

Avaliação dos padrões de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* portadoras e não portadoras dos genes *stx1*, *stx2* e *eae*

Evaluation of antimicrobial resistance patterns in Escherichia coli strains, carriers or not carriers of stx1, stx2 and eae genes

Murillo Ceola Stefano Pereira^[a], André Luiz Nagatani Rigueiro^[b], Rafael Keith Ono^[c], Everlon Cid Rigobelo^[d]

^[a] Zootecnista, doutorando em Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), Botucatu, SP - Brasil, e-mail: murillostefano@hotmail.com

^[b] Zootecnista, mestrando em Ciência e Tecnologia Animal, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), Dracena, SP - Brasil, e-mail: andrenagatani@yahoo.com.br

^[c] Zootecnista, doutorando em Genética e Melhoramento Animal, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), Jaboticabal, SP - Brasil, e-mail: keith@zootecnista.com.br

^[d] Agrônomo, doutor em Microbiologia Agropecuária, professor da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), Jaboticabal, SP - Brasil, e-mail: everlonnsms@fcav.unesp.br

Resumo

O presente estudo objetivou avaliar os padrões de resistência de cepas de *Escherichia coli*, portadoras e não portadoras dos genes *stx1*, *stx2* e *eae*, isoladas de fezes de bovinos leiteiros, a dez antimicrobianos. Foram coletadas 800 amostras de fezes de vacas leiteiras de duas propriedades rurais da região de Dracena (SP), durante o período de janeiro a junho de 2011. Após o isolamento das cepas, foi extraído o DNA das amostras pelo método de fervura. O DNA foi amplificado e verificou-se a presença dos genes de virulência de *E. coli* produtora da toxina shiga. Foram identificadas 90 amostras com a presença somente do gene *stx1*, 97 amostras somente com o gene *stx2*, 45 amostras somente com o gene *eae* e 115 amostras sem os genes de virulência. Os padrões de resistência foram similares entre os isolados portadores ou não dos genes de virulência *stx1*, *stx2*, *eae*. Contudo, não foi verificada nenhuma relação entre os padrões de virulência e os padrões de resistência aos antimicrobianos entre as amostras.

Palavras-chave: STEC. Antibióticos. *Eae*. *Stx1*. *Stx2*. Vacas leiteiras.

Abstract

The present study aimed to evaluate the antimicrobial resistance patterns of strains of Escherichia coli, carriers or not carriers of stx1, stx2 and eae genes, isolated from feces of dairy cattle to ten antimicrobials.



Eight-hundred (800) fecal samples of dairy cows were collected with the aid of a rectal swab from two farms in the region of Dracena – State of São Paulo, Brazil, from January to June 2011. DNA was extracted from isolates obtained from the fecal samples by the boiling method and DNA was amplified by PCR to verify the presence of STEC (shiga toxin E. coli) virulence genes. Ninety (90) samples contained only the stx1 gene, 97 samples only the stx2 gene, 45 samples only gene with eae gene and 115 samples did not contain virulence genes. Resistance levels were similar among isolates with or without stx1, stx2 and eae virulence genes. No relationship was found between patterns of virulence and antimicrobial resistance patterns.

Keywords: STEC. Antibiotics. Eae. Stx1. Stx2. Dairy cows.

Introdução

Os isolados da *Escherichia coli* produtora da toxina shiga (STEC) são considerados os mais importantes patógenos entre os grupos de microrganismos emergentes de origem alimentar, sendo o maior causador de inflamações no trato gastrointestinal e podendo causar colite hemorrágica ou síndrome urêmica hemolítica, tornando-se a principal causa de falência renal aguda em crianças (BEUTIN et al., 2004).

De acordo com Chapman et al. (2001), os ruminantes, em especial bovinos, ovinos e caprinos são os principais portadores de cepas de STEC causadora de infecções em humanos e sua transmissão ocorre, principalmente, por meio do consumo de carne mal cozida, produtos lácteos não pasteurizados, vegetais e água contaminada por fezes contendo cepas de STEC (CAPRIOLI et al., 2005).

