



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS  
CAMPUS DE ARAGUAÍNA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**DISTRIBUIÇÃO MICRORREGIONAL E SUSCEPTIBILIDADE  
ANTIMICROBIANA DE *ESCHERICHIA COLI* PATOGÊNICA  
ISOLADAS DE BOVINOS NO MUNICÍPIO DE ARAGUAÍNA-TO**

**KARINA ALMEIDA MACIEL**

ARAGUAÍNA  
2019

**KARINA ALMEIDA MACIEL**

**DISTRIBUIÇÃO MICRORREGIONAL E SUSCEPTIBILIDADE  
ANTIMICROBIANA DE *ESCHERICHIA COLI* PATOGENICA  
ISOLADAS DE BOVINOS NO MUNICÍPIO DE ARAGUAÍNA-TO**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutora, junto ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal Tropical da Universidade Federal do Tocantins.

Área de concentração: Produção Animal  
Linha de pesquisa: Higiene e Tecnologia de Alimentos

Orientador (a): Prof (a). Dra. Sílvia Minharro Barbosa  
Co- orientadores (a): Prof (a). Dra. Bruna Alexandrino  
Prof (a). Dra. Helcileia Dias Santos

KARINA ALMEIDA MACIEL

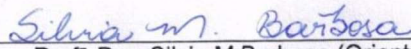
**DISTRIBUIÇÃO MICRORREGIONAL E SUSCEPTIBILIDADE  
ANTIMICROBIANA DE *ESCHERICHIA COLI* PATOGENICA  
ISOLADAS DE BOVINOS NO MUNICÍPIO DE ARAGUAÍNA-TO**

Tese apresentada como requisito parcial para  
obtenção do título de Doutora, junto ao  
Programa de Pós-graduação em Ciência Animal  
Tropical da Universidade Federal do Tocantins.

Orientador (a): Prof(a). Dra. Sílvia Minharro  
Barbosa

Aprovada em: 27/06/2019

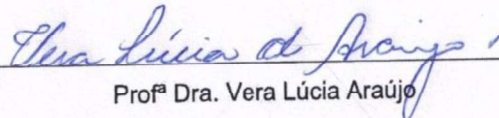
BANCA EXAMINADORA



Profª Dra. Sílvia M Barbosa (Orientadora)



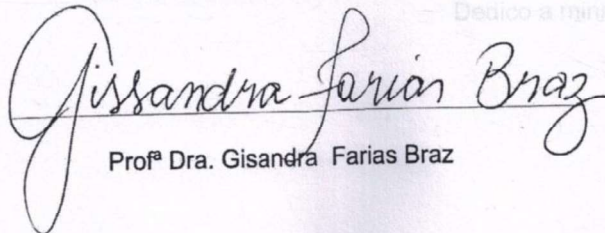
Profª Helcileia Dias Santos



Profª Dra. Vera Lúcia Araújo



Profª Dra. Francisca Elda Ferreira Dias



Profª Dra. Gisandra Farias Braz

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins**

---

M152d Maciel, Karina.  
DISTRIBUIÇÃO MICRORREGIONAL E SUSCEPTIBILIDADE  
ANTIMICROBIANA DE ESCHERICHIA COLI PATOGENICA  
ISOLADAS DE BOVINOS NO MUNICÍPIO DE ARAGUAÍNA-TO. /  
Karina Maciel. – Araguaína, TO, 2019.  
98 f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus  
Universitário de Araguaína - Curso de Pós-Graduação (Doutorado) em  
Ciência Animal Tropical, 2019.

Orientadora : Sílvia Minharro Barbosa

Coorientadora : Helcileia Dias Santos/ Bruna Alexandrino

1. EHEC. 2. EPEC. 3. Ruminantes. 4. Saúde pública. I. Título

**CDD 636.089**

---

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de  
qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde  
que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime  
estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica  
da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

Dedico a minha amada mãe!

“Trabalho e oração superam tudo”.

Pietro Mannarino

## RESUMO

A resistência bacteriana é um problema de saúde global, onde a *Escherichia coli* (*E. coli*) está frequentemente envolvida em situações de multirresistência aos antibióticos de importância clínica para o tratamento em humanos, sendo essa espécie bacteriana utilizada frequentemente como indicador de resistência em produtos de origem animal, por ser essa uma das principais vias de disseminação de resistência a antibióticos para humanos de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS). Além disso, os bovinos são sabidamente considerados reservatórios assintomáticos e potenciais disseminadores de O157:H7, sorotipo esse de importância mundial por desencadear complicações renais e neurológicas graves em humanos. Da mesma forma o sorogrupo de *E. coli* enteropatogênica destaca-se também por ser uma das principais causas de diarreia infantil em todo o mundo, no entanto, existem poucos dados epidemiológicos acerca da frequência do mesmo em bovinos destinados ao consumo humano. Assim, o objetivo do presente trabalho foi determinar a susceptibilidade a antibióticos utilizados rotineiramente na atenção à saúde através do teste de sensibilidade microbiana por disco- difusão, bem como identificação dos sorotipos O157:H7, EPEC (A, B e C) e EIEC (A e B) e pesquisa do gene *eae* e *rfb* O157:H7 em 259 amostras de *E. coli* isoladas de fezes e conteúdo ruminal de 323 bovinos abatidos sob Inspeção Estadual em Araguaína-To. No total, foram obtidos 259 isolados de *E. coli*, sendo 186 isolados de fezes e 73 isolados de conteúdo ruminal. Quanto a sorologia, 149 dos isolados foram positivos frente aos anti-soros O157:H7 e EPEC, sendo 22 para O157:H7 e 127 para EPEC (A, B e C), houve uma maior taxa de positivos para o sorogrupo B. foram obtidas 110 amostras negativas frente aos anti-soros. E quanto a pesquisa dos genes, 7 amostras das 259 foram positivas para o gene *eae* e nenhuma para o gene *rfb* O157:H7. No geral, a sulfonamida foi o antibiótico com maior índice de resistência, seguida de florfenicol, gentamicina, enrofloxacina e amoxicilina + ácido clavulânico, doxiciclina e cefepime. Ao analisarmos os diferentes materiais biológicos pesquisados, os isolados de fezes foram resistentes a quatro antibióticos e os do conteúdo ruminal a oito, e quando comparado o perfil de multirresistência os isolados de fezes foram resistentes a ciprofloxacina e os do conteúdo ruminal ao cloranfenicol, enrofloxacina, cefepime e doxiciclina. Os isolados positivos frente ao anti-soro O157:H7 apresentaram multirresistência a 9 antibióticos, e os isolados positivos frente ao anti-soro EPEC (A, B e C) foram multirresistentes a 2 antibióticos. Os isolados positivos ao gene *eae* apresentaram multirresistência a 6 antibióticos. Em nosso estudo, as amostras negativas frente aos anti-soros testados apresentaram perfil de multirresistência a 5 antibióticos. O perfil de multirresistência encontrados nesse trabalho sugerem a necessidade de uma maior cautela no uso de antibióticos para bovinos na região estudada, tendo em vista as altas taxas de resistência obtidas e o uso concomitante de alguns antibióticos de importância clínica em humanos, e a técnica de aglutinação direta utilizada, sugerem bovinos como potencial reservatório da categoria EPEC.

**Palavras-chave:** EHEC, EPEC, ruminantes, saúde pública

## ABSTRACT

Bacterial resistance is a global health problem, where *Escherichia coli* (*E. coli*) is often involved in multidrug resistance to clinically important antibiotics for treatment in humans, and this bacterial species is often used as an indicator of resistance in bacterial products. animal origin, as this is one of the main routes of spread of antibiotic resistance to humans according to the World Health Organization (WHO). In addition, cattle are known to be asymptomatic reservoirs and potential disseminators of O157: H7, a serotype of worldwide importance for triggering severe renal and neurological complications in humans. Similarly, *E. coli* enteropathogens serogroup also stands out as being a major cause of childhood diarrhea worldwide, however, there is little epidemiological data on its frequency in cattle intended for human consumption. Thus, the aim of the present study was to determine the susceptibility to antibiotics routinely used in health care by means of disc-diffusion microbial susceptibility testing, as well as to identify O157: H7, EPEC (A, B and C) and EIEC seropathotypes. (A and B) and search for the *eae* and *rfb* O157: H7 gene in 259 fecal isolated *E. coli* samples and ruminal content of 323 cattle slaughtered under State Inspection in Araguaína-To. In total, 259 isolates of *E. coli* were obtained, 186 isolates of feces and 73 isolates of ruminal content. Regarding serology, 149 of the isolates were positive against O157: H7 and EPEC antisera, 22 for O157: H7 and 127 for EPEC (A, B and C), there was a higher positive rate for serogroup B. 110 negative samples were obtained from the antisera. And as for gene research, 7 samples out of 259 were positive for the *eae* gene and none for the *rfb* O157: H7 gene. Overall, sulfonamide was the antibiotic with the highest resistance, followed by florfenicol, gentamicin, enrofloxacin and amoxicillin + clavulanic acid, doxycycline and cefepime. By analyzing the different biological materials investigated, stool isolates were resistant to four antibiotics and those of rumen content to eight, and when comparing the multidrug resistance profile stool isolates were resistant to ciprofloxacin and those of rumen content to chloramphenicol, enrofloxacin, cefepime and doxycycline. O157: H7 antiserum positive isolates were multidrug resistant to 9 antibiotics, and EPEC antisera positive isolates (A, B and C) were multidrug resistant to 2 antibiotics. The isolates positive for the *eae* gene showed multidrug resistance to 6 antibiotics. In our study, negative samples against the antisera tested showed multidrug resistance profile to 5 antibiotics. The multidrug resistance profile found in this study suggests the need for greater caution in the use of antibiotics for cattle in the region studied, given the high resistance rates obtained and the concomitant use of some clinically important antibiotics in humans, and the technique of Direct agglutination used suggest cattle as a potential reservoir of the EPEC category.

**Key words:** EHEC, EPEC, public health, ruminants,



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Capítulo 2

Figura 1. Mapa microrregião Araguaína e os respectivos Municípios coletados nesse estudo. Fonte: Epi Info® 7.0.....	51
Figura 2. Distribuição geográfica e frequência de <i>E. coli</i> i isoladas de fezes e rúmen de bovinos abatidos sob Inspeção Estadual em Araguaína -To entre abril e agosto de 2016. Fonte: Epi info® 7.0.....	55
Figura 3. Distribuição espacial dos municípios com maior número de isolados de <i>E. coli</i> . Distribuição geográfica de resistência por município. Distribuição geográfica de isolados de <i>E. coli</i> positivos para o gene <i>eae</i> . Fonte: Epi info® 7.0 .....	61
Figura 4. Distribuição espacial de isolados positivos frente ao anti-soro O157:H7 e seus respectivos municípios de origem. Fonte: Epi info® 7.0. ....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Quadro 1. Importantes características de virulência de tEPEC e aEPEC.....	17
Quadro 1. Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho e o tamanho dos amplicons e temperatura de anelamento para identificação do gene <i>uidA</i> , <i>eae</i> . Fonte: elaborado pelo autor.....	53
Gráfico 1. Perfil de multirresistência de isolados positivos para o gene <i>eae</i> de fezes e conteúdo ruminal de bovinos abatidos sob Inspeção Estadual em Araguaína-TO no período de abril a agosto de 2016.....	63

### Capítulo 3

Figura 1. Mapa microrregião Araguaína e os respectivos municípios coletados nesse estudo. Fonte: Epi Info® 7.0. ....	52
Figura 2. Distribuição geográfica e frequência de <i>E. coli</i> i isoladas de fezes e rúmen de bovinos abatidos sob Inspeção Estadual em Araguaína -To entre abril e agosto de 2016. Fonte: Epi info® 7.0.....	56
Figura 3. Distribuição geográfica de isolados de <i>E. coli</i> positivos para o gene <i>eae</i> segundo o número de isolados resistentes. Fonte: Epi info® 7.0 .....	62
Figura 4. Mapa microrregião Araguaína e os respectivos Municípios coletados nesse estudo. Fonte: Epi Info® 7.0. ....	75

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

Tabela 1. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de <i>E. coli</i> isoladas de fezes e conteúdo ruminal de bovinos abatidos sob Inspeção Estadual em Araguaína- To no período de abril a agosto de 2016.....	58
Tabela 2. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de isolados de <i>E. coli</i> positivos para o gene <i>eae</i> de fezes e conteúdo ruminal isolados de bovinos abatidos sob Inspeção Estadual em Araguaína- To no período de abril a agosto de 2016.....	62

### CAPÍTULO III

Tabela 1. Frequência de <i>E. coli</i> isoladas de fezes e rúmen de bovinos abatidos sob Inspeção Estadual em Araguaína -To no período de abril a agosto de 2016.....	78
Tabela 2. Frequência de <i>E. coli</i> EPEC e seus respectivos sorogrupos A, B e C isoladas de fezes e rúmen de bovinos abatidos sob Inspeção Estadual em Araguaína -To no período de abril a agosto de 2016.....	79
Tabela 3. Perfil de susceptibilidade de isolados de <i>E. coli</i> de fezes e conteúdo ruminal de bovinos abatidos sob Inspeção Estadual em Araguaína-To no período de abril a agosto de 2016 positivos frente ao anti-soro O157:H7.....	83
Tabela 4. Perfil de susceptibilidade de isolados de <i>E. coli</i> de fezes e conteúdo ruminal de bovinos abatidos sob Inspeção Estadual em Araguaína-To no período de abril a agosto de 2016 positivos frente ao anti-soro EPEC.....	88
Tabela 5. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de isolados de <i>E. coli</i> negativos frente aos anti-soros disponíveis para realização de prova de aglutinação direta de fezes e conteúdo ruminal de bovinos abatidos sob Inspeção Estadual em Araguaína-To no período de abril a agosto de 2016.....	90

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	13
1.1 INTRODUÇÃO .....	13
1.2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
1.2.1 <i>Escherichia coli</i> .....	15
1.2.2 Virulência/ Patogenicidade.....	15
1.2.3 <i>Escherichia coli</i> entepatogênica (EPEC).....	17
1.2.3.1 Histórico .....	17
1.2.3.2 Agente etiológico .....	18
1.2.3.3 Dados epidemiológicos .....	18
1.2.3.4 EPEC em bovinos.....	19
1.2.4 <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC).....	20
1.2.4.1 Histórico .....	20
1.2.4.2 Agente etiológico .....	21
1.2.4.3 Dados epidemiológicos .....	21
1.2.4.4 Bovinos como reservatório de O157:H7 .....	22
1.2.5 Vigilância de <i>E. coli</i> patogênica em indústria de carne bovina .....	24
1.2.6 Antibióticos.....	26
1.2.6.1 Os antibióticos que afetam a parede celular.....	27
1.2.6.2 Antibióticos que afetam a síntese proteica.....	27
1.2.6.3 Antibióticos que interferem na síntese do folato .....	29
1.2.6.4 Antibióticos que afetam a girase (topoisomerase II) e topoisomerase IV .....	29
1.2.6.5 Mecanismos de resistência aos antibióticos .....	30
1.2.6.6 Uso de antibióticos em Medicina Veterinária.....	31
1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
RESUMO.....	48
ABSTRACT.....	49
1. INTRODUÇÃO.....	50
1.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	51
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	55
1.4 CONCLUSÃO .....	65
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
RESUMO.....	71
1. INTRODUÇÃO.....	73

1.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	74
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	78
1.4 CONCLUSÃO.....	91
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	97
ANEXOS .....	97

## CAPÍTULO 1

### 1.1 INTRODUÇÃO

A *Escherichia coli* (*E. coli*) é um patógeno emergente frequentemente isolado no conteúdo intestinal de bovinos e quando há problemas durante o abate pode estar presente na carne e em seus subprodutos, representando riscos à saúde do consumidor. E nesse contexto os sorogrupos de *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e enterohemorrágica (EHEC) são os de maiores destaques devido a casuística em humanos (JURE et al., 2015)

Os bovinos são considerados os principais reservatórios de *E. coli* produtora de toxina shiga (STEC), soropatótipo enterohemorrágico (EHEC) O157:H7, em que a carne bovina tanto *in natura* quanto processada podem estar associadas frequentemente a surtos de toxinfecção alimentar (NESPOLO et al., 2014).

Devido a patogenicidade, ênfase tem sido colocadas no que concerne saúde pública e seguridade alimentar envolvendo EHEC em bovinos. No entanto, muito menos ênfase tem sido dada a prevalência da categoria de *E. coli* enteropatogênica (EPEC) nesta espécie (MOXLEY; SMITH, 2010).

Existem relatos de que bovinos, além de serem susceptíveis ao seu papel como patógeno diarreico, também são potenciais disseminadores de EPEC, sendo as fezes a principal fonte de eliminação (SOUZA et al., 2016).

Tendo em vista que as doenças transmitidas por alimentos (DTA'S) são consideradas um problema de saúde pública mundial, infecção por O157:H7 se destaca como uma responsável por complicações que vão além dos sintomas comuns de DTA'S, tais como: Síndrome Hemolítica Urêmica (HUS) que causa sequelas permanentes no sistema renal ou até a falência completa dos mesmos, e ainda complicações sistêmicas que incluem o Sistema Nervoso Central (SNC) como no caso da Púrpura Trombocitopênica Trombótica (TPP) (KIRK et al., 2015).

Já a infecção por EPEC, está clinicamente relacionada a quadros de diarreia líquida, com presença de vômitos e febre, que podem evoluir a uma síndrome de enterite crônica mais grave (NATARO; LEVINE, 1994).

Sendo assim, a STEC/EHEC e EPEC são consideradas importantes agentes desencadeadores de DTA'S. Globalmente estima-se que o sorogrupo EHEC seja responsável por 2.801.000 casos anuais, dos quais 3890 culminam em HUS (MAJOWICZ et al., 2014). A HUS é desencadeada pela O157:H7 produtora de

toxina shiga e tem sido associada com maior prevalência em crianças de até 5 anos de idade, idosos e imunossuprimidos (GOULD et al.,2009).

