos cárneos, especiarias, hortaliças, produtos lácteos, produtos de panificação e refeições de pronto consumo, em vários municípios no estado de Minas Gerais, por meio do Programa de Monitoramento da Qualidade dos Alimentos do Estado e a partir da investigação de surtos de DTA. Os alimentos provenientes do Programa de Monitoramento, inspecionados pelos Serviços de Inspeção Municipal, Estadual ou Federal, foram coletados no comércio local e aqueles envolvidos em surtos de DTA em diversos locais, tais como residências, eventos festivos, estabelecimentos comerciais de alimentação, escolas, creches, hospitais e postos de saúde. Todos os alimentos foram acondicionados sob refrigeração até a realização das análises.

O isolamento das amostras de *E. coli* foi realizado pela técnica “Número Mais Provável” conforme descrito no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Kornacki e Johnson, 2001). De cada alimento positivo para *E. coli*, foram selecionadas, sempre que possível, pelo menos, cinco colônias de *E. coli*.

O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das amostras de *E. coli* isoladas foi avaliado por meio da técnica de Concentração Mínima Inibitória, através do sistema automatizado VITEK II, utilizando-se o “Cartão AST-N239”, que contém os antimicrobianos amicacina, ampicilina, ampicilina/sulbactam, cefepima, cefoxitina, ceftazidima, ceftriaxona, cefuroxima, cefuroxima/axetil, ciprofloxacina, colistina, ertapenem, gentamicina, imipenem, meropenem, piperacilina/tazobactam e tigeciclina, cada um destes com diferentes concentrações, selecionados em consonância com as orientações da Organização Internacional *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI), conforme descrito no manual do fabricante.

Para extração de DNA, as amostras de *E. coli* foram cultivadas em ágar sangue, a 35°C, por 24h e suspendidas em 210 µL de tampão STET (sacarose 8%, Tris-HCl 50 mM, EDTA 50 mM, Triton X-100 0,1%; pH 8,0). A seguir, foram adicionados 60 µL de SDS (10%) e 10 µL de RNase A (0,5 mg/mL). O material foi homogeneizado e, após 1 h de incubação a 37°C, foram acrescentados 30 µL de proteinase K (10 mg/mL). A suspensão foi homogeneizada e incubada em banho-maria, a 37°C, *overnight*. Então, foram adicionados 75 µL de NaCl 5 M e 60 µL de solução CTAB/NaCl (CTAB 5% p/v/NaCl 0,7 M) e a suspensão foi gentilmente agitada e incubada por 10 min, a 56 °C, em banho-maria. O DNA foi extraído empregando-se 700 µL de mistura de fenol e clorofórmio (1:1) por cerca de três vezes e apenas clorofórmio na última etapa da extração e precipitado a -20°C, *overnight*, com 60 µL de acetato de sódio 3 M e 750 µL de etanol absoluto. A seguir, o material foi centrifugado a 12000 g, a 4°C, por 75 min e, após evaporação do etanol residual, foram acrescentados 750 µL etanol 70%. Após centrifugação a 12000 g, a 4°C, por 25 min, o sedimento de DNA foi diluído em água Milli-Q® estéril. A amostra foi homogeneizada, a concentração de DNA foi medida em espectrofotômetro (*Nanodrop 1000; Thermo Fischer Scientific, Wilmington, EUA*) (Fox et al., 1994).

O DNA extraído foi submetido a PCR convencional (*Termociclador Mastercycler nexus; Eppendorf, Alemanha*), utilizando iniciadores específicos para pesquisa dos seguintes marcadores de virulência: *eae*, *bfpA*, *eltB*, *estA*, *st1*, *stx1*, *stx2*, *ipaH* e *aatA*. Os produtos de amplificação, sequência de *primers* e protocolos estão descritos na Tabela 1. O volume final das reações de amplificação foi de 20 µL e o *mix* era constituído por tampão (Tris HCl 10 mM, pH 8,4), 0,75 a 2 mM de MgCl₂ (concentração específica por marcador de virulência), 200 µM de cada dNTP, 0,5 µM de cada *primer*, 1 U de *Taq* DNA polimerase e 20 ng de DNA molde. Os controles positivos empregados foram *E. coli* CDC O126 (INCQS 000184), para *eae* e *bfpA*; *E. coli* H10407, para *elt*, *estA* e *st1*; *E. coli* CDC EDL-933 (INCQS 00171), para *stx1* e *stx2*; *E. coli* 3927 (Instituto Adolfo Lutz), para *ipaH* e *E. coli* 3929 L08-15 (Instituto Adolfo Lutz), para *aatA*. Em cada lote de reações foram empregados como controle negativo e controle negativo interno, *E. coli* ATCC 25922 e água, respectivamente. Adicionalmente, durante a eletroforese foi utilizado marcador de peso molecular 100 bp.