As doenças causadas em humanos devido a cepas de STEC ocorrem por meio da toxina shiga, sintetizada pela bactéria portadora dos genes *stx1*, *stx2* e suas variantes, que inibem a síntese proteica das células dos hospedeiros, promovendo assim a morte celular. Outro fator de virulência em STEC inclui o gene *eae* que codifica uma intimina responsável por lesionar células eucarióticas (CHART, 2000).

Shea (2003) relatou um aumento no número de microrganismos patogênicos multirresistentes a diversos antimicrobianos nos últimos anos, tornando-se um problema crescente na medicina humana e veterinária. Observações sugerem que o uso de antibióticos na produção animal é uma força motriz para o desenvolvimento da resistência aos antibióticos de certas espécies de bactérias patogênicas (WITTE, 1998).

A utilização de antibióticos na pecuária é um tema controverso devido ao potencial de transferência de

elementos de resistência aos antibióticos presentes em bactérias nos animais para bactérias presentes nos seres humanos, podendo impactar diretamente a saúde pública causando falha no tratamento, prolongamento da doença, aumento dos custos associados, bem como a morte (KELLY et al., 2004).

Caso ocorra correlação entre perfil de virulência e perfil de resistência a antimicrobianos como alguns estudos sugerem (GALLAND et al., 2001; MENG et al., 1998; SCHROEDER et al., 2002; WILLSHAW et al., 2001), o uso indiscriminado destes medicamentos poderiam selecionar concomitantemente cepas resistentes e também as patogênicas portadoras de genes de virulência, o que poderia contribuir para o aumento das ocorrências de doenças causadas por cepas de STEC.

O presente estudo objetivou comparar os padrões de resistência a dez antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* portadoras e não portadoras dos genes *stx1*, *stx2* e *eae* isoladas de fezes de bovinos leiteiros.

Materiais e métodos

Coleta das amostras e isolamento das cepas

Foram coletadas 800 amostras de fezes de vacas leiteiras, com auxílio de *swab* retal de duas propriedades rurais da região de Dracena (SP), durante o período de janeiro a junho de 2011. Os *swabs* foram introduzidos no reto dos animais e imediatamente colocados em tubos de ensaio, contendo caldo verde brilhante, e transportados em seguida para o laboratório de microbiologia da Universidade Estadual Paulista, Campus Experimental de Dracena. No laboratório, uma alíquota de 1 mL de cada tubo de

ensaio foi inoculada em uma placa de Petri contendo Ágar MacConkey e incubada em estufa microbiológica a 37 °C por 24 h para o isolamento das cepas de *E. coli*. De cada placa de Petri foram selecionadas cinco colônias com características culturais morfológicas semelhantes às de *E. coli* e foram identificadas, segundo metodologia de Koneman et al. (1997), com base nos testes de fermentação da lactose, produção de indol, reações de vermelho de metila, utilização de citrato, produção de urease e produção de gás sulfídrico, após incubação por 24 h a 37 °C.

O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética Local da Universidade Estadual Paulista, sob o protocolo de número 21/2010.

Extração do DNA bacteriano

O DNA microbiano foi extraído segundo a técnica de Keskimaki et al. (2001). As colônias de *E. coli* foram semeadas e incubadas a 37 °C por 12 h em tubos de ensaio contendo 1 mL de caldo Luria. Em seguida, as culturas foram transferidas para microtubos tipo Eppendorf e centrifugada a 15.000 x *g* por 1 min para precipitação das células e descarte do sobrenadante. As células precipitadas foram suspensas duas vezes em 250 µL de água ultrapura estéril e agitada em vortex por 30 s. Após a segunda lavagem, os microtubos foram colocados em água fervente por 10 min e centrifugados a 14.000 x *g* por um período de 30 s. Retirou-se 150 µL do sobrenadante que foi transferido para outro microtubo e estocado em freezer até o momento do uso.

Procedimento do PCR Multiplex e detecção dos genes

Para o procedimento de amplificação por PCR multiplex foi seguida a metodologia de Vidal et al. (2005), adaptada para conter primers para amplificação apenas dos genes *stx1*, *stx2* e *eae*. Cada 50 µL da mistura da reação conteve 1 mM de desoxinucleosídeos trifosfato, 2 pmol de cada primer, 1,5 mM MgCl₂, tampão (10 mM tris HCL, 50 mM KCl), 0,2 µL de Taq DNA polimerase e 3 µL de DNA molde.