A EPEC por sua vez, é uma das principais causas de diarreia infantil em países em desenvolvimento. Sendo que no Brasil, tem aumentado a prevalência da mesma (HU; TORRES, 2015).

Embora as infecções causadas por EPEC no Brasil tenham sido crescentes, a baixa incidência de surtos atrelados a O157:H7 pode ser devido a falhas no sistema de notificação compulsória e/ou dificuldades na identificação do sorogrupo e espécie (DE PAULA et al., 2014). No período de 1998 a 2011 foram relatados 93 casos de HUS relacionadas ou não com O157:H7, oito casos foram confirmados pelo Instituto Adolfo Luz; e em Campinas, no ano de 2001, foram identificados dois casos de diarreia causada por essa categoria através da ingestão de carne bovina malcozida (BRASIL, 2011a).

Por outro lado, no Brasil, 45% dos casos de diarreia em crianças menores do que 5 anos de idade, tem como agente etiológico a categoria EPEC (SPANO et al., 2017).

Uma das formas de tratamento para casos de infecção por *E. coli* é com o uso prescrito de antibióticos, contudo o surgimento de bactérias resistentes tem sido um problema global (GOLKAR; BAGASRA; PACE, 2014). Refletindo significativamente nos custos e sucesso de tratamento de infecções bacterianas (OLIVEIRA; PAULA; ROCHA, 2015).

Segundo estimativas da ONU, em 2050 a resistência a antibióticos poderá ser a causa da morte de 10 milhões de pessoas em todo o mundo, ultrapassando a incidência de mortes por câncer. O Brasil atualmente é um dos dois únicos países de língua portuguesa incluídos no Sistema Global de Vigilância Antimicrobiana da Organização Mundial de Saúde (ONU, 2016a).

Frente a essa problemática de resistência bacteriana, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, juntamente com a ONU, tornou público no ano de 2016 o programa AGROPREVINE e em 2017 instituiu a Instrução Normativa nº41 de outubro de 2017, na qual um dos objetivos é a vigilância e monitoramento da resistência aos antimicrobianos na agropecuária (BRASIL, 2017c).

Além disso, recentemente foi lançado o Programa de Recomendação para Implementação de Programas de Manejo de Antimicrobianos lançado pela ONU

juntamente com a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) lançado em 2018 (OPAS, 2018).

Atualmente não existem dados publicados sobre a frequência de *E. coli* O157:H7 e EPEC na microrregião de Araguaína-TO. Portanto, o principal objetivo do presente estudo foi obter informações científicas sobre a frequência das categorias de *E. coli* supracitadas, assim como determinar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados de fezes e conteúdo ruminal de bovinos abatidos sob inspeção Estadual em Araguaína-TO.

## 1.2 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.2.1 *Escherichia coli*

*E. coli* é uma bactéria Gram-negativa, oxidase negativa pertencente a família Enterobacteriaceae, com capacidade de crescimento tanto aeróbica quanto anaeróbica (CROXEN et al., 2013).

Essa espécie compõe a flora natural do intestino de humanos (ECKBURG et al., 2005). Em ruminantes, essa espécie também está presente no trato entérico e presente nas fezes, o que o torna um disseminador constante dessa bactéria (MAKI e PICARD, 1965).

Tal espécie possui 173 antígenos somáticos (O), 80 capsulares (K) e 56 antígenos flagelares (H) que compõem sua morfologia (ORSKOV e ORSKOV, 1992).

Os antígenos O presentes na superfície da *E. coli* são responsáveis pela especificidade antigênica, e são os principais componentes para a designação de cada sorogrupo. A sorotipagem é realizada por meio do uso de anti-soros específicos para cada grupo (DEBROY; FROTAMICO; ROBERTS, 2018), pela técnica da reação de aglutinação direta (DEBROY et al., 2016).

Estes antígenos são também importantes fatores de virulência, desempenhando um papel crucial nas interações patógeno-hospedeiro. São considerados altamente imunogênicos e apresentam especificidade antigênica única para cada sorogrupo.

### 1.2.2 Virulência/ Patogenicidade

Virulência é definida como a capacidade relativa de um microrganismo causar danos com efeitos graves ou fatais ao hospedeiro. Já a patogenicidade é definida

como a capacidade do agente invasor em causar a doença com sintomas clínicos (ARIZA et al., 2016).

Embora grande maioria das estirpes de *E. coli* seja comensal, algumas delas adquiriram a capacidade de desencadear problemas intestinais (diarreogênicas) e/ou extra intestinais através da transferência de genes e combinações dos mesmos de forma a induzirem a patogenia no hospedeiro (GOMES et al., 2016).

A classificação da *E. coli* é feita com base nos patótipos e seus mecanismos de patogenicidade. As seis principais categorias diarreogênicas são: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), e uma nova categoria foi identificada, a *E. coli* aderente invasiva (AIEC). Todas com genes específicos que são responsáveis pelas alterações em níveis celulares no hospedeiro, sendo a EPEC considerada a mais comum e a EHEC a mais patogênica (CROXEN et al., 2013).

Uma das formas do sucesso na colonização do hospedeiro é o reconhecimento do meio externo em que essa espécie bacteriana se encontra. Um mecanismo que exemplifica tal fato é a detecção de substâncias produzidas pelo metabolismo celular do hospedeiro, que não são metabolizadas pelas bactérias, de forma que, quando há a detecção através de sinalização bacteriana há uma redução da multiplicação bacteriana como resultado da percepção do ambiente não favorável (CONNOLLY; ROE, 2016).

A virulência dessa espécie também está atrelada a vários fatores, dentre eles destacam-se: invasão (sistema de secreção tipo III), resistência sérica (capacidade de resistência ao sistema imune do hospedeiro), produção de sideróforo, assim como a expressão de genes específicos para cada estirpe (TOMAZETTO; SILVA; VIDOTTO, 2004).

Quanto ao fator de adesão, um dos mecanismos pelo qual essa espécie faz uso para efetuar modificações em nível celular no hospedeiro são denominados como sistema de secreção tipo III (T3SS), onde há uma inserção dos fatores de virulência no citoplasma da célula hospedeira que induz todas as alterações na fisiologia celular (TEJEDA-DOMINGUEZ et al., 2017). Esse sistema é composto por três tipos de proteínas, duas hidrofóbicas e uma hidrofílica que juntas formam uma espécie de injeção na célula hospedeira (MUELLER; BROZ; CORNELIS, 2008).



A resistência sérica é conferida pela produção proteica do gene *iss*, considerada uma lipoproteína presente na membrana externa bacteriana que oferece resistência ao sistema imune do hospedeiro. Tal gene é codificado por um plasmídeo denominado ColV (ou colicina V) (JOHNSON et al., 2006; LYNNE et al., 2007).

O resultado da presença desse plasmídeo é o aumento na multiplicação de bactérias de forma que o sistema complemento (modulado via macrófagos) não seja capaz de realizar o processo de fagocitose comumente realizado quando há presença de bactérias em quantidades menores. Porém, há indícios que esse plasmídeo não seja responsável em sua totalidade por tal mecanismo, a exemplo disso é a proteína TraT que por sua vez reduz a sensibilidade bacteriana a processos de opsonização (AGUERO; CABELLO, 1983; AGUERO et al., 1984).

Outro fator de virulência é conhecido como sideróforo responsável pela aquisição de ferro que é importante para o funcionamento do metabolismo bacteriano. Em estirpes de *E. coli* existe um específico: a enterobactina, sintetizada pelas enzimas EntA-F e EntH no citoplasma bacteriano (PAKARIAN; PAWELEK, 2016).

### 1.2.3 *Escherichia coli* entepatogênica (EPEC)

#### 1.2.3.1 Histórico

Bray (1945) descreveu pela primeira vez a categoria EPEC em meados da década de 40 quando constataram a presença de uma bactéria fermentadora de lactose isolada em crianças que apresentavam quadro de diarreia persistente.

Foi o primeiro patógeno a ser associado com doença em humanos. Sendo um dos mais prevalentes em crianças com quadros de diarreia em todo o mundo (XU et al., 2017).

Os principais sorotipos de tEPEC são respectivamente: O55:[H6], O86:H34, O111:[H2], a O114:H2, O119:[H6], O127:H6, O142:H6, O142:H34 e para aEPEC : O26:H[11], O55:[H7], O55:H34, O86:H8, O111ac:[H8], O111:[H9], O111:[H25], O119:H2, O125ac:H6, O128:H2. Tal afirmação foi realizada com base nas frequências observadas e associadas com cada categoria em casos notificados (TRABULSI; KELLER; TARDELLI, 2002).

### 1.2.3.2 Agente etiológico

A diferenciação entre tEPEC e aEPEC só pode ser definida através da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), com base nos fatores de virulência (SOUZA et al., 2016) (Quadro 1). Sendo que a sorotipagem nessa categoria é realizada para identificação dos antígenos somáticos, flagelares e capsulares. A técnica *Fluorescent Actin Staining* (FAZ) por sua vez, é utilizada para detectar o condensamento de actina comum em lesão causada por EPEC e a aderência em culturas de células pode ser feita para observar e classificar o tipo de aderência (LLUQUE et al., 2010).

Quadro 1. Importantes características de virulência de tEPEC e aEPEC.

<b>Característica</b>	<b>tEPEC</b>	<b>aEPEC</b>
Gene <i>eae</i>	+	+
EPEC adherence fator ( <i>EAF</i> )	+	-
Gene <i>bfpA</i>	+	+/-
Lesão A/E	+	+
Expressão fímbria BFP	+	-
Tipo de aderência	AL*	AL/AD/AA/LAL/NA*

Fonte: HERNANDES et al., 2009

\*AL: aderência localizada; LAL: LA *like*; AD: aderente difusa; AA: aderência agregativa; NA: não aderente;

### 1.2.3.3 Dados epidemiológicos

A EPEC é um dos patógenos que mais infectam crianças de até 5 anos de idade, desencadeando quadros de diarreia persistente, principalmente em países em desenvolvimento (OCHOA et al., 2008). A diarreia desencadeada por EPEC é responsável por 58% da mortalidade infantil em todo o mundo (UNICEF, 2018).

No Brasil, um estudo epidemiológico feito entre os anos de 2011 a 2016 mostrou que a EPEC foi responsável por 359 casos de diarreia, representando 52,6% dos casos diagnosticados (ORI et al., 2019). Vale salientar que essa alta morbidade e mortalidade em países em desenvolvimento tem sido associada a baixos níveis de higiene alimentar e sanitária (SPANO et al., 2017).

No Tocantins, ainda são escassos os dados relativos a infecções por EPEC. A diarreia e gastroenterite de forma geral, foi responsável por 66 internações no período de 2015-2016. Porém a falta de identificação do agente etiológico é observada (DATASUS, 2018).

Embora essa categoria esteja fortemente associada a países em desenvolvimento, nos EUA no período de 2009 a 2015, ocorreu um surto que resultou em 30 doentes e nenhuma hospitalização (CDC, 2018).

#### 1.2.3.4 EPEC em bovinos

A *E. coli* é responsável por quadros de diarreia em bezerros, comumente conhecida como colibacilose entérica (GAY, 1965).

Em pequenos ruminantes a EPEC tem sido comumente associada a quadros de diarreia. No entanto, para bovinos, ainda são escassos os dados acerca da real prevalência e impacto dessa categoria (HEDERGAAD e HEDERGAAD, 2016).

Sendo que a fonte de infecção pode se estabelecer por diversas maneiras, através dos alimentos; ambientes naturais como água, solo; fezes e solo dos abatedouros assim como o ambiente da fazenda como um todo (SOUZA et al., 2016).

E embora ainda na década de 80 tenha sido relatado os primeiros casos associando a síndrome da disenteria em bezerros com a presença da EPEC (CHANTER et al., 1986). Somente no ano de 1997, foi iniciada a detecção do gene *eae* em cepas de EPEC para confirmação da mesma em bezerros com diarreia (SARIDAKIS et al., 1997).

Além disso, embora EPEC possa ser isolada em bezerros com diarreia, existe relatos de que a mesma também possa ser isolada em bovinos adultos sadios (ORDEN et al., 2002). No Brasil um único estudo foi realizado para detecção do gene *eae* em EPEC isoladas de bovinos adultos sadios (AIDAR-UGRINOVICH, et al., 2007).

Em bovinos que desenvolvem quadros de diarreia em decorrência de infecção por tal categoria, especialmente bezerros, há presença de fezes líquidas num período de até 15 dias, com sinais de desidratação, anorexia, distensão abdominal com dor à palpação, perda de peso podendo evoluir a óbito (MOXELEY; SMITH, 2010).

Na necropsia dos animais acometidos por tal categoria, pode-se observar paredes do cólon e reto espessos, com presença de manchas avermelhadas nas dobras longitudinais da mucosa do ceco, cólon e reto. Observa-se hemorragias petequiais e hemorragias maiores com sangue coagulado aderido à superfície da mucosa (HALL et al., 1985).

Em bezerros, observa-se uma íntima ligação às superfícies dos enterócitos. A perda das vilosidades da superfície dos enterócitos resulta em atrofia do íleo. No ceco, cólon e reto é comum ocorrer descamação dos enterócitos (pode desencadear uma atrofia e hemorragia na mucosa entérica), com presença de reação inflamatória multifocal, caracterizada por edema e infiltração neutrofílica (STORDEUR et al., 2000).

#### 1.2.4 *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)

##### 1.2.4.1 Histórico

O primeiro surto de infecção por EHEC foi descrito na década de 80 em meados de 1982, onde 47 pessoas foram infectadas após consumirem carne bovina em hambúrgueres contaminados por cepas de O157:H7. Anteriormente apenas um caso havia sido relatado em 1975 (RILEY et al., 1983).

Acredita-se que a cepa mais comumente associada a essa categoria EHEC seja a O157:H7, que surgiu a partir de um processo de recombinação da cepa O55:H7, que por sua vez, por possuir adesão intestinal, adquiriu toxina shiga que caracteriza o quadro hemorrágico por transferência horizontal de genes virulentos (WHITTAN et al., 1993).

Desde então a infecção por O157:H7 tem sido associada ao consumo de alimentos de origem animal em especial de carne bovina contaminada. Sendo responsável por desencadear um quadro de diarreia com presença de sangue, colite hemorrágica que pode evoluir para HUS e morte (LEVINE, 1987).

Até meados da década de 90 o tratamento para casos de infecção por O157:H7 permanecia controverso, onde alguns médicos acreditavam que o tratamento feito com o uso de antibióticos poderia antecipar o quadro de HUS, enquanto outros afirmavam que o tratamento deveria ser realizado com o uso destas drogas. Contudo a mesma ideia era defendida: a que o consumo de carne bovina mau cozida deveria ser evitado para reduzir os riscos de infecção (MEAD; GRIFFIN, 1998).

Já no ano de 1996 estudos começaram a ser desenvolvidos com a finalidade de pesquisar epidemiologicamente a presença de O157:H7 nas populações de bovinos destinados ao abate (HEUVELINK et al., 1996).

No ano de 2000 a notificação de casos envolvendo a presença de O157:H7 em humanos, tornou-se de notificação obrigatória nos EUA, onde foram detectados os maiores números de casos (CDC, 2005).

#### 1.2.4.2 Agente etiológico

Um método bastante difundido para determinar as categorias de STEC (*Escherichia coli* produtora de toxina da família *Shiga-like*) é sorologia realizada através da determinação do antígeno da parede celular, lipossacarídeo “O” que define o sorogrupo com 174 variações, e o antígeno “H” com 53 variações que determina o sorotipo (ORSKOV et al., 1977).

As *E. coli* produtoras de toxina shiga (STEC) compreendem o grupo heterogêneo, e dentro desse grupo, encontra-se incluído a categoria EHEC, que tem por diferencial além das toxinas shiga, a presença de uma ilha de patogenicidade denominada LEE assim como na categoria EPEC anteriormente descrita (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Os soropatótipos são divididos com base na ocorrência em casos de doenças em humanos em 5 grupos de A a E. O soropatótipo A é composto por 10 sorotipos de O157:H7 e 3 O157: NM (Não Móvel). Soropatótipo B compostos por 3 cepas cada um dos sorotipos O26:H11, O103:H2, O111: NM, O121:H19 e O145: NM. Soropatótipo C com 4 cepas de sorotipos O91:H21 e O113:H21 e oito cepas de outros sorotipos. Soropatótipo D com 14 cepas associadas somente a presença de diarreia sem evolução para HUS, e o soropatótipo E que é composto por cepas de STEC em animais e não relacionadas a doenças em humanos (KARMALI et al., 2003).

#### 1.2.4.3 Dados epidemiológicos

Estudos comprovam que a principal via de transmissão de O157:H7 é via alimentar, e que a carne bovina processada é responsável pela grande parte dos surtos alimentares envolvendo este agente (VIDOVIC; KORBER, 2016).

No Brasil surtos envolvendo alimentos constituem um evento de saúde pública com notificação compulsória de acordo com a Portaria nº 204 de 17 de fevereiro de 2016 (BRASIL, 2016a).

No período de 2007-2016, as DTA'S foram responsáveis por 6.632 surtos, 118.104 doentes, 17.186 hospitalizações e 109 óbitos. Sendo que a região Norte obteve uma taxa de 6,9% de surtos. A carne bovina *in natura*, processada e miúdos esteve associada a 2,1% do total de DTA'S, e a *E. coli* foi o segundo microrganismo mais envolvido, com uma taxa de 7,2% (BRASIL, 2016 b).