As amostras de *E. coli* confirmadas como positivas para quaisquer fatores de virulência pesquisados foram sorotipadas pelo Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil, por meio do método de aglutinação em tubo (Ewing, 1986), empregando-se antissoros adsorvidos para os antígenos somáticos O1 a O186 e flagelares H1 a H56.

Tabela 1: Reações de amplificação empregadas para pesquisa de *E. coli* diarréiogênica: alvo, patotipos, fatores de virulência, primers, programas e amplicons

Gene	Patotipo/ Produto	Sequência do primer	Programa	Amplicon (pb)	Fonte
<i>eae</i>	STEC E EPEC/ Intimina	F: 5'-CTGAACGGGCGATTACGCGAA-3' R: 5'-CCAGAACGATACGATCCAG-3'	95°C/40s 40x; 53°C/2min 40x; 60°C/2min 40x	917	Aranda, et al., 2004
<i>bfpA</i>	EPEC típica/ Fímbria BFP	F: 5'-ATTGGTGCTTGCGCTTGCTGC-3' R: 5'-GCCGCTTTATCCAACCTGGTA-3'	95°C/40s 40x; 53°C/2min 40x; 60°C/2min 40x	326	Gunzburg, et al., 1995
<i>eltB</i>	EPEC/ Enterotoxina termolábil	F: 5'-ACGGCGTTACTATCCTCTC-3' R: 5'-TGGTCTCGGTGATATGTG-3'	94°C/1min 1x; 94°C/30s 35x; 52°C/30s 35x; 72°C/1min 35x; 72°C/5min 1x	273	Sjöling et al., 2007
<i>estA</i>	EPEC/ Enterotoxina termoestável (STp)	F: 5'-TCTTTCCCCTCTTTAGTCAG-3' R: 5'-ACAGGCAGGATTACAACAAAG-3'	94°C/1min 1x; 94°C/30s 35x; 52°C/30s 35x; 72°C/1min 35x; 72°C/5min 1x	166	Rodas et al., 2009
<i>st1</i>	STEC/ Enterotoxina termoestável (STh)	F: 5'-TTCACCTTTCCCTCAGGATG-3' R: 5'-CTATTCATGCTTTCAGGACCA-3'	94°C/1min 1x; 94°C/30s 35x; 52°C/30s 35x; 72°C/1min 35x; 72°C/5min 1x	120	Woodward et al., 1992
<i>stx1</i>	STEC/Toxina shiga 1	F: 5'-CAGTTAATGTGGTGGGGAAGG-3' R: 5'-CAACAGACAATGTAACCGTG-3'	95°C/20s 30x, 61°C/40s 30x; 72°C/1,5min 30x	348	Vidal et al., 2004
<i>stx2</i>	STEC/Toxina shiga 2	F: 5'-ATCCTATTCGGGAGTTTACG-3' R: 5'-GCGTCATCGTATACAGGAGC-3'	95°C/20s 30x; 61°C/40s 30x; 72°C/1,5min 30x	584	Vidal et al., 2004
<i>ipaH</i>	EIEC/Proteína de invasão	F: 5'-CTCGGCACGTTTTAATAGTCTGG-3' R: 5'-GTGGAGAGCTGAAGTTTCTCTGC-3'	94°C/5min 1x; 94°C/1min 35x; 55°C/1min 35x; 72°C/1min 35x; 72°C/3min 1x	933	Vidal et al., 2005
<i>aatA</i>	EAEC/Proteína de membrana	F: 5'-CTGGCGAAAGACTGTATCAT-3' R: 5'-CAATGTATAGAAATCCGCTGTT-3'	95°C/5min 1x; 94°C/40s 30x; 53°C/1min 30x; 72°C/1min 30x; 72°C/7min 1x	630	Aranda et al., 2004

Resultados

Dos 396 alimentos analisados, distribuídos entre oito categorias distintas, *E. coli* foi identificada em 41 deles (10,4%) (Tabela 2). Destes, 29 alimentos (70,7%) continham amostras de *E. coli* resistentes e/ou com resistência intermediária a um ou a mais antimicrobianos.

Dos 41 alimentos em que foi identificada a presença de *E. coli*, foram isoladas 220 amostras de *E. coli* para os estudos de susceptibilidade antimicrobiana. Destas, 160 (72,7%) foram susceptíveis a todos os 17 antimicrobianos testados. Entre as 60 amostras (27,3%) restantes, 42 (19,1%) apresentaram resistência a pelo menos um dos fármacos avaliados e 18 (8,2%) resistência intermediária.

O maior percentual de fenótipo resistente foi identificado para os fármacos da classe β lactâmicos. Entre estes, destaca-se a resistência à ampicilina, observada em 24 (10,9%) amostras de *E. coli*, e a resistência intermediária à cefuroxima, entre 23 (10,5%) amostras (Figura 1). Diferentemente da classe β lactâmicos, nenhuma amostra de *E. coli* apresentou resistência

aos fármacos amicacina e gentamicina, pertencentes à classe dos aminoglicosídeos.