Foram utilizados 40 µL da mistura de reação pré-aquecida à 94 °C por 5 minutos e acrescentou-se 8

unidades de Taq DNA polimerase na mistura de reação. As amostras foram amplificadas por 35 ciclos, sendo que cada ciclo foi constituído em 1,5 minutos a 94 °C para desnaturação, 1,5 minutos a 60 °C para o anelamento com os primers e 1,5 minutos a 72 °C para alongação.

Os pares de primers utilizados para amplificação dos genes a seguir foram, respectivamente: *stx1*: CAG TTA ATG TGG TGG GGA AGG e CAC CAG ACA ATG TAA CCG CTG, para gerar amplicon de tamanho esperado de 348 pb; *stx2*: ATC CTA TTC CCG GGA GTT TAC G e GCG TCA TCC TAT ACA CAG GAG C, tamanho, para gerar amplicon de 584 pb; *eae*: TCA ATG CAG TTC GGT TAT GAG TT e GTA AAG TCC GTT ACC CCA ACC TG, para gerar amplicon de 482 pb.

Foram amplificadas as cepas-padrão de *E. coli* EDL933 (O157: H7, *stx1*, *stx2* e *eae*) (controle positivo) e DH5a (controle negativo).

Sensibilidade a antimicrobianos

Todas as amostras contendo *E. coli* foram submetidas a testes de sensibilidade pelo método de difusão de disco (CLSI, 2009) frente aos seguintes antimicrobianos: ampicilina, tetraciclina, trimetoprima, eritromicina, ácido nalidíxico, estreptomomicina, novobiocina, lincomicina, penicilina e neomicina (CECON, São Paulo).

Comparações realizadas

As comparações foram realizadas da seguinte maneira: todas as cepas de *E. coli* portadoras de um único gene de virulência ou não foram separadas em um grupo. Então foram separados quatro grupos de isolados, sendo que o primeiro grupo continha 90 cepas que eram portadoras apenas do gene *stx1*, 97 isolados pertencentes ao segundo grupo eram portadores apenas do gene *stx2*, 45 isolados pertencentes ao terceiro grupo eram portadores apenas do gene *eae* e 115 isolados pertencentes ao quarto grupo não eram portadores dos três genes. Os padrões de resistência antimicrobiana para cada grupo foram verificados e para cada resistência a um determinado antibiótico foi dado um valor numérico. Assim foi possível verificar e comparar as frequências que cada resistência aparecia em cada grupo separado de *E. coli*.

Análise estatística

Os padrões de resistência a antimicrobianos entre as cepas de *E. coli* portadoras ou não dos genes *stx1*, *stx2* e *eae* foram comparados por meio do teste do Qui-quadrado para independência, utilizando o programa AgroEstat (BARBOSA; MALDONADO, 2011) e considerando 5% como nível de significância.

Resultados

Das 800 amostras coletadas, 561 foram confirmadas bioquimicamente sendo *E. coli*, das quais 90 portavam apenas o gene *stx1*, 97 apenas o gene *stx2*, 45 apenas o gene *eae*, 37 ambos os genes *stx1* e *stx2*, 110 os genes *stx1* e *eae* e 67 os genes *stx2* e *eae* (Tabela 1).

Os padrões de resistência aos antimicrobianos foram similares nos isolados portadores dos genes *stx1* (Figura 1), *stx2* (Figura 2), *eae* (Figura 3) e nos não portadores dos genes de virulência (Figura 4).

Porém, não houve relação ($P > 0,05$) entre os padrões de resistência aos antimicrobianos relacionados entre os isolados *E. coli* portadores ou não dos genes de virulência *stx1*, *stx2*, *eae*.

Tabela 1 – Frequência dos fatores de virulência presentes nos 561 isolados de *Escherichia coli* de fezes de vacas leiteiras.

