

## **DETECÇÃO DE GENES DE ENTEROTOXINAS, CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADOS DO QUEIJO ARTESANAL SERRANO<sup>1</sup>**

Rafaella da Rocha Soletti<sup>2</sup>, Sandra Maria Ferraz<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Vinculado ao projeto “Sanidade Animal”

<sup>2</sup>Acadêmico (a) do Curso de Medicina Veterinária – CAV – Bolsista PROBIC/UDESC

<sup>3</sup>Orientador, Departamento de Medicina Veterinária – CAV – sandra.ferraz@udesc.br

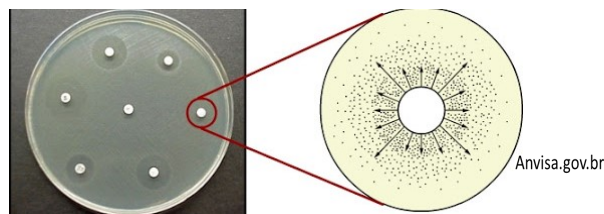
O queijo artesanal serrano é um produto típico da região da Serra Catarinense, produzido de forma heterogênea em propriedades rurais, a partir do leite cru. Inúmeros relatos na literatura alertam sobre a ocorrência de micro-organismos patogênicos em queijos artesanais, assumindo grande relevância para a saúde pública, já que o consumo desse produto contaminado pode desencadear intoxicações e toxinfecções alimentares. Dentre os micro-organismos encontrados nesses alimentos está *Escherichia coli*, patógeno caracterizado pela produção de enterotoxinas, além de apresentar cepas com multirresistência aos antimicrobianos. Um dos mecanismos de resistência desenvolvido pelas *E. coli* é a hidrolização do anel beta-lactâmico, mecanismo chamado de ESBL (“extended-spectrum beta-lactamases”), conferindo resistência à classe dos beta-lactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos. Apesar desse mecanismo não se aplicar aos Carbapenêmicos (principal classe de antimicrobianos de uso humano), já existem estudos que confirmam a presença de carbapenemases, enzimas que hidrolisam o fármaco e causam resistência. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo a caracterização fenotípica e genotípica do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isolados de queijo artesanal serrano. Para o estudo foram utilizadas um total de 117 cepas de *E. coli* isoladas, das quais 8 cepas eram de leite cru e 109 de Queijo Artesanal Serrano, obtidas de estudos anteriores no Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal (CEDIMA), armazenadas até o momento do estudo. As amostras foram previamente inoculadas em caldo BHI e incubadas para recuperação das bactérias, após isoladas em ágar TSA e confirmadas com testes bioquímicos. Os testes de susceptibilidade dos isolados foram realizados de acordo com o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), pelo teste de difusão em disco em placas de Ágar Muller-Hinton demonstradas no modelo da **Figura 1**, usando os discos de antimicrobianos apresentados na **Tabela 1**. Em cada placa foi analisada uma cepa de *E. coli* e seus halos de inibição formados, permitindo sua classificação como sensíveis ou resistentes. Outro método utilizado foi a caracterização do fenótipo e genótipo das cepas isoladas, de forma a identificar aquelas produtoras de ESBL ou resistentes à carbapenemos. Para ESBL foi usada a difusão em disco, posicionando um disco de AMC no centro e outros beta-lactâmicos a 30mm do disco central, após incubação, foram consideradas produtoras de ESBL aquelas cepas que apresentaram aumento da área de inibição ou formação de “phantom zone”, com distorção da área de inibição ao redor dos discos beta-lactâmicos. As cepas que apresentaram fenótipo de produção de ESBL foram posteriormente submetidas à Multiplex-PCR para caracterização do genótipo, a fim de detectar a presença dos genes *blaTEM*, *blaOXA*, *blaSHV*, *blaCTX-M* e *blaCTX-M-3*, para produção de ESBL. Já na caracterização de resistência à Carbapenêmicos foram usadas placas de Ágar Muller-Hinton com suplementações diversas para cada tipo bacteriano e discos de Meropenem e Imipenem. Os resultados foram avaliados a partir do diâmetro das zonas de inibição frente à esses antimicrobianos e as amostras foram submetidas à

Multiplex- PCR para caracterização genotípica das que se mostraram resistentes aos Carbapenêmicos, afim de detectar a presença do gene de resistência: *bla*OXA-48-LIKE.