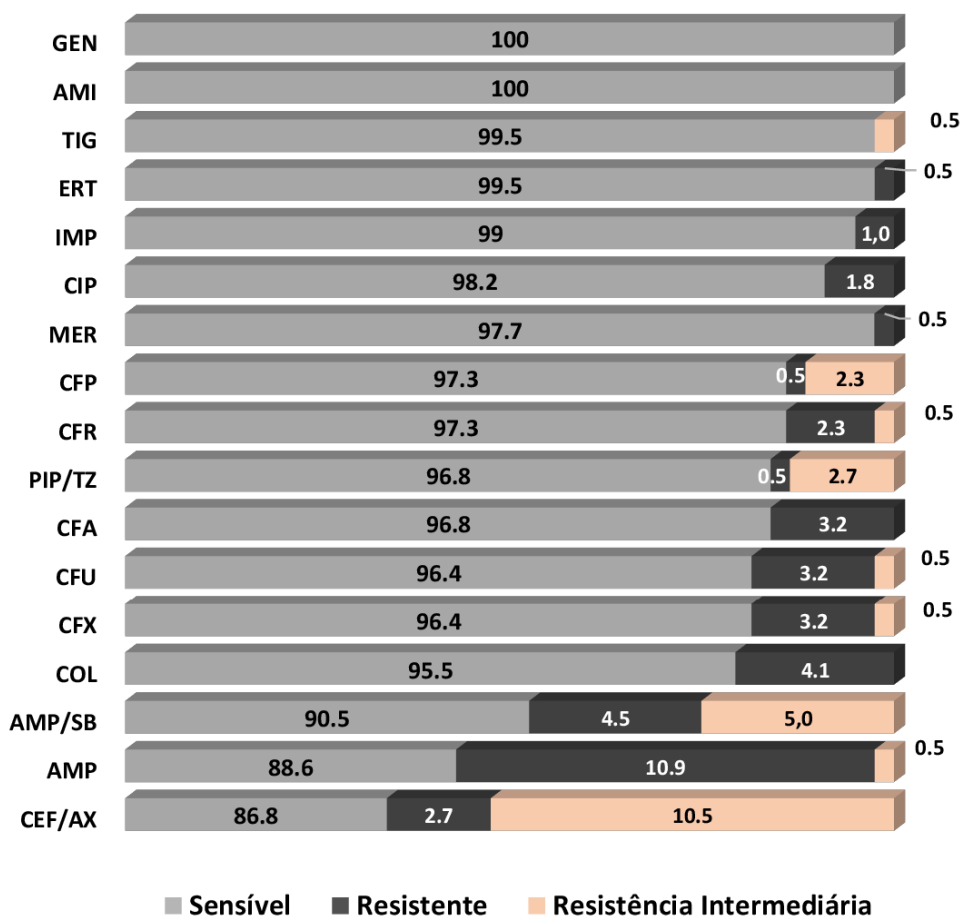
O número de antimicrobianos pelo qual as amostras de *E. coli* apresentaram resistência variou de um a 12. Das 60 amostras de *E. coli* resistentes, 35 (58,3%) apresentaram resistência a um antimicrobiano; 16 (26,7%) amostras a dois antimicrobianos; três (5,0%) amostras a três antimicrobianos; outras três (5,0%) amostras a nove antimicrobianos; duas (3,4%) amostras a 10 antimicrobianos; e uma amostra (1,7%) a 12 antimicrobianos.

Dentre as amostras de *E. coli* multirresistentes, oito (13,3%) foram classificadas como MDR (*Multidrug resistant*) por apresentarem resistência a pelo menos um antimicrobiano em três classes de terapêuticas, dentre as cinco testadas, e uma amostra de *E. coli* (1,6%) como possível XDR (*Extensively drug resistant*), já que apresentou resistência a pelo menos um antimicrobiano em todas as classes. Não foi identificada nenhuma amostra PDR (*Pan drug resistant*), classificação proposta para amostras que apresentassem resistência a todos os antimicrobianos em todas as classes terapêuticas.

Tabela 2: Percentual de alimentos coletados no estado de Minas Gerais, entre 2014 e 2015, com *E. coli* resistentes ou com resistência intermediária

Categorias de Alimentos	Nº de alimentos analisados	Percentual de alimentos com <i>E. coli</i> (%)	Percentual de alimentos com <i>E. coli</i> resistente e/ou resistência intermediária (%)
Massas e salgados ¹	63	7 (11,10%)	6 (85,7%)
Carnes e derivados ²	48	4 (8,3%)	4 (100%)
Especiarias ³	55	4 (7,3%)	2 (50%)
Gelados comestíveis ⁴	11	0 (0)	0 (0)
Hortaliças ⁵	08	0 (0)	0 (0)
Produtos Lácteos ⁶	107	11 (10,3%)	5 (45,4%)
Produtos de Panificação ⁷	24	1 (4,2%)	0 (0)
Pratos mistos ⁸	80	15 (18,8%)	12 (80,0%)
TOTAL	396	41 (10,4%)	29 (70,7%)