No Tocantins nos anos de 2007-2017, foram notificados dois surtos envolvendo *E. coli* com a carne bovina *in natura*, processada e miúdos como veículo de transmissão, o que gerou 1080 pessoas expostas e 142 doentes (BRASIL, 2017 b).

Nos EUA, um levantamento feito no período de 1982-2002 levou a conclusão de que a O157:H7 foi responsável por 73.000 casos anuais, onde quarenta e nove Estados foram afetados, totalizando 350 surtos com 8.598 pessoas acometidas, 1493 internações, 354 casos de HUS e 40 óbitos (RANGEL; SPARLING; CROWE, 2005).

Já no período de 2005-2014 a mesma foi responsável por 16,5% das infecções em humanos, com a maior taxa de incidência a cada 100.000 habitantes entre os anos de 1996-2015 (CDC, 2017).

Ainda de acordo com o *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) no ano de 2015 a O157:H7 esteve no topo do *ranking* da causa de infecções em humanos, com uma taxa de 44% (CDC, 2015).

Estima-se que cerca de 5-10% das pessoas infectadas com O157:H7 possam desenvolver a HUS, sendo que crianças de até 5 anos de idade, idosos e imunossuprimidos são os mais vulneráveis (CDC, 2018). A HUS tem alta prevalência em países desenvolvidos. Porém no Brasil não existem dados consolidados acerca da ocorrência da HUS em decorrência da falta de notificação e de um sistema de vigilância adequado (EDUARDO et al., 2002).

#### 1.2.4.4 Bovinos como reservatório de O157:H7

Bovinos sabidamente são considerados como reservatórios naturais de EHEC/O157:H7. Sendo desta forma, os principais disseminadores desse sorotipo

em humanos através do consumo de produtos cárneos contaminados dessa espécie (KOLENDA; BURDUKIEWICZ; SCHIERACK, 2015; BARTH et al., 2016). São considerados reservatórios assintomáticos (SODERLUND et al., 2016).

Alguns genótipos de O157:H7 são exclusivamente encontrados em bovinos, tais genes são essenciais para a sobrevivência no TGI de bovinos, como por exemplo o *gadA*, *gadB* e *gadC* genes responsáveis pela descarboxilação do glutamato essencial para o metabolismo bacteriano em situação de estresse ambiental (VANAJA et al., 2010).

A expressão de *dps* também é comum em O157:H7 de bovinos, esse gene está envolvido na proteção do DNA bacteriano durante períodos de privação e estresse pela presença de ácido clorídrico do TGI (CHOI; BAUMLER; KARPAN, 2000).

Durante a fase estacionária da O157:H7 em bovinos, há a necessidade de três sistemas para sobrevivência da mesma: S1 que requer a expressão de *Rpos*, S2 que é dependente de glutamato e S3 que requer uma enzima arginina descarboxilase (*AbiA*) (RICHARD; FOSTER, 2003).

Há relatos de que o aspartato presente no intestino delgado de bovinos também é crucial para a sobrevivência de O157:H7, além de ser uma vantagem competitiva frente a outros microrganismos que não utilizam esse aminoácido (BERTIN et al., 2018).

As toxinas shiga parecem suprimir a resposta imune em bovinos adultos e desta forma induzem ou atrasam a resposta imune para conseguir efetivar a colonização no hospedeiro bovino (HOFFMAN et al., 2006). Afetam as principais subpopulações de linfócitos (MENGE et al., 2003).

Isto por que os linfócitos B e T de bovinos expressam Gb3, sendo esse o principal diferencial da infecção em humanos e a forma assintomática em bovinos, essa quantidade de receptor nos linfócitos faz com que a inflamação da mucosa seja limitada e que a homeostase intestinal seja mantida (STAMM et al., 2008).

Os granulócitos do sangue e do leite em bovinos adultos não expressam os sítios de ligação da toxina (MENGE et al., 2006). Além disso, as células epiteliais do cólon também não expressam os sítios de ligação em sua superfície celular, e, portanto, não respondem as toxinas (MENGE et al., 2015).

Anticorpos contra o lipossacarídeo da O157:H7 e suas toxinas são comumente detectados em soro bovino, em secreções mucosas e no colostro (PIRRO et al., 1995).

Entretanto, em bezerros essas toxinas induzem apoptose e necrose nas células mononucleares do sangue periférico intestinal, e em poucos casos, há a manifestação de diarreia nessa fase da vida do bovino em decorrência da O157:H7, sem progressão para manifestações clínicas mais severas (HOFFMAN et al., 2006).

#### 1.2.5 Vigilância de *E. coli* patogênica em indústria de carne bovina

A indústria de carne em todo o mundo tem cada vez mais feito esforços para garantir a oferta de um produto seguro para seus consumidores. Porém, ainda é muito complexo determinar qual o trajeto da *E. coli* na contaminação da carne. Há uma grande ênfase nas BPF para evitar a contaminação da carcaça bovina com intervenções que visam eliminar tal bactéria a nível de pele e/ou contaminação oriunda do trato gastrointestinal (BRASHEARS; CHAVES 2017).

No Brasil, o decreto de nº 9.013/2017 regulamenta a Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (BRASIL, 2017c). E em 2015, a norma interna DIPOA/SDA de nº 1 de 17 de junho, instituiu o Programa de pesquisa de *E. coli* verotoxigênica em carne bovina *in natura* em aparas, carne de cabeça, esôfago ou diafragma (BRASIL, 2015).

Sendo estabelecido a pesquisa dos sorogrupos O157:H7, O26, O45, O111, O121 e O145. O protocolo é dividido em três etapas: 1º com a técnica da PCR determinante na detecção do gene *stx* e *eae*, a 2º etapa consiste no isolamento em ágar e reações com antissoro O157:H7, e a 3º etapa consiste na reunião dos seguintes critérios para confirmação: produção de toxina shiga (*st*), confirmação do *stx*, ou determinação genética do sorotipo H7 (BRASIL, 2015).

Para o isolado não caracterizado como O157, o isolado bioquimicamente identificado como *E. coli* deve possuir o gene *stx*, *eae* e ser positivo para um dos sorogrupos alvo: O26, O45, O103, O111, O121 e O145 (BRASIL, 2015).

A RDC de nº 275/2002 da ANVISA, instituiu o Regulamento Técnico de Procedimentos Padronizados Aplicados aos Estabelecimentos Produtores e Industrializadores de Alimentos e Lista de Verificação de BPF, com a finalidade de garantir o aperfeiçoamento das ações de controle sanitário, na inspeção sanitária em estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos em todo o Brasil



(ANVISA, 2002). Juntamente com a portaria do Ministério da Agricultura de nº 368 de setembro de 1997 (BRASIL, 1997).

Existem também a circular de nº 175/2005- DIPOA, que regulamenta os Procedimentos de Verificação dos Programas de Autocontrole, afim de identificar e eliminar fatores que possam interferir na qualidade higiênico-sanitária dos produtos cárneos (BRASIL, 2005).

Como não há presença de bactérias patogênicas nos músculos de bovinos saudáveis. As principais operações de abate que representam risco de exposição para a carcaça bovina são: esfola do couro e retirada do trato gastrointestinal (BARKOCY-GALLAGHER et al., 2003).

Em países desenvolvidos, algumas medidas de intervenção pré-abate têm sido estudadas com a finalidade melhorar a segurança do produto final, tais quais: vacinação, exclusão competitiva com uso direto de microrganismos na alimentação de bovinos, e uso de bacteriófagos (CALLAWAY et al., 2003). Outras medidas avaliadas podem reduzir a liberação fecal de *E. coli*, sendo elas: fontes controladas de aquisição de novos animais, bem-estar animal, sanidade animal, e uso de pré e probióticos (BUNCIC et al., 2014).

Nas fazendas, o uso dos princípios da Análise dos Pontos Críticos de Controle (HACCP) não é obrigatório na produção primária da matéria prima. Porém, estudos têm demonstrado que o controle de disseminação de *E. coli* em fazendas dependem do desenvolvimento e implementação de um sistema eficaz de gerenciamento de segurança alimentar: 1) rastreabilidade total dos animais; 2) provisão de alimentos/forragens não contaminados; 3) fornecimento de água limpa; 4) condições higiênicas de alojamento; 5) bovinos limpos; 6) saúde animal, bem-estar e prevenção de doenças; 7) gestão de resíduos dos animais; 8) transporte e manuseio higiênico e 9) biossegurança (MAUNSELL; BOLTON 2004).

Em nível de abatedouros, o que se tem discutido para que haja melhorias na segurança da carne comercializada, é uma abordagem moderna no sistema de inspeção, ou seja, baseado em riscos. A exemplo disso, temos a categorização do risco do bovino entrante. A ProSafeBeef tem fomentado projetos para determinar a aplicabilidade de testes de níveis de proteínas em bovinos, para separar lotes de animais que possivelmente oferecem riscos (BLAGOJEVIC et al., 2011).

Outra medida tida como eficaz, consiste em classificar visualmente a limpeza da pele dos bovinos. O escore de limpeza de pele já é praticado em muitos países,

onde se realiza o chamado abate logístico: animais mais sujos são abatidos após animais mais limpos com remuneração aos produtores (BLAGOJEVIC et al., 2012).

A redução da contaminação oriunda do couro pode ser também através de tratamentos alternativos. O uso de ácido acético e ácido lático, ou remoção física com uso do calor até 80° C tem sido realizado em países desenvolvidos (LORETZ; STEPHAN; ZWEIFEL, 2011).

No que diz respeito das técnicas com a finalidade de reduzir a contaminação fecal da carcaça, sistemas online têm sido avaliados para substituir a atual técnica do *swab* com a finalidade de se gerar um resultado imediato, ao invés da atual liberação após a carcaça ter deixado a planta frigorífica (BURFOOT et al., 2011).

Tal técnica baseia-se nas propriedades fluorescentes das fezes associadas à clorofila da dieta (KIM et al., 2005). Em bovinos alimentados com dieta rica ou exclusiva de concentrado, tem-se avaliado o uso do marcador Mg-clorofilina para eliminar falsos negativos e falsos positivos no caso de emissão de fluorescência de tecidos com a mesma faixa de absorvância das fezes (620-750 nm) (SAGATARAME et al., 2012).

#### 1.2.6 Antibióticos

Desde a descoberta e introdução da penicilina, os antibióticos tem sido fármacos de fundamental importância clínica para o tratamento de infecções em todo mundo (MARSHALL; OCHIENG; LEVY, 2009).

Foi na década de 30, mais precisamente no ano de 1937, devido ao grande número de feridos e o surgimento de novas doenças infecciosas oriundas do caos da segunda guerra mundial, que a produção de antibióticos começou a ser em larga escala (ZAMAN et al., 2017).

A década de 50 foi considerada a era de “ouro” dos antibióticos, onde houveram a descoberta de novas drogas. Todavia, na década de 70 houve um declínio repentino na produção de novas classes de antibióticos, declínio esse que não acompanhou o ritmo crescente da resistência bacteriana (AMINOV, 2010).

No Brasil existem 93 antibióticos para comercialização registrados junto a Anvisa, sendo ressaltados dessa lista aqueles de uso exclusivo em hospitais. A RDC de nº 44 de 26 de outubro de 2010 é a legislação que estabelece critérios para comercialização dos mesmos (BRASIL, 2010).

Embora essa RDC tenha o intuito de reduzir o uso indiscriminado desses fármacos, as taxas de consumo tiveram diferenças sutis na maior cidade do País, São Paulo-SP. No período de 2008-2011, as vendas de cefalosporinas aumentaram 216,8%, quinolonas 170,9% e aminopenicilinas 140,9%. Após o início da restrição nas vendas, em 2012 houve um decréscimo de apenas 19,4% para cefalosporinas, 12,75% para quinolonas e 11,1% para aminopenicilinas (MATTOS et al., 2017).

Os antibióticos podem ser divididos conforme mecanismo de ação que serão descritos a seguir.

#### 1.2.6.1. Os antibióticos que afetam a parede celular

Representados pelos glicopeptídeos,  $\beta$ -Lactâmicos, cefalosporinas, carbapenens e monobactams. Os glicopeptídeos são usados em tratamento de infecções graves por bactérias Gram positivas. Existem duas gerações: a 1<sup>o</sup> (vancomicina e teicoplanina) e a 2<sup>o</sup> (dalbavancina, oritavancina e telavancina) (MARCONE et al., 2018).

Sua ação consiste em bloquear a síntese da parede celular através da interação com o resíduo de Acil-D-Ala (precursor do peptideoglicano). Assim, há um bloqueio na utilização de um precursor imprescindível para formação dessa estrutura, não havendo ação direta sobre alguma enzima (ALLEN; NICAS, 2003).

As outras classes de antibióticos ( $\beta$ -Lactâmicos, cefalosporinas, carbapenens e monobactams), interferem em enzimas necessárias para a síntese de peptideoglicano (DZIDIC; SUSKOVIC; KOS, 2008), mais especificamente nas transpeptidases da família das PBPs (Proteínas de Ligação das Penicilinas) (GOFFIN; GLUYSEN, 1998), que realizam todos processos relacionados a estrutura da parede celular (MASSOVA; MOBASHERY, 1998).

Nas bactérias Gram negativas existem mais grupos de PBPs, que quando interrompidas pode ocasionar lise celular, impedir divisão e morte celular (SPRATT, 1983).

Os  $\beta$ -Lactâmicos são os mais utilizados desde a descoberta da penicilina. Só nos EUA no período de 2004 a 2014, 65% dos antibióticos prescritos eram pertencentes a essa classe (BUSH; BRADFORD, 2016).

#### 1.2.6.2 Antibióticos que afetam a síntese proteica

Composto pelas classes das tetraciclinas, aminoglicosídeos e anfenicóis. Para conseguir entrar na célula do hospedeiro, essas classes de antibióticos atravessam a membrana através das porinas *OmpC* e *OmpF* (MORTÍMER; PIDDOCK, 1993).

As tetraciclinas foram descobertas na década de 40, tendo como forma de ação a inibição de síntese proteica bacteriana (CHOPRA; ROBERTS, 2001). A minociclina, doxiciclina, tigeciclina e omadaciclina, são os antibióticos mais eficazes da classe das tetraciclinas (GROSSMAN, 2016).

Essa classe de antibióticos consegue inibir a síntese proteica através de sua ligação na porção 16S do RNA<sub>R</sub>, porção 30S do ribossomo que é responsável pela decodificação da informação genética bacteriana, interrompendo dessa forma o processo de tradução (PIOLETTI et al., 2001).

Os aminoglicosídeos por sua vez foram descobertos no ano de 1944, sendo a estreptomicina a primeira droga da classe (DAVIS, 1987). Apesar de 73 anos passados após a descoberta, ainda continuam sendo prescritos para tratamentos de infecções por bactérias Gram negativos (BEGG; BAICLAY; DUFFULL, 1995).

A gentamicina, trombamicina e amicacina são os 3 antibióticos mais prescritos (AVENT et al., 2011). Embora sejam considerados antibióticos eficazes, a toxicidade desses fármacos pode causar quadros de insuficiência renal, perda auditiva permanente e/ou distúrbios do equilíbrio. Isto se deve aos picos de concentrações da droga no sangue, portanto, os aminoglicosídeos possuem um índice terapêutico estreito que deve ser seguido de forma adequada para evitar os efeitos tóxicos nas células dos mamíferos (JIANG; KARASAWA; STEYGER, 2017).

Os anfenicóis representados pelo cloranfenicol e florfenicol, este último de uso exclusivo veterinário, são utilizados desde a década de 50 especialmente em animais de produção. A toxicidade dos resíduos de cloranfenicol em animais destinados ao consumo humano, fez com que o uso do mesmo em animais fosse proibido desde 27 de junho de 2003 no Brasil (PENSABENE; FUDDLER; DONOGHUE, 1999; BRASIL, 2003).

Os anfenicóis inibem a síntese proteica ao se ligarem a subunidade 50S do ribossomo e bloquear a enzima peptidiltransferase (SCHWARZ et al., 2004).

O efeito tóxico aos humanos é devido a presença do carbono dicloreto alfa, esse carbono sofre uma substituição por nucleófilos encontrados na proteína mitocondrial das células sanguíneas. O resultado é a redução da produção de

glóbulos vermelhos na medula óssea, e conseqüente quadro de anemia aplástica. Em doses terapêuticas em humanos o uso do mesmo é seguro, porém, não se sabe ao certo o nível seguro de exposição a resíduos de cloranfenicol em alimentos, por isso houve a proibição do uso do mesmo em animais destinados ao consumo humano (CLARK et al., 1991).

#### 1.2.6.3 Antibióticos que interferem na síntese do folato

Formado pelo grupo das sulfonamidas. Possui esse nome genérico pois são derivados de amina de benzeno. A atividade antimicrobiana depende então de qual substituinte e sua posição no anel de benzeno. A ação consiste na semelhança com o PABA (ácido amino benzóico) precursor inicial da síntese do ácido fólico em bactérias que utilizam esse ácido em seu metabolismo, desta forma há uma competição da sulfonamida com o PABA (LAVANYA, 2017).

As sulfonamidas foram descobertas e produzidas em larga escala desde a década de 30, além do uso em antimicrobianos, a sua porção primária está presente em diversos tipos de drogas, tais como: diuréticos, inibidores da anidrase carbônica, antiepiléticos e alguns antipsicóticos (CARTA; SCOZZAFAVA; SUPURAN, 2012).

Em decorrência do uso em larga escala ao longo dos anos, seu baixo custo e amplo espectro de ação, as sulfonamidas estão associadas a disseminação de resistência bacteriana. Pensando nisto, a indústria farmacêutica buscou como forma de melhorar a ação do mesmo através do sinergismo com o trimetropim (CHEN; XIE, 2018).

No entanto, ainda na década de 80 já haviam relatos de resistência ao sulfametoxazol e cotrimaxazol (nomes comerciais da associação da sulfonamida com trimetropim) (BROGDEN et al., 1982).