Como resultado desse estudo, identificamos a presença de *E.coli* em diversas amostras de leite cru e queijo artesanal serrano, um grande indicativo de falta de medidas sanitárias adotadas pelos produtores. O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos apontou que 52.99% das cepas isoladas apresentaram-se sensíveis aos antimicrobianos testados, sendo que 8.55% apresentaram perfil de multirresistência e 17.95% apresentaram resistência à apenas duas classes deles. A investigação da produção de ESBL nos mostrou que 3.42% das bactérias testadas o produzem de fato, as quais, inclusive, apresentaram multirresistência no método anterior, gerando grande preocupação já que os beta-lactâmicos continuam sendo os antimicrobianos mais utilizados contra bactérias Gram-negativas. Além disso, através do Multiplex-PCR, foi constatado que o gene mais abundante dentre os isolados positivos para ESBL, foi o *bla*TEM. Por outro lado, todas as cepas isoladas apresentaram-se negativas em relação à resistência contra Carbapenemos, não havendo presença do gene *bla*OXA-48 no Multiplex-PCR. Como tais contaminantes apresentam riscos à saúde do consumidor por meio das toxinfecções e resistência aos atuais métodos de combate a microorganismos, faz-se necessária a intensificação da fiscalização do manejo e inspeção sanitária em todas as etapas da produção do Queijo Artesanal Serrano e sua matéria prima, por médicos veterinários qualificados, responsáveis pela saúde única e conhecedores de todo o processo de produção adequado desses insumos, de forma a garantirem sua higiene e qualidade. A transmissão de genes de virulência e resistência por *E. coli* e outras bactérias patogênicas intestinais é frequentemente associada a plasmídeos, portanto, produtos industrializados e alimentos de origem animal são potenciais reservatórios para bactérias resistentes a antimicrobianos e altamente virulentas, sendo de extrema importância apontar questões relacionadas à alimentação e normas de segurança, no que diz respeito aos aspectos de qualidade da matéria-prima, produção primária, processamento, varejo e manuseio do consumidor, bem como educação em manipulação higiênica no processo de fabricação, além de continuas análises laboratoriais para detecção de microorganismos em produtos de origem animal, impedindo que amostras contaminadas cheguem até o consumidor.

**Tabela 1.** Antimicrobianos utilizados em teste de difusão em disco.

AMC (amoxicilina-clavulanato) 20/10ug	AMP (ampicilina) 10ug	TOB (tobramicina) 10g	IPM (imipenem) 10ug
NIT (nitrofurantoin) 300ug	TET (tetraciclina) 30ug	GEN (gentamicina) 10ug	CFO (cefxitin) 30ug
SUT (trimetopim) 23.75ug	DOX (doxaciiclina) 10ug	CRO (ceftriaxine) 30ug	AMI (amicacina) 30ug
EST (estreptomicina) 10ug	CIP (ciprofloxacina) 5ug	CAZ (ceftazidime) 30ug	CLO (cloranfenicol) 30ug
CTX (cefotaxime) 30ug	NOR (norfloxacina) 10ug	IPM (imipenem) 10ug)	CPM (cefepime) 30ug
MER (meropenem) 10ug	LVX (levofloxacina) 5ug	CFO (cefxitin) 30ug	



**Figura 1.** Modelo de teste de difusão em ágar-gel para detecção de susceptibilidade antimicrobiana.

**Palavras-chave:** *E. coli* diarreioigenica. Multirresistência. ESBL.