¹Pizza, lasanha, pães de queijo e outros salgados; ²Embutidos e preparações cárneas diversas cozidas e assadas; ³Canela, orégano e pimenta do reino; ⁴Sorvetes e picolés; ⁵Vegetais minimamente processados; ⁶Leite em pó, pasteurizado e queijos diversos; ⁷Bolos de aniversário ⁸Arroz, farofa, feijão, purês, saladas diversas, salpicão e outros



GEN: Gentamicina; **AMI:** Amicacina; **TIG:** Tigeciclina; **ERT:** Ertapenem; **IMP:** Imipenem; **CIP:** Ciprofloxacina; **MER:** Meropenem; **CFP:** Cefepima; **CFR:** Ceftriaxona; **PIP/TZ:** Piperacilina/Tazobactam; **CFA:** Ceftazidima; **CFU:** Cefuroxima; **CFX:** Cefoxetina; **COL:** Colistina; **AMP/SB:** Ampicilina/Subactam; **AMP:** Ampicilina; **CEF/AX:** Cefuroxima axetil

Figura 1: Percentual de amostras de *Escherichia coli* (n=220) isoladas de alimentos coletados no estado de Minas Gerais, entre 2014 e 2015, sensíveis, resistentes e com resistência intermediária, frente a 17 antimicrobianos incluídos em cinco classes terapêuticas distintas

No que se refere à avaliação das 220 amostras de *E. coli* quanto aos marcadores de virulência típicos de *E. coli* diarreio gênica, não foram identificados genes dos patótipos de EPEC, STEC, EIEC e EAEC. Duas (0,9%) amostras de *E. coli* albergavam os genes *e1fB*, *estA* e *st1*, marcadores típicos do patótipo de ETEC. No presente estudo, estas amostras de ETEC foram caracterizadas como pertencentes ao sorotipos O9:H33 e O9:H10. Nenhuma dessas amostras mostrou-se resistente a qualquer dos fármacos avaliados neste trabalho.

Discussão

A resistência antimicrobiana, reconhecida como fenômeno global, tem aumentado significativamente nos últimos anos (Melo et al., 2015). Enterobactérias resistentes podem transferir genes de resistência para a microbiota residente (*E. coli* e outras bactérias) dentro do trato gastrointestinal (Rasheed et al., 2009) aumentando o risco de infecções com alternativas terapêuticas limitadas (Silva et al., 2009).

Neste trabalho, elevado percentual de *E. coli* resistente (70,7%) foi identificado entre os alimentos analisados. Sabe-se que a presença de bactérias resistentes em alimentos é preocupante, pois estes são importantes veículos de disseminação desses micro-organismos para outros ambientes (Li et al., 2007). Neste sentido, Organizações Internacionais na área de saúde humana e animal têm incentivado a implantação de Programas de Monitoramento da Resistência Bacteriana em diversos países, a partir de amostras isoladas de seres humanos, animais, alimentos e água (ECDC, 2016, O'Neill, 2016).

Elevado percentual de *E. coli* resistente foi identificado em quase todas as categorias de alimentos analisadas, principalmente entre as preparações cárneas (100%) avaliados na categoria de carnes e derivados. Acredita-se que esse elevado percentual de micro-organismos resistentes entre produtos de origem animal esteja associado à utilização exacerbada de antimicrobianos na agropecuária. Aproximadamente 50% dos antimicrobianos utilizados no mundo são destinados à agricultura (Arias e Carrilho, 2012). Conforme reportado por Cergole-Novella et al. (2011) o uso abusivo de agentes antimicrobianos na agricultura desempenha papel-chave na disseminação de genes de resistência entre bactérias, representando uma ameaça para saúde humana e animal. Van-Boeckel et al. (2015) estimaram que o consumo global de antimicrobianos na pecuária deverá aumentar 67% até 2030 e, em países como Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul, esse aumento será de 99%.

A análise do perfil de susceptibilidade antimicrobiana mostrou que a resistência antimicrobiana entre amostras de *E. coli* foi predominante para os fármacos β -lactâmicos, em especial à ampicilina. Esse perfil de resistência, entre *E. coli* isolada de alimentos, tem sido frequentemente relatado, não apenas no Brasil, mas no mundo. Em trabalhos correlatos ao nosso, *E. coli* isolada de vários alimentos, tais como leite pasteurizado (Oltamari et al., 2011), queijos (Ribeiro, 2013), produtos lácteos (Guillen et al., 2014) e carcaças de frango de granja e caipira (Koga et al., 2014) também apresentaram elevado percentual de resistência à ampicilina. Segundo Silva & Lincopan (2012), o principal mecanismo de resistência bacteriana contra a classe β -lactâmicos está associado à produção de enzimas β lactamases. Nos últimos anos, a resistência entre os fármacos

β lactâmicos tem aumentado entre membros da família enterobacteriaceae devido à disseminação de marcadores típicos de β lactamases e β lactamases de espectro ampliado (EBSL) (Dias et al., 2010).