A potencialização se baseia no fato de que o trimetropim atua na mesma via de síntese do ácido fólico, especificamente na enzima diidrofolato redutase que é responsável pela conversão do ácido dihidrofólico em ácido tetrahidrofolato (forma ativa do ácido fólico), o trimetropim inibe a ação dessa enzima (HONG et al., 1995).

#### 1.2.6.4 Antibióticos que afetam a girase (topoisomerase II) e topoisomerase IV

Representados pelas quinolonas e flúorquinolonas (quando há o acréscimo de um átomo de flúor em seu anel principal). São comumente prescritos em todo o

mundo para tratar vários tipos de infecções, principalmente as do trato urinário. Desde a década de 90 há relatos de resistência bacteriana.

O mecanismo de ação consiste em converter as enzimas bacterianas girase e topoisomerase IV em enzimas tóxicas que fragmentam o cromossomo bacteriano (ALDRED; KERNS; OSHEROFF, 2014).

As enzimas bacterianas que essa classe afeta, são essenciais para modulação cromossômica, síntese de DNA, transcrição e divisão celular (CORREIA et al., 2017).

A girase participa dos processos que envolvem o movimento do DNA dentro do núcleo e abertura da dupla hélice (DEWEESE; OSHEROFF, 2008). A topoisomerase IV por sua vez, separa os cromossomos ligados durante o estágio terminal da replicação do DNA (LEVINE; HIASA; MARIANS, 1998).

#### 1.2.6.5 Mecanismos de resistência aos antibióticos

A importância clínica dos antibióticos na história da humanidade é indiscutível. No entanto, o surgimento e rápida disseminação da resistência aos antibióticos, é alvo de preocupação em todo o mundo. Para se ter uma melhor dimensão do problema, nos EUA no ano de 2014, o custo com a resistência bacteriana foi estimado entre 21 a 34 bilhões de dólares (ONU, 2014).

Em fevereiro de 2017 a OMS publicou uma lista prioritária de patógenos resistentes (PPL/Lista de Patógenos Prioritário global), com a finalidade de direcionar a pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos. A família *Enterobacteriaceae* ficou classificada no grupo de patógenos críticos (ONU, 2017a).

Os antibióticos podem ser transferidos para as células bacterianas por difusão (necessita de porinas), difusão pela bicamada lipídica, ou por auto absorção (KAPOOR; SAIGAL; ELONGAVAN, 2017).

Para evitar que esses fármacos cheguem até seu alvo, as bactérias fazem uso do sistema de bomba de efluxo, no qual a mesma velocidade em que a droga entra na célula, é a mesma velocidade de bombeamento para fora da mesma. Para que esse sistema de efluxo ocorra, certas proteínas bacterianas de transporte são necessárias nesse processo. No total são 5 famílias de proteínas sendo elas: família de ligação ao ATP (ABC), família facilitadora principal (MFS), família de resistência a fármacos (SMR), família de extrusão de multidroga e compostos tóxicos (MATE),

família de resistência-modulação-divisão celular (RND), todas codificadas por cromossomos (HASDEMIR, 2007).

As bactérias também necessitam de proteínas do canal de membrana externa (OMP) e uma proteína de fusão de membrana (MFP) (CATTOIR, 2004). Esse sistema é comum para resistência a  $\beta$ -Lactâmicos (LAMBERT, 2002).

Outro mecanismo de resistência é a modificação das subunidades 30S ou 50S do ribossomo para evitar a ligação das tetraciclinas, macrolídeos, anfenicóis e glicopeptídeos, assim a inibição de síntese proteica é interrompida (TENOVER, 2006).

Há ainda alterações enzimáticas, por exemplo, nas PBPs (Proteína de Ligação da Penicilina) em bactérias Gram positivas, e a produção de  $\beta$ -Lactamases (enzimas que degradam antibióticos  $\beta$ -Lactâmicos) em Gram negativas. A produção de enzimas é codificada por genes localizados em plasmídeos e transposons (estruturas de transferência horizontal de genes de resistência) (ALEKSHUN; LEVY, 2007).

As  $\beta$ -Lactamases são divididas em: grupo 1 (cefalosporinases), grupo 2 (penicilinas), grupo 3 (metalo-  $\beta$ -Lactamases). Há ainda o grupo D, que hidrolisam oxacilina e são fracamente inibidas por ácido clavulânico, mas altamente inibidas por cloreto de sódio (NAAS; NORDMANN, 1999).

Alterações nas enzimas girase e topoisomerase IV, ocorre em decorrência de mutações nos genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE* na enzima girase, e a codificação do gene *qnr* que bloqueia a ação das quinolonas na topoisomerase IV (FÁBREGA et al., 2009).

#### 1.2.6.6 Uso de antibióticos em Medicina Veterinária

Os antibióticos em Medicina Veterinária em todo o mundo com a finalidade terapêutica e profilática, e alguns são adicionados aos alimentos destinados aos bovinos em níveis sub terapêuticos para promoção do crescimento. Todavia, a taxa de eliminação de fármacos via fezes, urina e até mesmo na carne, torna preocupante o potencial impacto na disseminação de resistência bacteriana (SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006). Isto por que resíduos de antibióticos em carne bovina têm sido considerada um sério problema de saúde pública em todo o mundo (RAMATLA et al., 2017).

Em bovinos, o uso prolongado, o grande número de animais e a subdosagem pode favorecer a seleção de bactérias resistentes. Na Alemanha, ainda no ano 2000, foram sancionadas diretrizes obrigatórias para o uso racional de antibióticos em animais (UNGEMACH; MÜLLER-BAHRDT; ABRAHAM, 2006).

A administração de antibióticos ocasiona uma pressão seletiva que atua na flora microbiana, selecionando genes de resistência e bactérias resistentes na flora bovina (CAMERON; MCALLISTER, 2016).

Os resíduos de antibióticos em carne bovina tem sido alvo constante de alertas da ONU juntamente com a OMS e FAO. No Brasil, resíduos desses fármacos são monitorados em bovinos e estão dispostos na IN nº 11 de 22 de maio de 2012 (BRASIL, 2012 a).

Especialmente em países em desenvolvimento, o uso indiscriminado de antibióticos em animais de produção é prática comum (OLATOYE e BASIRU, 2013). Casos de multirresistência em *E. coli* diarreiogênicas (DEIC's) de origem alimentar tem sido constantemente relatado (GOMEZ-ALDAPA et al., 2016).

Essa disseminação de resistência em DEIC's é atribuída principalmente ao uso extensivo de antibióticos e práticas de prescrição inadequada tanto para humanos quanto animais domésticos (BOUZARI et al., 2018; ZHANG et al., 2018).

Nos EUA, os antibióticos são mais utilizados como promotores de crescimento em animais de produção do que na Medicina Humana (MEEK; VYAS; PIDDOCK, 2015). A União Europeia em 2003 implementou uma regulamentação que proíbe o uso de antibióticos de importância clínica para humanos como promotores de crescimento (UNIÃO EUROPEIA, 2003).

No Brasil, para uso como promotores de crescimento, são proibidos o uso de: cloranfenicol e nitrofuranos (IN nº 09, 27/06/2003); anfenicois, tetraciclina,  $\beta$ -lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas) (IN nº 26, 09/07/2009), quinolonas e sulfonamidas sistêmicas (IN nº14, 17/05/2012 b).

Os produtores de crescimento mais utilizados para bovinos são: bacitracina, flavomiacina, monesina, narasina, salinomicina e virgiamicina. Todavia, dados acerca do volume consumido no Brasil não estão publicados oficialmente (PRICE et al., 2017).

Mesmo após a instituição do Agroprevine, uma ação do Ministério Público Federal solicitou a suspensão do Artigo 2º da normativa 45 de 2016 do Ministério da Agricultura que permitia o uso de colistina (antibiótico utilizado na terapia de casos



mais graves de infecções causadas por bactérias Gram negativas) junto a ração animal. A Anvisa também emitiu um alerta sobre o uso do mesmo como promotor de crescimento. E em 19 de dezembro de 2017, a comercialização de melhoradores de crescimento com presença de colistina finalmente foram proibidos em todo território nacional (BRASIL, 2018).

E embora a colistina não seja utilizada para bovinos, o surgimento de resistência à um promotor de crescimento em qualquer espécie tem sido um alerta para o setor de produção animal como um todo. Além disso, estudos que expliquem a formação e transferência de resistência em bactérias expostas à promotores de crescimento não estão completamente elucidados (RUSSEL; HOULIHAN, 2003).

A polêmica do uso de ionóforos na alimentação de bovinos, surgiu em meados da década de 90, com a correlação entre o aumento de surtos envolvendo a O157:H7 e o uso de ionóforos em bovinos (RASMUSSEN et al., 1993). Isto porque, a *E. coli* por ser uma bactéria Gram negativa poderia se beneficiar com a atuação de ionóforos em bactérias Gram positivas, excluindo as principais competidoras da mesma (EDRINGTON et al., 2003).

Sabe -se que o uso de antibióticos aditivos aumenta a abundância de genes de resistência no TGI e fezes de bovinos. Os filos mais abundantes na microbiota ruminal são: Proteobactéria, Firmicutes, Bacteoidetes e Actinobactéria, além da presença de *E. coli* (AUFFRET et al., 2017).

No entanto, há poucas informações sobre o efeito de antibióticos na microbiota ruminal como um todo. Sendo descrito apenas o efeito de administração terapêutica e subterapêutica na prevalência de bactérias específicas (RETI et al., 2013).

Além disso, pode haver diferença na microbiota de cada bovino de corte e tais diferenças não podem ser atribuídas à dieta, raça, sexo, idade ou fatores macroecológicos (DURSO et al., 2010).

A RDC de nº 20/2011 também trata da prescrição de antibióticos humanos na Medicina Veterinária. É estabelecido a prescrição de duas vias de receita atendendo as deliberações preconizadas pelo CFMV, entretanto, a mesma deixa claro que os dados não são de interesse para monitoramento farmacoepidemiológico, assim sendo não são compilados (BRASIL, 2011).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) em setembro de 2016, divulgou uma nota em que pela primeira vez chefes de Estado se comprometiam a adotar uma

abordagem ampla e coordenada para identificar as causas da resistência antimicrobiana, especialmente na saúde humana, saúde animal e agricultura. Foi então reafirmado o compromisso do desenvolvimento de ações com base no “Plano de ação global para resistência antimicrobiana”, desenvolvido pela OMS e FAO em 2015 (ONU, 2016 b).

Em novembro de 2017 a OMS divulgou uma alerta aos agricultores e indústria alimentícia para pararem de utilizar antibióticos rotineiramente para promover crescimento e prevenir doenças em animais saudáveis. Isto visou ajudar a prevenir a perda de eficácia dos antibióticos importantes para a Medicina Humana. Em alguns países, 80% do consumo de antibióticos é em animais, principalmente para promover crescimento (ONU, 2017b).

Desde o ano de 2005, a OMS compila dados e produz regulamente uma lista atualizada de resistência de todos antibióticos usados na Medicina Humana e principalmente na medicina veterinária divididos em categorias. Essa lista visa assegurar que todos os antibióticos, e especialmente os criticamente importantes sejam usados prudentemente inclusive na prática veterinária (OMS, 2017).

Vale ressaltar que a OMS também disponibiliza um guia com diretrizes sobre o uso de antibióticos medicamento importante em animais produtores de alimentos (ONU, 2017c).

### 1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÜERO, M. E. et al. A plasmid-encoded outer membrane protein, TraT, enhances resistance of *Escherichia coli* to phagocytosis. **Infection and immunity**, v. 46, n. 3, p. 740-746, 1984.

AGÜERO, M. E.; CABELLO, F. C. Relative contribution of ColV plasmid and K1 antigen to the pathogenicity of *Escherichia coli*. **Infection and immunity**, v. 40, n. 1, p. 359-368, 1983.

AIDAR-UGRINOVICH, L. et al. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brazil. **International journal of food microbiology**, v. 115, n. 3, p. 297-306, 2007.

ALDRED, K.J.; KERNS, R.J.; OSHEROFF, N. Mechanism of quinolone action and resistance. **Biochemistry**, v. 53, n. 10, p. 1565-1574, 2014.

ALEKSHUN, M.N.; LEVY, S.B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. **Cell**, v. 128, n. 6, p. 1037-1050, 2007.

ALLEN, N.E.; NICAS, T.I. Mechanism of action of oritavancin and related glycopeptide antibiotics. **FEMS microbiology reviews**, v. 26, n. 5, p. 511-532, 2003.

AMINOV, R.I. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. **Frontiers in microbiology**, v. 1, p. 134, 2010.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada- RDC nº 275, de 21 de outubro de 2002. **Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos**. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC\\_275\\_2002\\_COMP.pdf/fc9e9dac0-ae57-4de2-8cf9-e286a383f254](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_275_2002_COMP.pdf/fc9e9dac0-ae57-4de2-8cf9-e286a383f254). Acesso em: setembro 2017.

ARIZA, J. C. et al. Determinación de genes patogénicos stx1, stx2, STp, eae, asrA y cdt presentes en *Escherichia coli* uropatógena aislada de pacientes ambulatorios. **Revista Facultad de Ciencias de la Salud UDES**, v. 3, n. 1, p. 16, 2016.

AUFFRET, M.D. et al. The rumen microbiome as a reservoir of antimicrobial resistance and pathogenicity genes is directly affected by diet in beef cattle. **Microbiome**, v. 5, n. 1, p. 159, 2017.

AVENT, M. L. et al. Current use of aminoglycosides: indications, pharmacokinetics and monitoring for toxicity. **Internal medicine journal**, v. 41, n. 6, p. 441-449, 2011.

BARKOCY-GALLAGHER, G.A. et al. Seasonal prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, including O157: H7 and non-O157 serotypes, and Salmonella in commercial beef processing plants. **Journal of food protection**, v. 66, n. 11, p. 1978-1986, 2003.

BARTH, S.A. et al. The accessory genome of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) defines a persistent colonization type in cattle. **Applied and environmental microbiology**, p. AEM. 00909-16, 2016.

BEGG, E.J.; BAICLAY, M.L.; DUFFULL, S.B. A suggested approach to once-daily aminoglycoside dosing. **British journal of clinical pharmacology**, v. 39, n. 6, p. 605-609, 1995.

BERTIN, Y. et al. Aspartate metabolism is involved in the maintenance of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 in bovine intestinal content. **Environmental microbiology**, 2018.

BLAGOJEVIC, B. et al. Visual cleanliness scores of cattle at slaughter and microbial loads on the hides and the carcasses. **Veterinary record**, v. 170, n. 22, p. 563, 2012.

BLAGOJEVIC, B. et al. A study of haptoglobin levels in groups of cattle and pigs with and without abnormalities at meat inspection. **Foodborne pathogens and disease**, v. 8, n. 10, p. 1119-1124, 2011.

BOUZARI, S. et al. Prevalence and antimicrobial resistance of shiga toxin-producing *Escherichia coli* and enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients with acute diarrhea. **Iranian journal of microbiology**, v. 10, n. 3, p. 151, 2018.

BRASHEARS, M.M.; CHAVES, B.D. The diversity of beef safety: A global reason to strengthen our current systems. **Meat science**, v. 132, p. 59-71, 2017.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Norma interna DIPOA/DAS nº 1 de 17 de junho de 2015. **Aprova os procedimentos para a coleta e análise de *Escherichia coli* verotoxigênica e *Salmonella* spp. em carne de bovino in natura utilizada na formulação de produtos cárneos, cominutados, prontos para serem cozidos, fritos ou assados**, Brasília 2015. Disponível em: <file:///C:/Users/karin/Downloads/E.coliNormalInterna1de2015ProgramadeEcoliverotoxignica1706.pdf>. Acesso em: setembro 2018.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Circular nº 175 de 16 de maio de 2005 – CGPE/ DIPOA/ MAPA**. Disponível em: <http://www.cn3.com.br/wp-content/uploads/2016/04/Circular-N%C2%BA175-de-16-de-maio-de-2005.pdf>. Acesso em: setembro 2018.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017 c. **Regulamenta a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal, que disciplina a fiscalização e a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal, Brasília 2017**. Disponível em: <http://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/2017/decreto-9013-29-marco-2017-784536-publicacaooriginal-152253-pe.html>. Acesso em: setembro 2017.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 368, de 04 de setembro de 1997. **Aprova o Regulamento Técnico sobre as condições HigiénicoSanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Elaboradores/ Industrializadores de Alimentos**. Disponível em:

<http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/bra150035.pdf>. Acesso em: setembro 2017.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Instrução Normativa nº 11 de 22 de maio de 2012 a. **Publicar os resultados do acompanhamento dos Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes dos subprogramas de monitoramento e exploratório em Carnes**. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>. Acesso em: agosto de 2018.

BRASIL, Ministério Público Federal. **Uso de antibiótico em animais para abate está proibido no Brasil. MPFPR, 2018**. Disponível em: <http://www.comunicacao.mppr.mp.br/2018/01/19892/Uso-de-antibiotico-em-animais-para-abate-esta-proibido-no-Brasil.html>. Acesso em: agosto 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 44, de 26 de outubro de 2010. **Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição médica, isoladas ou em associação e dá outras providências**. Diário Oficial da União, 28 de outubro de 2010, Seção 1, p. 76-77.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº20, de 5 de maio de 2011. **Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição, isoladas ou em associação**. Diário Oficial da União, 9 de maio de 2011. Seção 1, páginas 39 a 41.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Agroprevine: agindo agora para preservar a eficácia dos antibióticos no futuro, 2017a**. Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/programas-especiais/resistencia-antimicrobianos/arquivos/copy2\\_of\\_publ\\_panagro\\_web.pdf](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/programas-especiais/resistencia-antimicrobianos/arquivos/copy2_of_publ_panagro_web.pdf). Acesso em: agosto 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Alerta epidemiológico: síndrome hemolítica urêmica e infecção por E. coli enterohemorrágica 2011a**. Disponível em : <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2011/alert-epi-2011-03-junio-brotes-STEC.pdf>. Acesso em: agosto de 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **RDC, nº 204, de 17 de fevereiro de 2016 a**. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2016/prt0204\\_17\\_02\\_2016.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2016/prt0204_17_02_2016.html). Acesso em: agosto 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, 2017 b**. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/29/Apresentacao-Surtos-DTA-2017>. Acesso em: agosto 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, 2016 b**. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresenta----o-Surtos->

DTA-2016.pdf. Acesso em: agosto 2018.