Fatores de virulência / isolados	Número de isolados	Frequência (%)
<i>stx1</i> somente	90	11,2
<i>stx2</i> somente	97	12,1
<i>eae</i> somente	45	5,6
<i>stx1</i> + <i>stx2</i>	37	4,6
<i>stx1</i> + <i>eae</i>	110	13,7
<i>stx2</i> + <i>eae</i>	67	8,4
Número de <i>E. coli</i> isoladas	561	70,1
Número de <i>E. coli</i> sem os genes <i>stx1</i> , <i>stx2</i> e <i>eae</i>	115	29,9

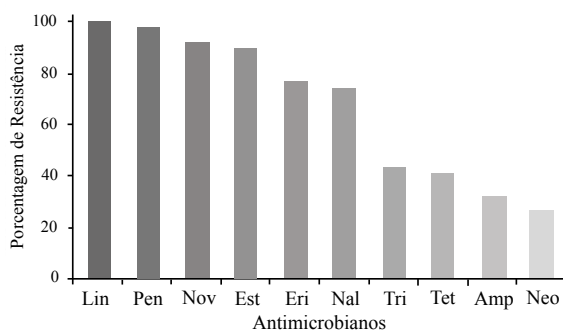


Figura 1 – Porcentagem dos padrões de resistência dos 90 isolados de *Escherichia coli* portadores do gene *stx1* provenientes de gado leiteiro da região de Dracena

Legenda: Amp: ampicilina, Tet: tetraciclina, Tri: trimetoprina, Eri: eritromicina, Nal: ácido nalidíxico, Est: estreptomicina, Nov: novobiocina, Lin: lincomicina, Pen: penicilina e Neo: neomicina.

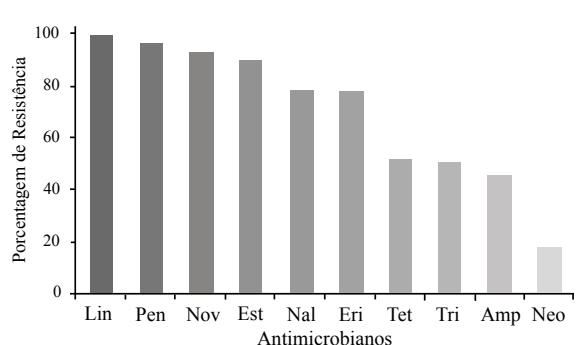


Figura 2 – Porcentagem dos padrões de resistência dos 97 isolados de *Escherichia coli* portadores do gene *stx2* provenientes de gado leiteiro da região de Dracena

Legenda: Amp: ampicilina, Tet: tetraciclina, Tri: trimetoprina, Eri: eritromicina, Nal: ácido nalidíxico, Est: estreptomicina, Nov: novobiocina, Lin: lincomicina, Pen: penicilina e Neo: neomicina.

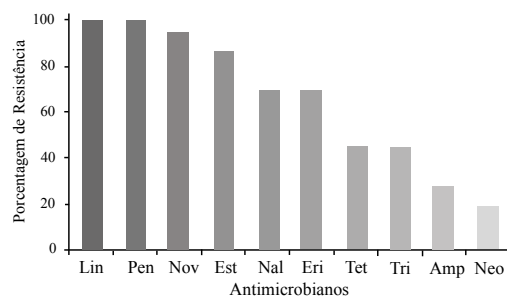


Figura 3 – Porcentagem dos padrões de resistência dos 45 isolados de *Escherichia coli* portadores do gene *eae* provenientes de gado leiteiro da região de Dracena

Legenda: Amp: ampicilina, Tet: tetraciclina, Tri: trimetoprina, Eri: eritromicina, Nal: ácido nalidíxico, Est: estreptomicina, Nov: novobiocina, Lin: lincomicina, Pen: penicilina e Neo: neomicina.

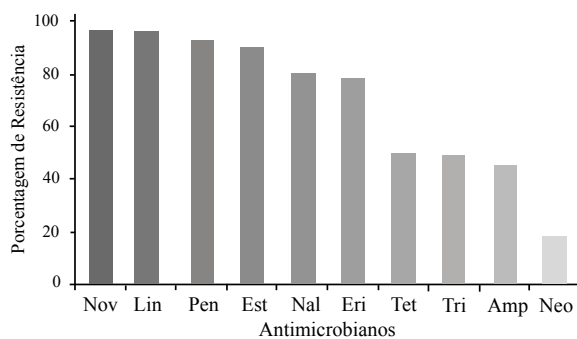


Figura 4 – Porcentagem dos padrões de resistência dos 115 isolados de *Escherichia coli* não portadores dos genes *stx1*, *stx2* e *eae* provenientes de gado leiteiro da região de Dracena

Legenda: Amp: ampicilina, Tet: tetraciclina, Tri: trimetoprina, Eri: eritromicina, Nal: ácido nalidíxico, Est: estreptomicina, Nov: novobiocina, Lin: lincomicina, Pen: penicilina e Neo: neomicina.