Por outro lado, assim como observado neste trabalho, não tem sido reportado alto percentual de amostras de *E. coli*, isoladas de alimentos, resistentes aos antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos, principalmente à gentamicina e à amicacina. Os fármacos dessa classe terapêutica atuam por meio da fixação ao ribossomo 30S, interrompendo a síntese proteica. Logo, a resistência aos aminoglicosídeos, normalmente, decorre de alterações na estrutura de moléculas que compõem os ribossomos (Molina et al., 2009). Dados similares, com baixo percentual de *E. coli* resistente a gentamicina e a amicacina também foram reportados por Ribeiro (2013) entre amostras de *E. coli* isoladas de queijo; por Guimarães et al. (2012) naquelas isoladas de queijos coalho; por Zhao et al. (2012) durante análise de carnes diversas; e por Mantila e Franco (2012) após análise de amostras de *E. coli* isoladas de carne moída.

A ocorrência de resistência múltipla aos 17 antimicrobianos analisados, observada entre 13,3% das nossas amostras de *E. coli*, já foi descrita por Avila (2011) entre *E. coli* isoladas de linguiça frescal e por Barreto et al. (2012) naquelas isoladas de leite *in natura*. Essa resistência múltipla representa risco à Saúde Pública, visto que pode dificultar o tratamento de doenças humanas e animais, agravando quadros clínicos potencialmente curáveis. O problema torna-se ainda mais agravante quando consideramos o menor número de classes terapêuticas desenvolvidas nos últimos anos (Fischbach e Walsh, 2009; Magiakros et al., 2012).

Com relação à pesquisa dos patótipos diarreio gênicos, sabe-se que, desde quando *E. coli* diarreio gênica foi descoberta como potencial patógeno alimentar, nos EUA, em 1971, após consumo de queijos por linhagens enteroinvasivas (Jay, 2005), a mesma tem sido considerada uma das principais bactérias causadoras de enterite entre seres humanos (Croxen et al., 2013). Surto por *E. coli* diarreio gênica apresentam ocorrência mundial (Silva et al., 2010). Esta tem sido implicada como uma das principais causas de doença diarreica no mundo, com mais de 2 milhões de mortes anuais (Souza, 2006).

Nosso estudo demonstrou um baixo percentual (0,9%) de *E. coli* diarreio gênica entre as amostras de *E. coli* isoladas dos alimentos. Dados similares, que apontaram baixo percentual de amostras de *E. coli* diarreio gênica entre alimentos também foram reportados por outros autores, não somente no Brasil, mas mundialmente (Paneto et al., 2007; Rugeles et al., 2010; Ribeiro, 2013; Canizalez-Roman et al., 2013; Melo et al., 2015; Peresi et al., 2016). Todavia, resultados dessa natureza não desqualificam *E. coli* diarreio gênica como uma importante causa de diarreia endêmica e epidêmica no mundo (Costa et al., 2010).

Esse baixo percentual de patótipos diarreio gênicos de *E. coli* detectado neste estudo não indica, necessariamente, que as amostras não sejam diarreio gênicas ou patogênicas extraintestinais. É possível que as mesmas sejam portadoras de outros marcadores de virulência não investigados, como, por exemplo, genes característicos do patótipo de *E. coli* difusa aderente (DAEC) ou de *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC), patótipo este comumente causador de outras

síndromes, tais como infecções do trato urinário, meningite e sepse. Okura (2010) e Ribeiro (2013), por exemplo, já reportaram amostras de ExPEC em queijo, indicando-as como uma nova classe de patógenos transmissíveis por alimentos.

Adicionalmente, é relevante considerar que a recuperação de *E. coli* através da técnica de NMP pode se mostrar comprometida, uma vez que a presença de bactérias antagonistas dentre os coliformes termotolerantes, de inibidores naturais do meio seletivo, o uso de alta temperatura de incubação e a competição entre bactérias não coliformes por lactose, podem levar a uma detecção subestimada de *E. coli* e, por consequência, dos patótipos diarreio gênicos. Como alternativa para solução deste possível desvio, recomenda-se a recuperação de *E. coli* por outros protocolos, que não apenas o método NMP.