BRAY, J. Isolation of antigenically homogeneous strains of *Bact. coli neapolitanum* from summer diarrhoea of infants. **Journal Pathology Bacteriology**, v.57, p.239-245, 1945.

BROGDEN, R. N. et al. Trimethoprim: a review of its antibacterial activity, pharmacokinetics and therapeutic use in urinary tract infections. **Drugs**, v. 23, n. 6, p. 405-430, 1982.

BUNCIC, S. et al. Microbial pathogen control in the beef chain: recent research advances. **Meat science**, v. 97, n. 3, p. 288-297, 2014.

BURFOOT, D. et al. Use of fluorescence imaging as a hygiene indicator for beef and lamb carcasses in UK slaughterhouses. **Biosystems engineering**, v. 109, n. 3, p. 175-185, 2011.

BUSH, K.; BRADFORD, P.A.  $\beta$ -Lactams and  $\beta$ -lactamase inhibitors: an overview. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, p. a025247, 2016.

CALLAWAY, T. R. et al. Ionophores: their use as ruminant growth promotants and impact on food safety. **Current issues in intestinal microbiology**, v. 4, n. 2, p. 43-51, 2003.

CAMERON, A.; MCALLISTER, T.A. Antimicrobial usage and resistance in beef production. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 68, 2016.

CARTA, F.; SCOZZAFAVA, A.; SUPURAN, C.T. Sulfonamides: a patent review (2008–2012). **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 22, n. 7, p. 747-758, 2012.

CATTOIR, V. Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. **Pathologie biologie**, v. 52, n. 10, p. 607-616, 2004.

CDC, Center for Disease Control. **Defining Moments in MMWR History: 1993 E. coli O157:H7 Hamburger Outbreak, 2017**. Disponível em: [https://tools.cdc.gov/podcasts/media/pdf/DefiningMoments\\_EColi\\_1993\\_5-25-17.pdf](https://tools.cdc.gov/podcasts/media/pdf/DefiningMoments_EColi_1993_5-25-17.pdf). Acesso em: agosto 2018.

CDC, Center for Disease Control. **E. coli and Food Safety, 2018**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/features/ecoliinfection/index.html>. Acesso em: agosto 2018.

CDC, Center for Disease Control. **Importance of culture confirmation of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection as illustrated by outbreaks of gastroenteritis--New York and North Carolina, 2005**. MMWR. Morbidity and mortality weekly report, v. 55, n. 38, p. 1042, 2006.

CDC, Center for Disease Control. **National Enteric Disease Surveillance: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) Annual Report, 2015**. Disponível em: [https://www.cdc.gov/nationalsurveillance/pdfs/STEC\\_Annual\\_Summary\\_2015-508c.pdf](https://www.cdc.gov/nationalsurveillance/pdfs/STEC_Annual_Summary_2015-508c.pdf). Acesso em: agosto 2018.

CDC, Center for Disease Control. **Reports of Selected *E. coli* Outbreak Investigations, 2018**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/ecoli/outbreaks.html>. Acesso em: outubro 2018.

CHANTER, N. et al. Dysentery in calves caused by an atypical strain of *Escherichia coli* (S102-9). **Veterinary microbiology**, v. 12, n. 3, p. 241-253, 1986.

CHEN, J.; XIE, S. Overview of sulfonamide biodegradation and the relevant pathways and microorganisms. **Science of The Total Environment**, v. 640, p. 1465-1477, 2018.

CHOI, S.H.; BAUMLER, D.J.; KASPAR, C.W. Contribution of dps to acid stress tolerance and oxidative stress tolerance in *Escherichia coli* O157: H7. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 9, p. 3911-3916, 2000.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 65, n. 2, p. 232-260, 2011.

CLARK, J.D. et al. A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains a Ca<sup>2+</sup>-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. **Cell**, v. 65, n. 6, p. 1043-1051, 1991.

CONNOLLY, J. P.R.; ROE, A.J. When and where? Pathogenic *Escherichia coli* differentially sense host D-serine using a universal transporter system to monitor their environment. **Microbial cell**, v. 3, n. 4, p.181, 2016.

CORREIA, S. et al. Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? **Journal of medical microbiology**, v. 66, n. 5, p. 551-559, 2017.

CROXEN, M. A. et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 822–880, 2013.

DATASUS, Ministério da Saúde. **Morbidade hospitalar do sus - por local de internação – Tocantins**. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/nito.def>. Acesso em: outubro 2018.

DAVIS, B.D. Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. **Microbiological reviews**, v. 51, n. 3, p. 341, 1987.

DE PAULA, D. et al. *Escherichia coli* O157: H7: local epidemiology and disease spectrum in brazil. **Clinical & Biomedical Research**, v. 34, n. 2, p.113-121, 2014.

DEBROY, C. et al. Comparison of O-antigen gene clusters of all O-serogroups of *Escherichia coli* and proposal for adopting a new nomenclature for O-typing. **PLoS One**, v. 11, n. 1, p. e0147434, 2016.

DEBROY, C., FRATAMICO, P.M.; ROBERTS, E. Molecular serogrouping of *Escherichia coli*. **Animal health research reviews**, v.19, n.1, p. 1-16, 2018.

DEWEESE, J.E.; OSHEROFF, N. The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: wolf in sheep's clothing. **Nucleic acids research**, v. 37, n. 3, p. 738-748, 2008.

DURSO, L.M. et al. Animal-to-animal variation in fecal microbial diversity among beef cattle. **Applied Environmental Microbiology**, v. 76, n. 14, p. 4858-4862, 2010.

DZIDIC, S.; SUSKOVIC, J.; KOS, B. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. **Food Technology & Biotechnology**, v. 46, n. 1, 2008.

ECKBURG, P. B. et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. **Science**, v. 308, n. 5728, p. 1635-1638, 2005.

EDRINGTON, T. S. et al. Effects of the antibiotic ionophores monensin, lasalocid, laidlomycin propionate and bambamycin on *Salmonella* and *E. coli* O157: H7 in vitro. **Journal of applied microbiology**, v. 94, n. 2, p. 207-213, 2003.

EDUARDO, M. B. P. et al. **Síndrome hemolítico-urêmica – normas e instruções. São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”, Secretaria de Estado da Saúde, 2002.** Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/>. Acesso em: agosto 2018.

FÁBREGA, A. et al. Mechanism of action of and resistance to quinolones. **Microbial biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 40-61, 2009.

GAY, C.C. *Escherichia coli* and neonatal disease of calves. **Bacteriological reviews**, v. 29, n. 1, p. 75, 1965.

GILL, R.K. et al. Mechanism underlying inhibition of intestinal apical Cl<sup>-</sup>/OH<sup>-</sup> exchange following infection with enteropathogenic *E. coli*. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 2, p. 428-437, 2007.

GOFFIN, C.; GHUYSEN, J.M. Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 4, p. 1079-1093, 1998.

GOLKAR, Z.; BAGASRA, O.; PACE, D.G. Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 02, p. 129-136, 2014.

GOMES, T.A.T. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Brazilian journal of microbiology**, v. 47, p. 3-30, 2016.

GÓMEZ-ALDAPA, C.A. et al. Presence of multidrug-resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, enteropathogenic *E. coli* and enterotoxigenic *E. coli*, on raw nopalitos (*Opuntia ficus-indica* L.) and in nopalitos salads from local retail markets in Mexico. **Foodborne pathogens and disease**, v. 13, n. 5, p. 269-274, 2016.

GOULD, L. H. et al. Hemolytic uremic syndrome and death in persons with



*Escherichia coli* O157: H7 infection, foodborne diseases active surveillance network sites, 2000–2006. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 10, p. 1480-1485, 2009.

GROSSMAN, T.H. Tetracycline antibiotics and resistance. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, p. a025387, 2016.

HALL, G. A. et al. Dysentery caused by *Escherichia coli* (S102-9) in calves: natural and experimental disease. **Veterinary Pathology**, v. 22, n. 2, p. 156-163, 1985.

HASDEMIR, U. The role of cell wall organization and active efflux pump systems in multidrug resistance of bacteria. **Mikrobiyoloji bulteni**, v. 41, n. 2, p. 309-327, 2007.

HERNANDES, Rodrigo T. et al. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS microbiology letters**, v. 297, n. 2, p. 137-149, 2009.

HEUVELINK, A. E. et al. Infections with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* and hemolytic-uremic syndrome. **Nederlands tijdschrift voor geneeskunde**, v. 140, n. 3, p. 134-137, 1996.

HOFFMAN, M.A. et al. Bovine immune response to Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O157: H7. **Clinical and vaccine immunology**, v. 13, n. 12, p. 1322-1327, 2006.

HONG, Y.L. et al. Inhibition of recombinant Pneumocystis carinii dihydropteroate synthetase by sulfa drugs. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 39, n. 8, p. 1756-1763, 1995.

HU, J.; TORRES, A.G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: foe or innocent bystander? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 8, p. 729-734, 2015.

JIANG, M.; KARASAWA, T.; STEYGER, P.S. Aminoglycoside-induced cochleotoxicity: a review. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 11, p. 308, 2017.

JOHNSON, T.J. et al. DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 2, p. 745-758, 2006.

JURE, M.A. et al. Aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* O157 en productos cárnicos bovinos y medias reses en la provincia de Tucumán. **Revista argentina de microbiología**, v. 47, n. 2, p. 125-131, 2015.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature reviews microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123, 2004.

KAPOOR, G.; SAIGAL, S.; ELONGAVAN, A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. **Journal of anaesthesiology, clinical pharmacology**, v. 33, n. 3, p. 300, 2017.

KARMALI, M.A. et al. Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 11, p.

4930-4940, 2003.

KIM, M.S. et al. Automated detection of fecal contamination of apples based on multispectral fluorescence image fusion. **Journal of food engineering**, v. 71, n. 1, p. 85-91, 2005.

KIRK, M. D. et al. World Health Organization estimates of the global and regional disease burden of 22 foodborne bacterial, protozoal, and viral diseases, 2010: a data

KOLENDA, R.; BURDUKIEWICZ, M.; SCHIERACK, P. A systematic review and meta-analysis of the epidemiology of pathogenic *Escherichia coli* of calves and the role of calves as reservoirs for human pathogenic *E. coli*. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 5, p. 23, 2015.

LAMBERT, P. A. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of the royal society of medicine**, v. 95, n. Suppl 41, p. 22, 2002.

LAVANYA, R. Sulphonamides: A Pharmaceutical Review. **International Journal of Pharmaceutical Science Invention**, v.6, n. 2, 2017.

LEVINE, C.; HIASA, H.; MARIANS, K.J. DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression**, v. 1400, n. 1-3, p. 29-43, 1998.

LEVINE, M.M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. **Journal of Infection Diseases**, v.155, p.377–389,1987.

LLUQUE, A. et al. Comparison of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) diagnosis by serology and by polymerase chain reaction (PCR). **Revista de gastroenterologia del Peru: organo oficial de la Sociedad de Gastroenterologia del Peru**, v. 30, n. 2, p. 121-125, 2010.

LORETZ, M.; STEPHAN, R.; ZWEIFEL, C. Antibacterial activity of decontamination treatments for cattle hides and beef carcasses. **Food Control**, v. 22, n. 3-4, p. 347-359, 2011.

LYNNE, A.M. et al. Detection of Iss and Bor on the surface of *Escherichia coli*. **Journal of applied microbiology**, v. 102, n. 3, p. 660-666, 2007.

MAJOWICZ, S. E. et al. Global incidence of human Shiga toxin–producing *Escherichia coli* infections and deaths: a systematic review and knowledge synthesis. **Foodborne pathogens and disease**, v. 11, n. 6, p. 447-455, 2014.

MAKI, L. R.; PICARD, K. Normal intestinal flora of cattle fed high-roughage rations. **Journal of bacteriology**, v. 89, n. 5, p. 1244-1249, 1965.

MARCONE, G.L. et al. Old and new glycopeptide antibiotics: From product to gene and back in the post-genomic era. **Biotechnology advances**, v.38, n.2, p.534-554,

2018.

MARSHALL, B.M.; OCHIENG, D.J.; LEVY, S.B. Commensals: underappreciated reservoir of antibiotic resistance. **Microbe**, v. 4, n. 5, p. 231-238, 2009.

MASSOVA, I.; MOBASHERY, S. Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and  $\beta$ -lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 42, n. 1, p. 1-17, 1998.

MATTOS, K.P.H et al. Brazil's resolutions to regulate the sale of antibiotics: Impact on consumption and *Escherichia coli* resistance rates. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 10, p. 195-199, 2017.

MAUNSELL, B.; BOLTON, D.J. **Guidelines for food safety management on farms**. Teagasc, 2004.

MEAD, P.S.; GRIFFIN, P.M. *Escherichia coli* O157: H7. **The Lancet**, v. 352, n. 9135, p. 1207-1212, 1998.

MEEK, R.W.; VYAS, H.; PIDDOCK, L.J.V. Nonmedical uses of antibiotics: time to restrict their use? **PLoS biology**, v. 13, n. 10, p. e1002266, 2015.

MENGE, C. et al. Verotoxin 1 from *Escherichia coli* affects Gb3/CD77+ bovine lymphocytes independent of interleukin-2, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and interferon- $\alpha$ . **Experimental Biology and Medicine**, v. 228, n. 4, p. 377-386, 2003.

MENGE, C. et al. Comparison of binding and effects of *Escherichia coli* Shiga toxin 1 on bovine and ovine granulocytes. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 113, n. 3-4, p. 392-403, 2006.

MENGE, C. et al. Bovine macrophages sense *Escherichia coli* Shiga toxin 1. **Innate immunity**, v. 21, n. 6, p. 655-664, 2015.

MOXLEY, R.A.; SMITH, D.R. Attaching-effacing *Escherichia coli* infections in cattle. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 26, n. 1, p. 29-56, 2010.

MUELLER, C. A.; BROZ, P.; CORNELIS, G. R. The type III secretion system tip complex and translocon. **Molecular microbiology**, v. 68, n. 5, p. 1085-1095, 2008.

NAAS, T.; NORDMANN, P. OXA-Type  $\beta$ -Lactamases. **Current pharmaceutical design**, v. 5, p. 865-880, 1999.

NATARO, J.P.; LEVINE, M.M. *Escherichia coli* diseases in humans in *Escherichia coli*. In: Gyles, C.L. (Ed.), Domestic Animals and Humans. Cab International, Wallingford, Oxon, U.K., pp. 285–333, 1994.

NESPOLO, N.M. et al. Ocorrência de *Escherichia coli* O157: H7 e O26 sorbitol negativas em matadouro frigorífico de bovino e suscetibilidade a antimicrobianos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.81, n.3, p. 209-217, 2014.

OCHOA T.J. 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.852-856, 2008.

OLATOYE, I.O.; BASIRU, A. Antibiotic usage and oxytetracycline residue in African catfish (*Clarias gariepinus*) in Ibadan, Nigeria. **World Journal of Fish and Marine Sciences**, v. 5, n. 3, p. 302-309, 2013.

OLIVEIRA, A.C; PAULA, A.O; ROCHA, R.F. Costs of antimicrobial treatment in patients with infection. **Revistas de Enfermagem**, v.33, n.3, p.352-361, 2015.

OMS. World Health Organization. **WHO guidelines on use of medically important antimicrobials in food-producing animals. 2017**. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/258970/9789241550130-eng.pdf>. Acesso em: maio 2018.

ONU. World Health Organization. **At UN, global leaders commit to act antimicrobial resistance. Collective effort to address a challenge to health, food security, and development, 2016 a**. Disponível em: <http://www.who.int/news-room/detail/21-09-2016-at-un-global-leaders-commit-to-act-on-antimicrobial-resistance>. Acesso em: agosto 2018.

ONU. World Health Organization. **Critically important antimicrobials for human medicine, 5th revision, 2017 a**. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/antimicrobials-fifth/en/>. Acesso em: agosto 2018.

ONU. World Health Organization. **Stop using antibiotics in healthy animals to prevent the spread of antibiotic resistance, 2017 b**. Disponível em: <http://www.who.int/news-room/detail/07-11-2017-stop-using-antibiotics-in-healthy-animals-to-prevent-the-spread-of-antibiotic-resistance>. Acesso em: agosto 2018.

ONU. World Health Organization. **WHO guidelines on use of medically important antimicrobials in food-producing animals, 2017 c**. Disponível em: [http://www.who.int/foodsafety/publications/cia\\_guidelines/en/](http://www.who.int/foodsafety/publications/cia_guidelines/en/). Acesso em: agosto 2018.

ONU. World Health Organization. **By 2050, drug-resistant infections could cause global economic damage on par with 2008 financial crisis, 2016 b**. Disponível em: <http://www.worldbank.org/en/news/press-release/2016/09/18/by-2050-drug-resistant-infections-could-cause-global-economic-damage-on-par-with-2008-financial-crisis>. Acesso em: outubro 2018.

ONU. World Health Organization. **Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization, 2014**. Disponível em: <https://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>. Acesso em: outubro 2018.