Discussão

No presente estudo não foi verificada relação entre resistência antimicrobiana e fatores de virulência; no entanto, o elevado nível de resistência das cepas para 800 amostras de fezes torna-se motivo de preocupação.

Resultados similares foram relatados por Mora et al. (2005) que analisaram 722 cepas de *E. coli* isoladas de humanos, bovinos, ovinos e alimentos cárneos com o perfil de susceptibilidade a 26 tipos de antimicrobianos em relação aos seus sorotipos, fagos e fatores de virulência. Os resultados demonstraram que não houve efeito em relação ao perfil de susceptibilidade quando comparado a cepas STEC O157 das cepas STEC não O157. As diferenças ocorreram em relação à fonte dos isolados, havendo uma associação entre cepas de STEC não O157 portadora do gene *stx1* e um elevado nível de resistência a ampicilina, amoxicilina, cefalotina em relação às cepas portadoras dos genes *stx2* e de ambos os genes.

Zhao et al. (2001) demonstraram que os genes de resistência aos antimicrobianos são transportados por elementos móveis, sendo capazes de serem transferidos para cepas bacterianas patogênicas.

Analisando 177 cepas de STEC quanto à susceptibilidade a antimicrobianos e a presença de integrons, Nagachinta e Chen (2009) sugeriram uma possível atuação do integron de um plasmídeo

conjugativo na disseminação de genes de resistência a antibióticos e de patogenicidade de *E. coli*.

O gene de virulência com maior predominância encontrado no presente estudo foi o *stx2*, corroborando com os dados encontrados por Gow e Waldner (2009) e Bandyopadhyay et al. (2009) que observaram a presença do gene *stx2* em isolados de bezerros e yaks (*Poephagus grunniens*), respectivamente. O gene com menor predominância observado neste estudo foi o *eae*, e dados semelhantes foram registrados em bovinos e ovinos (BLANCO et al., 2003) e em yaks (*Poephagus grunniens*) (BANDYOPADHYAY et al., 2009). Outros estudos relataram que os genes *stx2* e *eae* são mais associados a graves doenças em humanos do que *stx1* (BOERLIN et al., 1999).

Contudo, a não relação entre os fatores de virulência e elementos de resistência aos antimicrobianos pode ser explicada pela diferente localização desses fatores e elementos, estando os fatores de virulência normalmente localizados nos cromossomos e os genes de resistência à antimicrobianos em plasmídeos (HACKER et al., 1990; BLUM et al., 1994).

Conclusão

A partir dos dados obtidos, observou-se que os padrões de resistência aos antimicrobianos de isolados de *E. coli* portadores e não portadores dos genes *stx1*, *stx2* e *eae* são semelhantes, independentemente da presença dos genes de virulência que as cepas do grupo são portadoras. Os resultados de resistência aos antimicrobianos foram muito semelhantes para o grupo no qual as cepas de *E. coli* eram não portadoras do gene estudado. Esse resultado nos leva a concluir que os padrões de resistência antimicrobiana não estão associados à presença desses fatores de virulências estudados.

Referências

- BANDYOPADHYAY, S. et al. Virulence gene and antibiotic resistance profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* prevalent in captive yaks (*Poephagus grunniens*). **Veterinary Microbiology**, v. 138, n. 3-4, p. 403-404, 2009. doi:10.1016/j.vetmic.2009.04.016.