A presença do patótipo ETEC, observada entre alimentos comercializados em Minas Gerais e naqueles envolvidos em surtos de DTA neste estado, reforça a necessidade do monitoramento desse patógeno nos alimentos. Essas amostras de ETEC foram isoladas de um salgado (pão de queijo) coletado no comércio local, e de uma refeição mista (galinhada), proveniente de um surto de DTA. O referido surto ocorreu em um centro religioso onde pelo menos cinco pessoas adoeceram. Todas apresentaram vômitos, náuseas e cólicas abdominais cinco horas após o consumo da galinhada. Na ocasião, não foram isolados enteropatógenos no material clínico (fezes) dos envolvidos e na água de consumo. Neste evento também não foi identificado nenhum outro micro-organismo na galinhada ou em outro alimento que justificasse o quadro de toxinfecção, indicando, portanto, tratar-se de uma possível DTA por ETEC.

Agradecimentos

À Fundação de Apoio à Pesquisa de Minas Gerais, à Fundação Ezequiel Dias, ao Instituto Adolfo Lutz e à Universidade Federal de Minas Gerais.

Referências

- ARANDA, K.R.S.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I.C.A. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n.12, p. 5849-5853, 2004.
- ARIAS, M.V.B.; CARRILHO, C.M.D.M. Resistência Antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo para preocupação? *Semina: Ciências Agrárias*. v. 33, n. 2, p. 775-790, 2012.
- AVILA, A.R.J.V. *Sensibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de linguiça frescal*. Dissertação [Mestrado em Ciência de Alimentos]. Universidade Federal de Lavras, Lavras/ Minas Gerais, 2011.
- BARRETO, N.S.E.; SANTOS, G.C.F.; CREPALDI, A.L.; SANTOS, R.A.R. Qualidade microbiológica e susceptibilidade antimicrobiana do leite *in natura* comercializado em Cruz das Almas, Bahia. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 33, n. 6, p. 2315-2326, 2012.
- CANIZALEZ-ROMAN A; GONZALEZ-NUÑEZ E; VIDAL J.E.; FLORES-VILLASEÑOR H.; LEÓN-SICAIROS N. Prevalence and antibiotic resistance profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from food items in northwestern Mexico. *International Journal of Food Microbiology*, v. 164, n.1, p. 36-45, 2013.

ETEC é considerada uma das principais causas de morbidade e mortalidade entre crianças com idade de inferior a cinco anos entre países em desenvolvimento e entre viajantes para estas áreas, causando a chamada “Diarreia do viajante” (Sjoling et al., 2007). Entre pacientes acometidos por *E. coli* diarreio gênicos, ETEC é considerada um dos patótipos mais prevalente (Silveira, et al., 2013,) e em algumas regiões, como África e Ásia, é considerada uma das quatro principais causas de diarreia moderada a severa entre crianças (Croxen et al., 2013).

Com relação aos sorotipos O9:H10 e O9:H33, identificados entre as amostras de ETEC, não foi evidenciada a descrição dos mesmos na literatura entre amostras de *E. coli* isoladas de alimentos. O conhecimento desses sorotipos de *E. coli* é importante, uma vez que fornece informações úteis para estudos epidemiológicos. Dados de prevalência sugerem, por exemplo, que o sorotipo O157:H7 seja predominante nos EUA, Canadá, Reino Unido e Japão, enquanto na América do Sul, Austrália e Europa Continental os sorotipos não O157 são os mais comuns (Silva et al., 2010).

Conclusões

Conclui-se que entre as amostras de *E. coli*, isoladas de alimentos destinados ao consumo humano em Minas Gerais e naqueles envolvidos em surtos de DTA, existem de amostras consideradas multirresistentes e diarreio gênicos, fato que representa um relevante agravo à Saúde Pública, devido à limitação terapêutica associada aos micro-organismos resistentes e ao risco de ocorrência de toxinfecções alimentares por patótipos de *E. coli* diarreio gênicos.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Foodborne Outbreak Online Database (FOOD Tool). Disponível em: <http://wwwn.cdc.gov/foodborneoutbreaks/>. Acesso em 10 julho de 2016.

CERGOLE-NOVELLA, M.C.; PIGNATARI, A.C.C.; CASTANHEIRA, M; GUTH, B.E.C. Molecular typing of antimicrobial-resistant Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains (STEC) in Brazil. *Research in Microbiology*, v. 162, n. 2, p. 117-123, 2011.

CROXEN, M.A.; LAW, R.J.; SHOLZ, R.; KEENEY K.M.; WLODARSKA M; FINLAY B.B. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. v. 26, n. 4, p. 822-880, 2013.

COSTA, A.R.F.; SOUZA, C.O.; LIMA, K.V.B.; LOUREIRO, E.C.B. Desenvolvimento de PCR multiplex para detecção e diferenciação de categorias de *Escherichia coli* diarreio gênicos, *Revista Pan-Amaz Saude*, v.1, n. 2, p. 77-84, 2010.

DIAS, M.T.; SANTOS, P.R.F.; OLIVEIRA, L.A.T.; MARIN, V.A. Avaliação da sensibilidade de cepas de *Escherichia coli* isoladas de mexilhões (*Perna perna linnaeus*, 1758) à antimicrobianos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, n. 2, p. 319-324, 2010.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC). The European Union report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014. *EFSA Journal*, v. 14, n. 2, p. 01-207, 2016.