OPAS. Pan American Health Organization. **Recommendations for Implementing Antimicrobial Stewardship Programs in Latin America and the Caribbean:**

**Manual for Public Health Decision-Makers.** Washington, D.C.: Paho, Fiu; 2018. Disponível em: <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/49645>. Acesso em: janeiro 2019.

ORDEN, J.A. et al. Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and necrotoxigenic *E. coli* (NTEC) isolated from healthy cattle in Spain. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, n. 1, p. 29-35, 2002.

ORI, E.L. et al. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* and *Escherichia albertii* in Brazil: pathotypes and serotypes over a 6-year period of surveillance. **Epidemiology & Infection**, v. 147, p.1-10, 2019.

ORSKOV, F.; ORSKOV, I. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. **Canadian journal of microbiology**, v. 38, n. 7, p. 699-704, 1992.

ORSKOV, I. et al. Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. **Bacteriological reviews**, v. 41, n. 3, p. 667, 1977.

PAKARIAN, P.; PAWELEK, P.D. Subunit orientation in the *Escherichia coli* enterobactin biosynthetic EntA-EntE complex revealed by a two-hybrid approach. **Biochimie**, v. 127, p. 1-9, 2016.

PENSABENE, J.W.; FIDDLER, W.; DONOGHUE, D. J. Isolation of chloramphenicol from whole eggs by supercritical fluid extraction with in-line collection. **Journal-aoc international**, v. 82, p. 1334-1339, 1999.

PIOLETTI, M. et al. Crystal structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3. **The EMBO journal**, v. 20, n. 8, p. 1829-1839, 2001.

PIRRO, F. et al. Neutralizing antibodies against Shiga-like toxins from *Escherichia coli* in colostrum and sera of cattle. **Veterinary microbiology**, v. 43, n. 2-3, p. 131-141, 1995.

PRICE, Lance B. et al. Combating antibiotic resistance-A Policy Roadmap to Reduce Use of Medically Important Antibiotics in Livestock. 2017.

RAMATLA, T. et al. Evaluation of Antibiotic Residues in Raw Meat Using Different Analytical Methods. **Antibiotics**, v. 6, n. 4, p. 34, 2017.

RANGEL J.M.; SPARLING P.H.; CROWE C. Epidemiologia de *Escherichia coli* O157: H7 Surtos, Estados Unidos, 1982-2002. **Doenças Infecciosas Emergentes**. v.11, n.4, p. 603-609, 2005.

RASMUSSEN, M.A. et al. Rumen contents as a reservoir of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 114, n. 1, p. 79-84, 1993.

RETI, K.L. et al. Effect of antimicrobial growth promoter administration on the intestinal microbiota of beef cattle. **Gut pathogens**, v. 5, n. 1, p. 8, 2013.

RICHARD, H.T.; FOSTER, J.W. Acid resistance in *Escherichia coli*. **Advances in applied microbiology**, v. 52, p. 167-186, 2003.

RILEY, L.W. et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **New England Journal of Medicine**, v. 308, n. 12, p. 681-685, 1983.

RUSSELL, J.B.; HOULIHAN, A.J. Ionophore resistance of ruminal bacteria and its potential impact on human health. **FEMS microbiology reviews**, v. 27, n. 1, p. 65-74, 2003.

SAGATARAME, S. et al. Effectiveness of supplementing drinking water with Magnesium Chlorophyllin to increase faecal fluorescence in sheep, as an aid to increase detection of contamination in the abattoir. **In: Proceedings of the International Conference Biological Food Safety and Quality**. Faculty of Agriculture, Novi Sad (Serbia), 2012.

SARIDAKIS, H.O. et al. Virulence properties of *Escherichia coli* strains belonging to enteropathogenic (EPEC) serogroups isolated from calves with diarrhea. **Veterinary microbiology**, v. 54, n. 2, p. 145-153, 1997.

SARMAH, A.K.; MEYER, M.T.; BOXALL, A.B.A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. **Chemosphere**, v. 65, n. 5, p. 725-759, 2006.

SCHWARZ, S. et al. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. **FEMS microbiology reviews**, v. 28, n. 5, p. 519-542, 2004.

SODERLUND, R. et al. Genomic comparison of *Escherichia coli* serotype O103: H2 isolates with and without verotoxin genes: implications for risk assessment of strains commonly found in ruminant reservoirs. **Infection ecology & epidemiology**, v. 6, n. 1, p. 30246, 2016.

SOUZA, C.O., et al. *Escherichia coli* enteropatogênica: uma categoria diarreio gênica versátil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 7, n. 2, p. 79-91, 2016.

SPANO, L.C., et al. High prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* carrying toxin-encoding genes isolated from children and adults in southeastern Brazil. **BMC infectious diseases**, v. 17, n. 1, p. 773, 2017.

SPRATT, B.G. Penicillin-binding Proteins and the future of  $\beta$ -Lactam Antibiotics: The Seventh Fleming Lecture. **Microbiology**, v. 129, n. 5, p. 1247-1260, 1983.

STAMM, I. et al. Epithelial and mesenchymal cells in the bovine colonic mucosa differ in their responsiveness to *Escherichia coli* Shiga toxin 1. **Infection and immunity**, v. 76, n. 11, p. 5381-5391, 2008.

STORDEUR, P. et al. Clinical signs, reproduction of attaching/effacing lesions, and enterocyte invasion after oral inoculation of an O118 enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in neonatal calves. **Microbes and infection**, v. 2, n. 1, p. 17-24, 2000.

TEJEDA-DOMINGUEZ, F., et al. A Novel Mechanism for Protein Delivery by the Type 3 Secretion System for Extracellularly Secreted Proteins. **mBio**, v. 8, n. 2, p. e00184-17, 2017.

TENOVER, F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **American journal of infection control**, v. 34, n. 5, p. S3-S10, 2006.

TOMAZETTO, G.; SILVA, A.C.M; VIDOTTO, M. C. Fatores de virulência de amostras de *Escherichia coli* septicêmicas. **Biosaúde**, v. 6, n. 1/2, p. 3-16, 2004.

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; TARDELLI G.T.A. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 5, p. 508–513, 2002.

UNGEMACH, F.R.; MÜLLER-BAHRDT, D.; ABRAHAM, G. Guidelines for prudent use of antimicrobials and their implications on antibiotic usage in veterinary medicine. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 296, p. 33-38, 2006.

UNIÃO EUROPEIA. **Regulation (Ec) No 1831/2003 Of The European Parliament and of The Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition, 2003**. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003R1831&fr>. Acesso em: agosto 2018.

UNICEF. **Rapid E. coli detection, 2018**. Disponível em: [https://www.unicef.org/innovation/innovation\\_92771.html](https://www.unicef.org/innovation/innovation_92771.html). Acesso em: outubro 2018.

VANAJA, S.K.et al. Differential expression of virulence and stress fitness genes between *Escherichia coli* O157: H7 strains with clinical or bovine-biased genotypes. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 1, p. 60-68, 2010.

VIDOVIC, S.; KORBER, D.R. *Escherichia coli* O157: Insights into the adaptive stress physiology and the influence of stressors on epidemiology and ecology of this human pathogen. **Critical reviews in microbiology**, v. 42, n. 1, p. 83-93, 2016.

XU, Y.et al. High prevalence of virulence genes in specific genotypes of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 109, 2017.

ZAMAN, S.B. et al. A review on antibiotic resistance: alarm bells are ringing. **Cureus**, v. 9, n. 6, 2017.

ZHANG, S.X. et al. Antibiotic resistance and molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* and non-typhoidal Salmonella strains isolated from infections in Southwest China. **Infectious diseases of poverty**, v. 7, n. 1, p. 53, 2018.

ZHOU, X. et al. Flagellin of enteropathogenic *Escherichia coli* stimulates interleukin-8 production in T84 cells. **Infection and immunity**, v. 71, n. 4, p. 2120-2129, 2003.

## Capítulo 2. Susceptibilidade antimicrobiana e pesquisa do gene *eae* e *rfb* O157:H7 em *Escherichia coli* isoladas de fezes e conteúdo ruminal de bovinos abatidos sob inspeção no município de Araguaína-TO

### RESUMO

A resistência bacteriana é um problema de saúde global. Nesse contexto, a *Escherichia coli* (*E. coli*) é tipicamente usada como indicador de resistência bacteriana em bovinos destinados ao consumo humano por sua importância na saúde única. O objetivo do presente trabalho é determinar a susceptibilidade dos isolados de *E. coli* a antibióticos utilizados rotineiramente na atenção à saúde através do teste de sensibilidade microbiana por disco- difusão e pesquisa do gene *eae* e *rfb* O157:H7 em 259 amostras de *E. coli* isoladas de fezes e conteúdo ruminal de 323 bovinos abatidos sob Inspeção Estadual em Araguaína-To. No total, foram obtidos 259 isolados de *E. coli*, dos quais 186 isolados de fezes e 73 de conteúdo ruminal. Quanto a pesquisa dos genes, 7 amostras foram positivas para o gene *eae*, não houveram amostras positivas para o gene *rfb* O157:H7. Em relação ao perfil de multirresistência a sulfonamida foi o antibiótico com maior índice de resistência, seguida de florfenicol, gentamicina, enrofloxacina e amoxicilina + ácido clavulânico, doxiciclina e cefepime. Ao analisarmos os materiais biológicos separadamente, os isolados de fezes apresentaram multirresistência a 4 antibióticos e para isolados de conteúdo ruminal a 8 antibióticos. As amostras positivas para o gene *eae* apresentaram multirresistência a 5 antibióticos. Os resultados encontrados neste trabalho sugerem necessidade de maior vigilância no uso de antibióticos para bovinos na microrregião de Araguaína-TO, tendo em vista as altas taxas de resistência obtidas e o uso concomitante de alguns antibióticos de importância clínica em humanos.

**Palavras-chave:** antibiograma, bactérias patogênicas, resistência, ruminantes



## Chapter 2. Antimicrobial susceptibility and research of the *eae* and *rfb* O157:H7 gene in *Escherichia coli* isolated from feces and ruminal content of slaughtered cattle under inspection in the municipality of Araguaína-TO

### ABSTRACT

Bacterial resistance is a global health problem. In this context, *Escherichia coli* (*E. coli*) is most commonly used as an indicator of bacterial resistance in cattle. This manual is raised by an antibody screening questionnaire to detect microbiota through gene screening to detect the presence of disc diffusion microbial antibodies and *eae*, *rfb* O157: H7 gene screening in 259 *E. coli* samples. feces and ruminal content of 323 cattle slaughtered under State Inspection in Araguaína-To. In total, 259 *E. coli* isolates were included, of which 186 isolates of 73 and 73 with ruminal content. As for the genes, the seven were positive for the *eae* gene, there were no positive images for the *rfb* O157: H7 gene. Regarding the multiresistance profile sulfonamide was the antibiotic with the highest resistance index, followed by florfenicol, gentamicin, enrofloxacin and amoxicillin + clavulanic, doxycycline and cefepime. "By decreasing the biological amounts, multiresistance bones to 4 and antibiotics to remove rumen content to 8 antibiotics. As positive measures for the gene and multiresistance to 5 antibiotics. The following results: Increased rate of use of antibiotics to use in cattle in the Araguaína-TO microregion rate, given the high resistance rates and concomitant use of some clinically important antibiotics in humans

**Key words:** antibiogram, pathogenic bacteria, resistance, ruminants

## 1. INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana à antibióticos é uma das maiores ameaças à saúde, bem-estar e segurança alimentar. Tendo em vista a importância indiscutível dos antibióticos para medicina humana e animal, a ONU tem utilizado a abordagem de saúde única (saúde humana e animal integradas), uma vez que animais destinados a alimentação tem sido uma importante rota de propagação de bactérias que disseminam os fatores de resistência a esses fármacos (ONU,2018).

Bactérias patogênicas resistentes a antibióticos em bovinos, são frequentemente isoladas em ambientes de criação e produtos cárneos, sendo considerada uma causa importante de infecções clínica e colonização subclínica em humanos (LANDERS et al., 2012).

Embora haja grande enfoque em cepas de *Escherichia coli* (*E. coli*) patogênicas, outra grande preocupação tem sido a transferência horizontal de genes de resistência em cepas comensais e a consequente disseminação das mesmas em produtos cárneos (VIEIRA et al., 2011). Além disso, o uso frequente de antibióticos em bovinos é considerado uma importante forma de disseminação de cepas comensais multirresistentes (LANDERS et al., 2012).

Os bovinos são sabidamente considerados reservatórios e potenciais disseminadores de *E. coli* e, atualmente, tem assumido um papel significativo na disseminação de resistência através dessa espécie bacteriana. No entanto, dados exatos sobre a quantidade de antibióticos utilizados para criação dessa espécie são escassos, o que se tem são estimativas de que o consumo desses fármacos em bovinos supera o consumo humano (AARESTRUP, 2015).

Atualmente no Brasil, os dados epidemiológicos acerca de *E. coli* enterohemorrágica estão concentrados no estado de São Paulo, sendo assim, o monitoramento de tal sorogrupo necessita ser ampliado (CASTRO et al., 2019).

A escassez de dados epidemiológicos em bovinos também ocorre para a categoria enteropatogênia, onde pouco se sabe sobre a importância dos bovinos como potenciais disseminadores de tal sorogrupo (SINGH et al., 2015).

A principal forma de contaminação de carcaças bovinas por *E. coli* se dá através das fezes (quando há rupturas indesejadas no trato gastrointestinal das carcaças durante o abate), sendo este um potencial meio de disseminação desse patógeno (RUSSEL, DIEZ- GONZALEZ e JAVIS, 2000; NESPOLO et al., 2014).

No Brasil, a portaria de número 205 de 17 de fevereiro de 2016 inclui as doenças transmitidas por alimentos (DTA'S) na lista de doenças e agravos que devem ser monitoradas por meio de estratégias da vigilância, sendo a *E. coli* apontada como uma das principais bactérias associadas a essas doenças (BRASIL, 2016). E entre os anos de 2007-2017, carne bovina e derivados foram responsáveis por 2,1% de surtos alimentares (BRASIL, 2017a).

Em casos mais severos, *E. coli*. resistentes podem desencadear quadros de sepse, que são fatais. No Brasil de janeiro de 2015 até março de 2016 foram registrados 4.500 óbitos desencadeados por sepse, destes, 177 pertencentes à Região Norte dos quais 16 oriundos do Tocantins sendo 12 somente na microrregião de Araguaína. O que reforça a necessidade do uso criterioso de antibióticos (BRASIL, 2017 b).

Assim, o uso de testes de susceptibilidade antimicrobiana é de extrema importância na orientação clínica para direcionamento do tratamento e no monitoramento fármaco-epidemiológico de resistência (MOUTON et al., 2012).

Frente a essa problemática de resistência bacteriana, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, juntamente com a ONU, tornou público no ano de 2016 o programa AGROPREVINE e em 2017 instituiu a Instrução Normativa nº41 de outubro de 2017, na qual um dos objetivos é a vigilância e monitoramento da resistência aos antimicrobianos na agropecuária (BRASIL, 2017c).

Assim, a geração de dados relacionados a resistência de *E. coli* isoladas de bovinos cujos produtos são rotineiramente consumidos por humanos ainda é insuficiente e necessária para subsidiar discussões e ações relacionadas ao problema de resistência aos antibióticos no Brasil.

Tendo em vista a relevância do tema supracitado, o objetivo do presente estudo consistiu em determinar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana e distribuição microrregional de *E. coli* patogênicas isoladas de bovinos abatidos sob inspeção estadual no município de Araguaína-TO no ano de 2016.

## **1.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **1.2.1 Declaração de ética**

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Tocantins, com número de protocolo nº 23101.003806/2016-92.

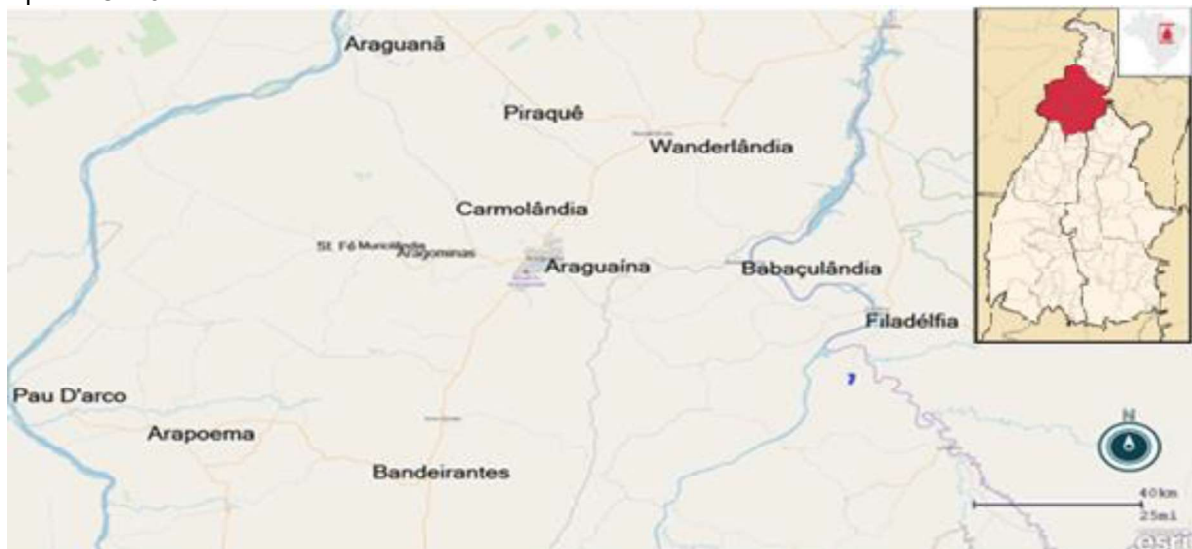
### 1.2.2 Delineamento estatístico

Para o cálculo do tamanho da amostra foi utilizado o programa *Epi info* versão 7.0, um programa de processamento de texto, banco de dados e estatística para saúde pública do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) do governo federal dos EUA. Um nível de confiança de 95% e um erro tolerável de 5% foi estabelecido para uma população amostral estimada de 2000 animais abatidos por ano e uma prevalência esperada de 50% de animais infectados por *E. coli*.