- BARBOSA, J. C.; MALDONADO JR., W. **AgroEstat**: Sistema para Análises Estatísticas de Ensaios Agronômicos. Versão 1.1.0.696, 2011.
- BEUTIN, L. et al. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1099-1108, 2004. PMID:15004060.
- BLANCO, M. et al. Serotypes, virulence genes and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1351-1356, 2003. doi:10.1128/JCM.41.4.1351-1356.2003.
- BLUM, G. et al. Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-specific loci in the chromosome of an *Escherichia coli* wild-type pathogen. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 2, p. 606-614, 1994. PMID:7507897.
- BOERLIN, P. et al. Associations between virulence factors of Shiga toxin producing *Escherichia coli* and disease in humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 497-503, 1999. PMID:9986802.
- CAPRIOLI, A. et al. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. **Veterinary Research**, v. 36, n. 3, p. 289-311, 2005. PMID:15845227.
- CHAPMAN, P. A. et al. *Escherichia coli* O157 in cattle and sheep at slaughter, on beef and lamb carcasses, and in raw beef and lamb products in South Yorkshire. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, n. 1-2, p. 139-150, 2001. PMID:11252496.
- CHART, H. VTEC enteropathogenicity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. S1, p. 12S-23S, 2000. doi:10.1111/j.1365-2672.2000.tb05328.x.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**. CLSI Documente M02-A10. Wayne, PA: CLSI, 2009.
- COCCHI, S. et al. Distribution and characterization of integrons in *Escherichia coli* strains of animal and human origin. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 126-132, 2007. PMID:17456180.
- GALLAND, J. C. et al. Prevalence, Antibiotic susceptibility, and diversity of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from a longitudinal study of beef cattle feedlots. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 1619-1627, 2001. PMID:11282614.
- GOW, S. P.; WALDNER, C. L. Antimicrobial resistance and virulence factors *stx1*, *stx2*, and *eae* in generic *Escherichia coli* isolates from calves in western Canadian cow-calf herds. **Microbial Drug Resistance**, v. 15, n. 1, p. 61-67, 2009. doi:10.1089/mdr.2009.0860.
- HACKER, J. et al. Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur *in vivo* and *in vitro* in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates. **Microbiology and Pathogens**, v. 8, n. 3, p. 213-225, 1990. PMID:1974320.
- KELLY, L. et al. Animal growth promoters: to ban or not to ban? A risk assessment approach. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, n. 3, p. 205-212, 2004. PMID:15325422.
- KESKIMAKI, M. et al. EPEC, EAC and STEC in stool specimens: prevalence and molecular epidemiology of isolates. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 40, n. 4, p. 151-156, 2001. PMID:11576786.
- KONEMAN, E. W. et al. **Color atlas and textbook microbiology**. Philadelphia: Lippincott Company, 1997.
- MENG, X. J. et al. Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. **Journal of Virology**, v. 72, n. 12, p. 9714-9721, 1998. PMID:9811705.
- MORA, A. et al. Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 strains isolated from humans cattle, sheep and food in Spain. **Research in Microbiology**, v. 156, n. 7, p. 793-806, 2005. PMID:15921895.
- NAGACHINTA, S.; CHEN, J. Integron-mediated antibiotic resistance in Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 1, p. 21-27, 2009. PMID:19205459.
- SCHROEDER, C. M. et al. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O126, O103, O111, O128, and O145 from animals and humans. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 12, p. 1409-1414, 2002.

SHEA, K. M. Antibiotic resistance: what is the impact of agricultural uses of antibiotics on children's health? **Pediatrics**, v. 112, n. 1, p. 253-258, 2003. PMID:12837918.

VIDAL, M. et al. Single multiplex 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. doi:10.1128/JCM.43.10.5362-5365.2005.

WILLSHAW, W. et al. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) O157 and other VTEC from human infections in England and Wales: 1995-1998. **Journal of Medical Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 135-142, 2001. PMID:11211220.

WITTE, W. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. **Science**, v. 279, n. 5353, p. 996-997, 1998. doi:10.1126/science.279.5353.996.

ZHANG, X. et al. Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 2, p. 664-670, 2000. doi:10.1086/315239.

ZHAO, S. et al. Identification and characterization of integron-mediated antibiotic resistance among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 1558-1564, 2001. PMID:11282605.

Recebido em: 06/01/2014

Received in: 01/06/2014

Aprovado em: 12/03/2015

Approved in: 03/12/2015