- EWING, W.H. *Edwards & Ewing's Identification of enterobacteriaceae*. New York: Elsevier, 1986.
- FOX, J. G.; DEWHIRST, F. E.; FRASER, G. J.; PASTER B.J.; SHAMES B; MURPHY JC. Intracellular campylobacter-like organism from ferrets and hamsters with proliferative bowel disease is a *Desulfovibrio* sp. *Journal Clinical Microbiology*. v. 32, n. 5, p. 1229-1237, 1994.
- FISCHBACH, M.C, WALSH, C.T. Antibiotics for Emerging Pathogens. *Science*, v. 325, n. 5944, p. 1089-1093, 2009.
- GUILLÉN, L.; MILLA, B.; ARAQUE, M. Caracterización molecular de amostras de *Escherichia coli* aisladas de productos lácteos artesanales elaborados en Mérida, Venezuela. *Elsevier España*, v.18, n.3, p. 100-108, 2014.
- GUIMARÃES, A.G.; CARDOSO, R.C.V.; AZEVEDO, P.F.; MENESES, B. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de queijo coalho. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 71, n. 2, p. 259-265, 2012.
- GUNZBURG, S.T.; TORNIEPORT, N.G.; RILEY, L.W. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. *Journal Clinical Microbiology*. v. 33, n. 5, p. 1375-1377, 1995.
- JAY, J.M. *Microbiologia de Alimentos*. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- KOGA, V.L.; RODRIGUES, G.R.; CYOIA, P.S.; NAKAZATO, G.; VESPERO, E.C.; BRITO, B.C.; BRITO, K.C.T.; KOBAYASHI, R.K.T. *Análise do Perfil de Resistência Aos Beta-Lactâmicos em Escherichia Coli Isolada de Carcaças de Frango de Granja e Caipira*. In: Proceedings of the XII Latin American Congress on Food Microbiology and Hygiene. São Paulo: Editora Blucher, p. 99-100, 2014.
- KORNACKI, J.L.; JOHNSON, J.L. *Enterobacteriaceae, coliforms and Escherichia coli* as quality and safety indicators. *Compendium of Methods for the Microbiological examination of Foods*. Washington: Ed. APHA, p. 69-82, 2001.
- LI, Q; SHERWOOD, J.S.; LOGUE, C.M. Characterization of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolated from process bison carcasses. *Journal of Applied Microbiology*, v. 103, n. 6, p. 2361-2369, 2007.
- MAGIORAKOS, A.P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R.B. CARMELI, Y.; FALAGAS, M.E.; GISKE, C.G.; HARBARTH, S.; HINDER, J.F.; KARHMETER, G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PATERSON, D.L.; RICE, L.B.; STELLING, J.; STRUELENS, M.J.; VATOPOLUS, A.; WEBER, J.T.; MONET, D.L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. v. 18, n.3, p. 268-281, 2012.
- MANTILLA, S.P.S.; FRANCO, R.M. perfil de sensibilidade microbiana in vitro de linhagens patogênicas de *Escherichia coli* isoladas de carne bovina. *Colloquium Agrariae*, v. 8, n.1, p. 10-17, 2012.
- MELO, D.B.; MENEZES, A.P.O.; REIS, J.N. Antimicrobial resistance and genetic diversity of *Escherichia coli* isolated. *Brazilian Journal of Microbiology* v. 46, n. 4, p. 1165-1170, 2015.
- MOLINA, J.; CORDERO, E.; PALOMINO, J.; PACHÓN, J. Aminoglicósidos y polimixinas. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, v. 27, n. 3, p. 177-188, 2009.
- OKURA, M.H. *Avaliação Microbiológica de Queijos tipo Minas Frescal comercializados na região do Triângulo Mineiro*. 2010. Tese [Doutorado em Microbiologia]. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho", 2010.
- OLTRAMARI, K., RIOS, M.C; BERGAMASCO, R.; MACHISKI JUNIOR, M.; ZANELLA, G.M.; MADRONA, G.; MIKCHA, G.M. Resistência a antimicrobianos em *Escherichia coli* isolada de leite pasteurizado. *Revista Tecnológica*, Edição Especial V Simpósio de Engenharia, Ciência e Tecnologia de Alimentos. p. 57-61, 2011.
- O'NEILL, J. The review on antimicrobial resistance. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. 2016. Disponível em: http://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf. Acesso em 10 julho 2016.
- PANETO, B.R.; ITURRINO, S.; MACEDO, C.; SANTO, E.; MARIN, J.M. Occurrence of toxigenic *Escherichia coli* in raw milk cheese in Brazil. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 59, n. 2, p. 508-512, 2007.
- PERESI, J.T.M.; ALMEIDA, I.A.Z.C.; VAZ, T.M.I, HERNANDES, R.T, TEIXEIRA, I.S.C, SILVA, S.I.L, GRACIANO, R.A.S, PINHEIRO, S.R.P, SANTOS, L.F. Search for diarrheagenic *Escherichia coli* in raw kibbe samples reveals the presence of Shiga toxin-producing strains. *Food Control*. v. 63, p. 165-170, 2016.
- RASHEED, M.U; THAJUDDIN, N; AHAMED, P; TEKLEMARIAM, Z; JAMIL, K. Antimicrobial drug resistance in strains of *Escherichia coli* isolated from food sources. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, v. 56, n. 4, p. 341-346, 2014.
- RIBEIRO, L.F. *Características fenotípicas e genotípicas de Escherichia coli isoladas de queijos produzidos a partir de leite não pasteurizado*. Dissertação [Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva]. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária – Universidade Paulista – São Paulo, 2013.
- RITTER, A.C.; TONDO, E.C. Foodborne illnesses in Brazil: control measures for 2014 FIFA World Cup travelers. *Journal of Infection in Developing Countries*, v. 8, n. 3, p. 254-257, 2014.
- RODAS, C.; INIGUEZ, V.; QADRI, F.; WIKLUND, G.; SVENNERHOLM, A. M.; SJÖLING, A. Development of multiplex PCR assays for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* colonization factors and toxins. *Brazilian Journal Infectious Disease*. v. 47, n. 4, p. 1218-1220, 2009.
- RUGELES, L.C.; BAI, J.; MARTINEZ, A.J.M.; VANEGAS, M.C.; DUARTE-GOMEA, O.G. Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* strains from stools samples and food products in Colombia. *International Journal of Food Microbiology*. v. 183, n. 3, p. 282-286, 2010.
- SILVA, K.C.; LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. v. 48, n. 2, p. 91-99, 2012.
- SILVA, N., JUNQUEIRA, V.C.A., SIVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H., SANTOS, R.F.S., GOMES, R.A.R. *Manual de métodos de análise microbiológica de Alimentos*. São Paulo: Varela, 2010.
- SILVA R.A., PINTO C.R.O., MANTILLA S.P.S., SANTOS E.B. & FRANCO R.M. *Escherichia coli*: Determinação do número mais provável pela técnica de miniaturização e susceptibilidade antimicrobiana em linguças frescas suínas. *Anais da II Mostra UFF em Higiene e Tecnologia de Alimentos*, Niterói, RJ, 2009.