O tamanho da amostra mínimo calculado foi de 323 animais. As amostras foram coletadas de forma a contemplar os 13 municípios (Araguaína, Babaçulândia, Filadélfia, Wanderlândia, Bandeirantes, Carmolândia, Piraquê, Santá Fé, Muricilândia, Aragominas, Arapoema, Pau D'arco e Araguanã) que compõe a microrregião de Araguaína-To (Figura 1).

A eficácia (sensibilidade) dos antibióticos baseou-se no critério adotado por Salehi e Bonab (2006) e Adzitey, Saba e Gabriel (2016), para que um antibiótico seja eficiente deve apresentar a frequência mínima de sensibilidade a partir do ponto de corte de 75%.

Figura 1. Mapa microrregião Araguaína e os respectivos municípios coletados nesse estudo. Fonte: Epi Info® 7.0.



### 1.2.3 Coleta das amostras

As amostras foram coletadas em abatedouro-frigorífico localizado no município de Araguaína-TO (7°11'28" de latitude, 48°12' 26" de longitude) registrado sob SIE (BRASIL, 2017d).

As amostras fecais foram obtidas por suabe retal na linha de abate após às manobras de incisão perianal para liberação desta extremidade do trato digestivo e oclusão do reto, utilizando suabe estéril. As amostras foram acondicionadas em tubos plásticos estéreis com solução PBS (Tampão Fosfato-salino pH 8) na concentração 1X e armazenados sob refrigeração em caixa isotérmica.

Porções do conteúdo ruminal eram recolhidas do rúmen de cada bovino imediatamente após sua despança durante o abate. Com o auxílio de um colaborador com mãos enluvadas, o rúmen era seccionado em sua porção inferior para possibilitar a colheita do conteúdo ruminal. Aproximadamente 1 g do conteúdo era coletado de acordo com Hungate (1966).

Quanto a raça e sexo, os animais eram predominantemente fêmeas aneloradas.

As amostras foram encaminhadas em caixas isotérmicas para o laboratório de Higiene e Saúde Pública da Escola de Medicina veterinária e Zootecnia da Universidade Federal do Tocantins (UFT/EMVZ) em um prazo máximo de duas horas do momento da coleta.

#### 1.2.4 Isolamento e identificação de *Escherichia coli*

No laboratório, 0,1 mL de cada amostra foi transferida para tubos contendo 10 mL de caldo selenito cistina (CS) - Himedia®. A incubação dos tubos foi realizada a 37°C por 24h (OLIVEIRA et al., 2004).

A partir CS foram realizadas semeadura por técnica de esgotamento superficial em placas com Ágar Macconkey (MC) - Merck® e incubadas a 37° C por 24h.

As colônias sugestivas foram semeadas em ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) Himedia®, incubados a 37°C por 24h, verificando-se as reações típicas para *E. coli*. Culturas suspeitas foram submetidas provas à bioquímicas adicionais (indol - Himedia®, vermelho de metila - Himedia®, citrato - Himedia®, ureia - Himedia®, glicose - Himedia®, lactose - Himedia® e sacarose - Himedia®).

Em seguida, as amostras foram estocadas em ágar nutriente - Himedia® e mantidas por tempo indeterminado a 8° C até posteriores análises.

#### 1.2.5 Forma de preparo das amostras

Para a extração do DNA foi utilizado o protocolo de termo extração proposto por Andrade et al. (2009). Onde o crescimento bacteriano obtido do ágar BHI foi transferido com auxílio de suabe para microtubos com 1000 µL de água destilada ultrapura - Sigma® e submetidas a 100 °C por 10 min em banho seco, e centrifugadas a 12.000 G por 10 minutos, recuperando o sobrenadante.

#### 1.2.6 Diagnóstico molecular de *Escherichia coli*

Para confirmação genética das amostras identificadas como *E. coli* nas provas bioquímicas, foi utilizado o primer para o gene *uidA* por meio da PCR de acordo com Mcdaniels et al. (1996), como controle positivo foi utilizada a amostra de referência ATCC 25922.

Para o gene *eae* foi utilizada como controle positivo a amostra de referência *E. coli* 2348/69 de acordo com Costa et al. (2010), e para o gene *rfb* O157:H7 a *E. coli* EDL/EHEC 933 de acordo com Panton e Panton (1998).

Para os 3 genes pesquisados, foram preparados *mix's* individuais contendo: 5X solução tampão (Buffer IVB PHneutria®); dNTPs (10 mM); *primer* F (20 pMol/µL); *primer* R (20 pMol/µL), os oligonucleotídeos utilizados estão descritos no quadro 2; *Taq* polimerase DNA (1 UNID); DNA teste (50 nM a 200 nM).

As sequências dos iniciadores e seus produtos de amplificação estão descritos no quadro 2.

Quadro 2. Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho e o tamanho dos amplicons e temperatura de anelamento para identificação do gene *uidA*, *eae*. Fonte: elaborado pelo autor.

Iniciador	Sequência (5'-3')	Produtos (pb)	T° anelamento
<i>uidA</i>	5-CCAAAAGCCAGACAGAGT-3	623	58°
	5-GCACAGCACATCCCCAAAGAG- 3		
<i>eae-1/eae-2</i>	5-AAACAGGTGAAACTGTTGCC -3	454	50°
	5-CTCTGCAGATTAACCTCTGC - 3		
	5-TTGCCTATGTACAGCTAATCC-3		
<i>rfb</i> O157:H7	5-CGGACATCCATGTGATATGG-3	259	65°
	5-TTGCCTATGTACAGCTAATCC-3		

#### 1.2.7 Antibiograma

Para os testes de susceptibilidade a antibióticos as amostras estocadas em ágar nutriente foram repicadas em ágar MacConkey/BHI - Merck® e incubadas a 37°C por 24h para o devido crescimento e obtenção de colônias isoladas. Após este

procedimento 1 a 3 colônias foram transferidas para 2mL de caldo Mueller Hinton - Kasvi®. A cultura em caldo foi incubada em estufa a 37°C até alcançar o grau de turbidez de uma solução padrão de McFarland a 0,5 (aproximadamente  $10^8$  microrganismos/mL). Esse processo foi realizado para cada amostra de *E. coli* pesquisada. A realização do antibiograma e sua interpretação seguiu a metodologia proposta por CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2012) por meio da técnica Kirby Bauer. Para controle de qualidade e confiabilidade dos resultados obtidos, foi utilizada a cepa de referência *E. coli* ATCC 25922.

Posterior à incubação, cada uma das culturas em caldo foi inoculada individualmente em placa de Petri (150x20 mm) contendo o meio ágar Mueller Hinton - Kasvi®. O procedimento consiste em mergulhar um suabe de algodão estéril na suspensão, em até 15 min após atingir o grau de turbidez. Foi eliminado o excesso de inóculo no suabe e distribuído o restante em toda a superfície da placa.

Os resultados foram obtidos pela mensuração do diâmetro dos halos de inibição formado (incluindo o diâmetro do disco) em milímetro, com auxílio de um paquímetro. As amostras foram classificadas em sensíveis, intermediárias ou resistentes aos antibióticos testados, de acordo com a tabela proposta pelo fabricante (Sensifar, Cefar®, anexo 1), para efeito de resultados, consideraram-se apenas as categorias sensíveis e resistentes, nesta última, contabilizaram-se os resultados de intermediários e resistentes.

Utilizou-se os antibióticos preconizados em casos de toxi-infecção alimentar e suas respectivas concentrações de acordo com o Manual Integrado de Vigilância, Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por Alimentos/ Ministério da Saúde (BRASIL, 2010): Meropenem - 10µg, Sulfonamida - 300µg, Enrofloxacin - 5µg, Doxiciclina - 30µg, Ciprofloxacina - 5µg, Cefepima - 30µg, Trimethoprim + Sulfametoxazol (Sulfazotrim) - 1,25/23,75µg, Gentamicina - 10µg, Florfenicol - 30µg, Cloranfenicol - 30µg, Amoxicilina + Ácido Clavulânico - 20/10µg.

Ao término da inoculação dos discos, as placas foram invertidas e incubadas em uma estufa a 37°C até a leitura em 24 horas com auxílio de paquímetro.

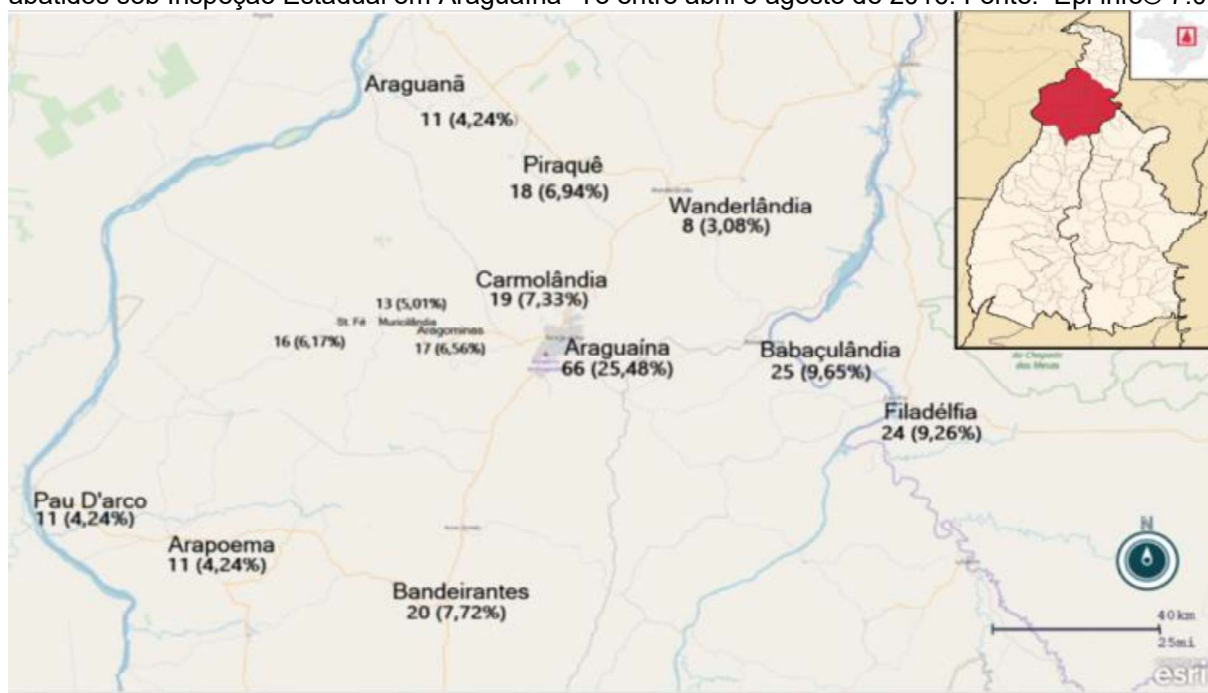
### **1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Dos 323 bovinos analisados nesse trabalho, foram isoladas 259 (80,2%) amostras de *E. coli* de fezes e rúmen. Quando subdividas, os valores por amostra

clínica respectivamente foram: 186 (57,6%) isoladas de fezes e 73 (22,60%) do conteúdo ruminal.

Quanto as frequências de isolados de *E. coli* município, Araguaína foi o Município com maior número de animais coletados e consequente maior frequência de *E. coli* 66 (25,48%), isto provavelmente devido à proximidade da unidade frigorífica, seguido por Babaçulândia 25 (9,65%) e Filadélfia 24 (9,26%) (figura 2).

Figura 2. Distribuição geográfica e frequência de *E. coli* i isoladas de fezes e rúmen de bovinos abatidos sob Inspeção Estadual em Araguaína -To entre abril e agosto de 2016. Fonte: Epi info® 7.0.



Um maior número de cepas de *E. coli* isoladas das fezes quando comparada com o conteúdo ruminal já era esperado, uma vez que estudos demonstram que o intestino delgado e grosso ainda são o local de maior persistência e proliferação deste patógeno (DURAND e MERRICK, 2006). Apesar de Armstrong, Hollingsworth e Morris (1996) afirmarem que havia indícios do rúmen ser local de predileção para *E. coli*.

O mecanismo pelo qual a *E. coli* consegue resistir ao desafio do ambiente ruminal ainda não está completamente elucidado (GRAUKE et al., 2003). Alguns estudos têm demonstrado que o rúmen é um compartimento relevante para estratégias de intervenção para limitar a sobrevivência de *E. coli* patogênica (CHAUCHEYRAS-DURAND et al., 2010).



Sabe-se que a expressão do gene *SdiA*, que possui a função de detectar N-Acyl homoserine lactones (AHLs ou N-AHLs), uma classe de moléculas de sinalização que permite comunicação entre bactérias, ativa a expressão dos genes de resistência ao ácido ruminal (SHENG et al., 2013).

A acidose ruminal sub-aguda (SARA) também pode contribuir para um aumento na proliferação deste patógeno, isto devido a produção de uma resposta inflamatória, que desencadeia um aumento na colonização de *E. coli* patogênicas e assim conseguem permanecer mesmo em pH baixo (KHAFIPOUR et al., 2011).

Em relação ao *perfil* de susceptibilidade das 259 amostra de acordo com o ponto de corte adotado de 75% de eficácia, os antibióticos que apresentaram resistência foram: sulfonamida 188 (72,59%), gentamicina 96 (37,07%), florfenicol 99 (38,22%), enrofloxacina 65 (25,10%), amx+ ácido clavulânico 86 (33,20%), e cefepime 71 (27,41%). Enquanto os antibióticos que inibiram o crescimento bacteriano foram: sulfazotrim 236 (91,12%), cloranfenicol 196 (75,68%), ciprofloxacina 179 (69,11%), doxiciclina 203 (78,38%), e meropenem 209 (80,69%), (Tabela 1).

Chamando atenção para resistência á gentamicina e ao cefepime. Obaidat et al. (2018) reportaram a gentamicina como escolha para tratamento de mastite em 42,4% dos casos e ceftiofour (cefalosporina de 3º geração) para metrite em 75% dos casos.

Por exemplo, em 2017 Hille et al., alertaram para a resistência de *E. coli* em bovinos para cefalosporina de terceira geração. Aqui encontramos resistência a cefalosporina de quarta geração, o que torna os resultados encontrados alarmantes.

Possivelmente devido ao cefepime ter sido a escolha clínica para tratamento por ser considerada estável a hidrólise de *E. coli* produtoras de AmpC  $\beta$ -Lactamases que não abrigam enzimas  $\beta$ -Lactamases de espectro estendido (ESBLs) ou carbapenemases que são capazes de hidrolisar tal fármaco (DONA et al., 2019).

Dos antibióticos que aqui apresentaram resistência, a gentamicina, enrofloxacina e amx + ácido clavulânico e cefepime estão na lista da OMS como criticamente importantes, e o florfenicol e sulfonamida na lista de antibióticos altamente importantes. Sendo estes de suma importância para medicina humana (WHO, 2019).

Quando subdivididos em materiais biológicos, os isolados de fezes

apresentaram perfil de multirresistência a 5 antibióticos: sulfonamida 132 (70,96%), gentamicina 64 (34,40%), florfenicol 61 (32,79%), ciprofloxacina 170 (91,39%) amoxicilina + ác. Clavulânico 55 (29,56%), e sensibilidade a 6 antibióticos: sulfazotrim 171 (91,93%), cloranfenicol 150 (80,64%), enrofloxacina 143 (76,88%), cefepime 146 (78,49%), doxiciclina 166 (89,24%) e meropenem 153 (82,25%) (tabela 1).

Para os isolados de conteúdo ruminal, houve multirresistência a 8 antibióticos: sulfonamida 56 (76,71%), gentamicina 32 (43,83%), florfenicol 38 (52,05%), cloranfenicol 27 (36,98%), enrofloxacina 22 (30,13%), amoxicilina + ác. Clavulânico 31 (42,46%), cefepime 29 (39,72%) e doxiciclina 23 (31,50%), e sensibilidade a 3 antibióticos: sulfazotrim 65 (89,04%), ciprofloxacina 64 (87,67%) e meropenem 60 (82,19%) (tabela 1).

E quando comparados os diferentes materiais biológicos, a diferença no perfil de resistência para isolados de fezes foi frente a ciprofloxacina 170 (91,39%), e para os do conteúdo ruminal ao cloranfenicol 25(34,24%), enrofloxacina 22(30,13%), cefepime 27(36,98%), e doxiciclina 24(32,87%) (tabela 1).

Tabela 1. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de *E. coli* isoladas de fezes e conteúdo ruminal de bovinos abatidos sob Inspeção Estadual em Araguaína- To no período de abril a agosto de 2016.