- SILVEIRA, L.; MARQUES, A.; MACHADO, J. Patotipos de *Escherichia coli* associados a infecções entéricas entre 2002 e 2012. *Boletim epidemiológico – Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge*. n. 1, p. 20-22, 2013.
- SJÖLING, A.; WIKLUND, G.; SAVARINO, S. J, COHEB, D.I. SVENNERHOLM A.M. Comparative analyses of phenotypic and genotypic methods for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* toxins and colonization factors. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 45, n. 10, p. 3295-3301, 2007.
- SOUZA, C.P. *Escherichia coli* as a specialized bacterial pathogen. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*. v. 6, n. 2, p. 341-352, 2006.
- TADESSE, D.A; ZHAO, S; TONG, E; AYERS, S. SINGH, A; BARTHOLOMEW, M.J; MCDERMOTT, P.F. Antimicrobial Drug Resistance in *Escherichia coli* from Humans and Food Animals, United States, 1950-2002. *Emerging Infectious Diseases*, v.18, n. 5, p. 741-749, 2012.
- VAN BOECKEL, T.P, CHARLES, B, GILBERTC, M, GRENFELL, B.T, LEVIN, S.A, A, ROBINSON, T.P, TEILLANT, A, LAXMINARAYANB, R. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 112, n. 18, p. 5649-5654, 2015.
- VIDAL, M., KRUGER, E., DURAN, C.; LAGOS, R.; LEVINE, M.; PRADO, V.; TORO, C., VIDAL R. Singlemultiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic *Escherichia coli* associated with enteric infections. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 43 n. 10, p. 5362-5365, 2005.
- VIDAL, R., VIDAL, M., LAGOS, R. LEVINE, M., PRADO, V. Multiplex PCR for Diagnosis of Enteric Infections Associated with Diarrheogenic *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 42, n. 4, p. 5362-5365, 2004.
- ZHAO, S, BLICKENSTAFF, K, BODEIS-JONES, S. GAINES, S.A, TONG, E, MCDERMOTT, P.F. Comparison of the Prevalences and Antimicrobial Resistances of *Escherichia coli* Isolates from Different Retail Meats in the United States, 2002 to 2008. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 78, n. 6, p. 1701–1707, 2012.
- WOODWARD, M. J.; CARROLL, P. J.; WRAY, C. Detection of entero- and verocyto-toxin genes in *Escherichia coli* from diarrhoea disease in animals using the polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology*, v. 31, p. 251-261, 1992.