CLASSE/ ANTIBIÓTICO	FEZES		CONTEÚDO RUMINAL		TOTAL	
	*RES	*SEN	*RES	*SEN	*RES	*SENS
	**n/%	**n/%	**n/%	**n/%	**n/%	**n/%
<b>Sulfonamidas</b>						
SULF	132(70,96%)	54(29,03%)	56(76,71%)	17(23,28%)	188(72,59%)	71(27,41%)
SZT	15(8,06%)	171(91,93%)	8(10,95%)	65(89,04%)	23(8,88%)	236(91,12%)
<b>Aminoglicosídeo</b>						
GENT	64(34,40%)	122(65,59%)	32(43,83%)	41(56,16%)	96(37,07%)	163(62,93%)
<b>Anfenicóis</b>						
FLOR	61(32,79%)	125(67,20%)	38(52,05%)	35(47,94%)	99(38,22%)	160(61,78%)
CLOR	36(19,35%)	150(80,64%)	27(36,98%)	46(63,01%)	63(24,32%)	196(75,68%)
<b>Quinolonas</b>						
ENRO	43(23,11%)	143(76,88%)	22(30,13%)	51(69,86%)	65(25,10%)	194(74,90%)
CIPRO	170(91,39%)	16(8,60%)	9(12,36%)	64(87,67%)	179(69,11%)	80(30,88%)
<b>β- Lactâmico (Penicilina)</b>						
AMX + A.C	55(29,56%)	131(70,43%)	31(42,46%)	42(57,53%)	86(33,20%)	173(66,80%)
<b>β- Lactâmico (cefalosporina)</b>						
CEFEP	40(21,80%)	146(78,49%)	29(39,72%)	44(60,27%)	71(27,41%)	188(72,59%)
<b>Tetraciclina</b>						
DOX	20(10,75%)	166(89,24%)	23(31,50%)	50(68,49%)	56(21,62%)	203(78,38%)
<b>β- Lactâmico (carbapenêmico)</b>						
MERO	33(17,74%)	153(82,25%)	13(17,80%)	60(82,19%)	50(19,31%)	209(80,69%)

SULF= sulfonamidas; SZT= sulfazotrim; GENT= gentamicina; FLOR= florfenicol; CLOR=cloranfenicol; ENRO= enrofloxacina; CIPRO= ciprofloxacina; AMX= amoxicilina+ ácido clavulânico; CEFEP= cefepima; DOX= doxiciclina; MERO= meropenem. \*RES= resistente; \*SENS= sensível. \*\*n/%= número total de cepas e suas respectivas percentagens.

Os altos índices de resistência encontrados em isolados de conteúdo ruminal neste trabalho, superam os obtidos por Salem et al. (2018), onde os mesmos relataram susceptibilidade frente a diversos fármacos, incluindo cefalosporinas de terceira geração, ciprofloxacina, amoxicilina e gentamicina. E diferentemente dos resultados obtidos neste trabalho, os autores afirmam ainda que *E. coli* isoladas do conteúdo ruminal tendem a ser sensíveis à diversos antibióticos.

Chama atenção a multirresistência dos isolados d conteúdo ruminal à 8 antibióticos (sulfonamina, gentamicina, florfenicol, cloranfenicol, enrofloxacina, amoxicilina + ác. Clavulânico, cefepime e doxiciclina, que pode ser explicado pelo

rápido desenvolvimento de tolerância ácida por *E. coli* no ambiente ruminal que pode alterar também os padrões de susceptibilidade a antibióticos em decorrência da rápida aquisição e transferência de genes de resistência (IWERIEBOR et al., 2015).

Em isolados de fezes, chama a atenção a resistência ao antibiótico meropenem, uma vez que resistência a essa classe em bovinos é considerada rara, e que o desenvolvimento e disseminação de resistência desse antibiótico em bovinos tem graves implicações para as opções de tratamento em humanos (WEBB et al., 2016).

O que pode justificar a resistência em *E. coli* para tal antibiótico pode ser a transferência horizontal de gene de resistência, uma vez que há relatos da presença desses genes no filo Actinobacteria, natural da flora ruminal em bovinos (POIREL et al., 2012; EFSA, 2013).

Vale ressaltar que a resistência de *Enterobacteriaceae* ao meropenem consta na lista de prioridade de patógenos críticos definidos pela OMS, tendo em vista a importância clínica para humanos no tratamento de infecções graves que não respondem as demais classes de antibióticos (TACCONELLI et al., 2018).

Conforme a tabela 1, a sulfonamida, a gentamicina, o florfenicol, e amx+ ácido clavulânico foram os antibióticos que apresentaram comum resistência nos isolados dos materiais biológicos analisados.

A sulfonamida foi um dos primeiros antibióticos utilizados em larga escala no tratamento de infecções em humanos e animais de produção (AJEET, MISHRA e KUMAR, 2015).

Essa alta taxa (72,59%) obtida pode estar atrelada ao fato do uso contínuo durante décadas, e seu baixo custo para uso em animais (SKOLD, 2001). Além da facilidade de administração por ser via oral e por não ser de amplo espectro, ou seja, não causa alteração na microbiota ruminal (GÓRNIK e BERNADINI, 2002).

Em relação a gentamicina (37,07%), era esperado uma menor taxa de resistência em detrimento do alto custo. Alguns trabalhos obtiveram taxa de resistência em isolados de bovinos inferiores a 1% (SCHROEDER et al., 2002; GOW et al., 2008).

A resistência ao florfenicol por sua vez (38,22%), pode ser justificada por ser uma escolha comum utilizado no tratamento de doenças respiratórias em bovinos, e a resistência antimicrobiana vem aumentando significativamente (DAVIS et al., 2015; SNYDER et al., 2016). Nespolo et al. (2014) ao analisarem 52 isolados de bovinos

destinados ao abate obtiveram uma taxa de resistência a essa classe de apenas 1,92%. Diferente do observado em nosso estudo, possivelmente devido a características regionais relacionadas ao uso desse antibiótico. No entanto, a elevada frequência de resistência aqui encontrada alerta para a necessidade de um uso racional do mesmo, tendo em vista que esse antibiótico é a alternativa de substituição para bovinos após a proibição do uso do cloranfenicol.

Os resultados para amoxicilina + ácido clavulânico (33,20%) por sua vez estão de acordo com a literatura (BRENNAN et al., 2016).

Desde a sua introdução no mercado na década de 80, a amoxicilina tem sido amplamente utilizada em bovinos, com e sem a combinação de ácido clavulânico. O que tem contribuído para o aumento de resistência desse antibiótico em bovinos é a forma de uso massivo, ou seja, a administração do mesmo junto a alimentação ou até mesmo a água para todos os animais com a premissa de prevenir a propagação de doenças infecciosas no rebanho de forma rápida e eficaz (BELMAR-LIBERATO et al., 2011).

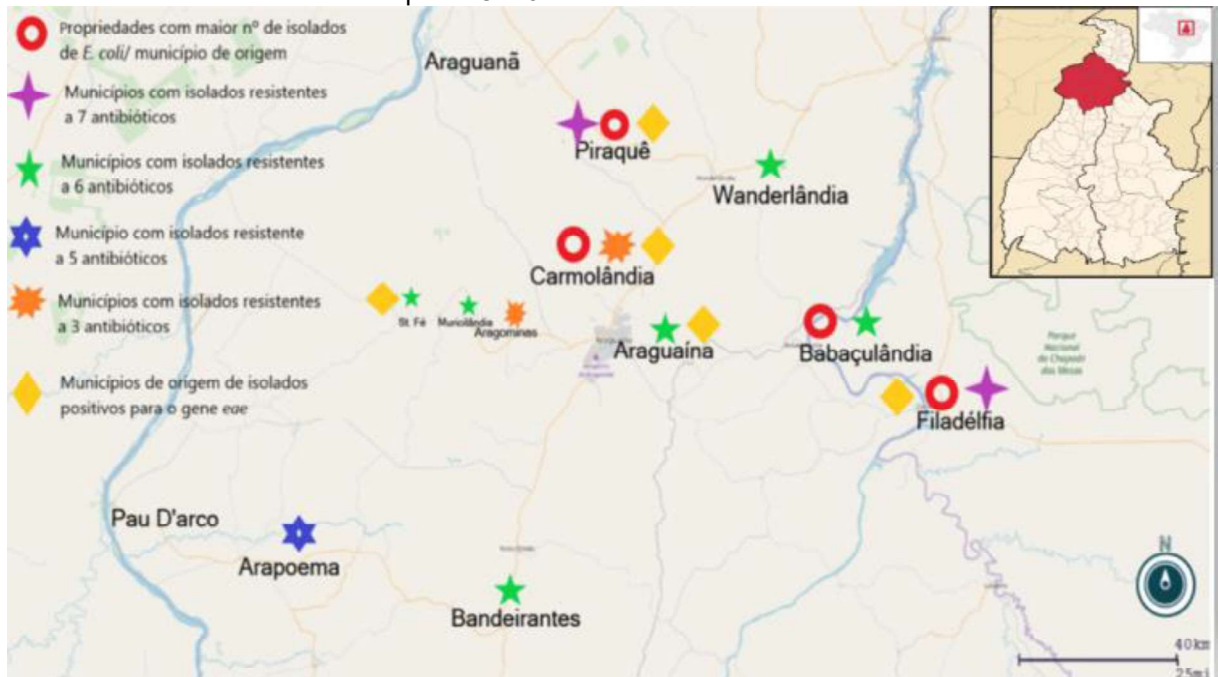
Além disso, é popularmente utilizado por produtores na forma intra-mamária no tratamento e prevenção de mastite em vacas (LIU et al., 2016).

Sendo que esse antibiótico faz parte da Lista Brasileira de Medicamentos essenciais, e amplamente prescrito para o tratamento de otite média e sinusite, e também indicado para o tratamento de infecções amígdalas, garganta, laringe, faringe, brônquios, pulmões e infecções da pele. Especialmente em crianças (DE MARCO et al., 2017).

No tocante a distribuição de *E. coli*, houveram propriedades com isolados apresentando multirresistencia. Uma cepa isolada de um animal oriundo de uma propriedade localizada no município de Piraquê apresentou multirresistência a 7 antibióticos (gentamicina, florfenicol, cloranfenicol, enrofloxacina, amoxicilina+ácido clavulânico, cefepime e meropenem). Outra amostra de um animal provindo do município de Babaçulândia apresentou resistência a 2 antibióticos (ciprofloxacina e sulfonamida), e uma outra propriedade localizada em Filadélfia a sulfazotrim e doxiciclina (Figura 3).

As demais propriedades se destacaram pelo maior número de cepas resistentes aos antibióticos enrofloxacina e ciprofloxacina (Dados não demonstrados).

Figura 3. Distribuição geográfica de isolados de *E. coli* positivos para o gene *eae* segundo o número de isolados resistentes. Fonte: Epi info® 7.0



Quanto a pesquisa de gene *rfb* O157:H7, não houveram amostras positivas para o mesmo. E quanto ao gene *eae* os 7 isolados ficaram distribuídos nos municípios de Araguaína com 3 isolados, e Piraquê, Carmolândia, Santa Fé e Filadélfia com 1 isolado cada (figura 3).

Ao analisarmos o perfil de susceptibilidade das 7 isolados de *E. coli* positivos para o gene *eae*, houve resistência a sulfonamida 7 (100%), gentamicina 3 (42,85%), cloranfenicol 2 (28,57%), enrofloxacina 3 (42,85%), amx+ ácido clavulânico 3 (42,85%) e meropenem 2 (28,57%); houve sensibilidade frente a sulfazotrim 7 (100%), florfenicol 6 (87,71%), ciprofloxacina 6 (87,71%), cefepime 6 (87,71%) e doxiciclina 6 (87,71%), (Tabela 2).

Quando subdivididos em materiais biológicos, os isolados de fezes apresentaram resistência a 8 antibióticos: sulfonamida 4 (100%), gentamicina, cloranfenicol, ciprofloxacina, cefepime com 1 (25%) cada, e enrofloxacina e meropenem com 2 (50%) cada; e foram sensíveis a sulfazotrim e doxiciclina com 4 (100%) cada (tabela 2).

Quanto aos isolados do conteúdo ruminal, houve multirresistência a 7 antibióticos: sulfonamida 3 (100%), gentamicina 2 (66,66%) e florfenicol, cloranfenicol, enrofloxacina e doxiciclina com 1 (33,33%) cada; e foram sensíveis a sulfazotrim, ciprofloxacina e meropenem com 3 (100%) cada (tabela 2).

E quando comparados os diferentes materiais biológicos, a diferença no perfil

de resistência para isolados de fezes foi frente a ciprofloxacina e cefepime, ambos com 1(25%), e meropenem 2(50%), e para isolados de conteúdo ruminal ao florfenicol e doxiciclina, ambos com 1(33,33%) (tabela 2).

E embora o conteúdo ruminal ainda não seja utilizado com frequência para o monitoramento de multirresistência, os isolados de conteúdo ruminal nesse trabalho positivos para gene *eae* apresentaram multiresistência a 7 antibióticos dos 11 testados, o que torna esse resultado um alerta para um contínuo monitoramento desse material clínico em bovinos destinados ao abate e intensificação de medidas preventivas durante o processamento da carcaça em frigoríficos.

Tabela 2. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de isolados de *E. coli* positivos para o gene *eae* de fezes e conteúdo ruminal de bovinos abatidos sob Inspeção Estadual em Araguaína- To no período de abril a agosto de 2016.

CLASSE/ ANTIBIÓTICO	FEZES		RÚMEN		TOTAL	
	*RES	*SEN	*RES	*SEN	*RES	*SENS
	**n/%	**n/%	**n/%	**n/%	**n/%	**n/%
<b>Sulfonamidas</b>						
SULF	4(100%)	0	3(100%)	0	7(100%)	0
SZT	0	4(100%)	0	3(100%)	0	7(100%)
<b>Aminoglicosídeo</b>						
GENT	1(25%)	3(75%)	2(66,66%)	1(33,33%)	3(42,85%)	4(52,14%)
<b>Anfenicóis</b>						
FLOR	0	4(100%)	1(33,33%)	2(66,66%)	1(14,28%)	6(87,71%)
CLOR	1(25%)	3(75%)	1(33,33%)	2(66,66%)	2(28,57%)	5(71,42%)
<b>Quinolonas</b>						
ENRO	2(50%)	2(50%)	1(33,33%)	2(66,66%)	3(42,85%)	4(52,14%)
CIPRO	1(25%)	3(75%)	0	3(100%)	1(14,28%)	6(87,71%)
<b>β- Lactâmico (Penicilina)</b>						
AMX	2(50%)	2(50%)	1(33,33%)	2(66,66%)	3(42,85%)	4(52,14%)
<b>β- Lactâmico (cefalosporina)</b>						
CEFEP	1(25%)	3(75%)	0	3(100%)	1(14,28%)	6(87,71%)
<b>Tetraciclina</b>						
DOX	0	4(100%)	1(33,33%)	2(66,66%)	1(14,28%)	6(87,71%)
<b>β- Lactâmico (carbapenêmico)</b>						
MERO	2(50%)	2(50%)	0	3(100%)	2(28,57%)	5(71,42%)

SULF= sulfonamidas; SZT= sulfazotrim; GENT= gentamicina; FLOR= florfenicol; CLOR=cloranfenicol; ENRO= enrofloxacina; CIPRO= ciprofloxacina; AMX= amoxicilina+ ácido clavulânico; CEFEP= cefepima; DOX= doxiciclina; MERO= meropenem. \*RES= resistente; \*SENS= sensível. \*\*n/= número total de cepas e suas respectivas percentagens.

A dispersão do perfil de multirresistência de isolados positivos para gene *eae* está disposto no gráfico 1. Onde um isolado de fezes oriundo de Santa Fé e outro isolado de conteúdo ruminal de bovino de Araguaína se destacaram por apresentar multirresistência a 7 antibióticos (Gráfico 1).

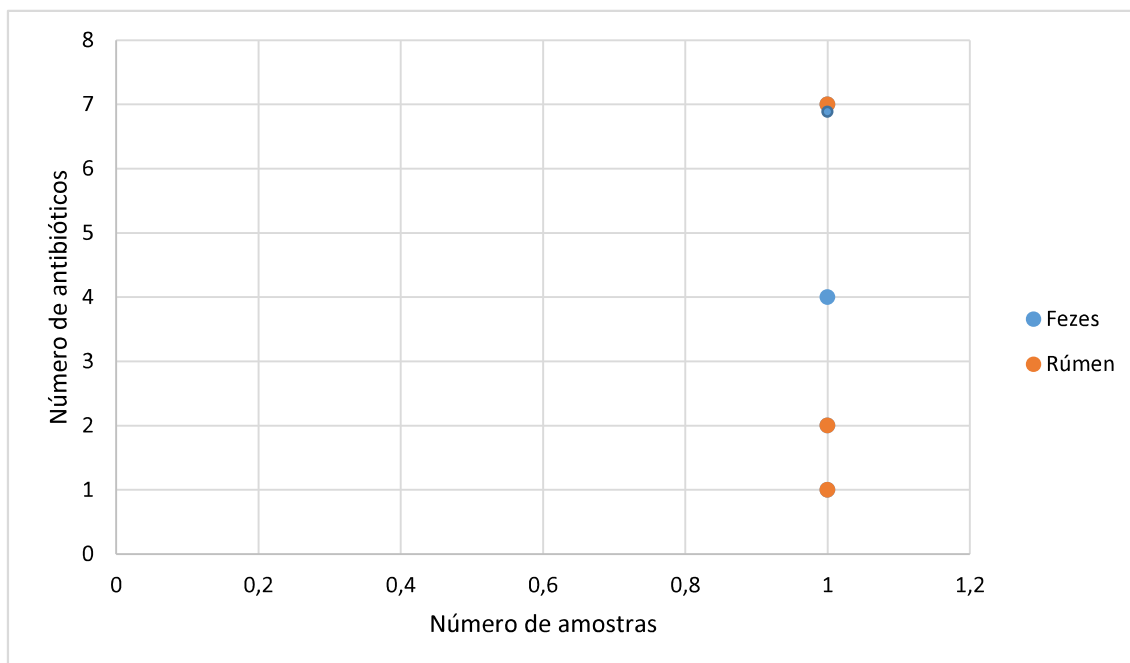


Gráfico 1. Perfil de multirresistência de isolados positivos para gene *eae*. de fezes e conteúdo ruminal de bovinos abatidos sob Inspeção Estadual em Araguaína- To no período de abril a agosto de 2016.

O resultado positivo para o gene *eae* 2,70% (7/259) está acima do obtido por Vu-khac e Cornick (2008), que ao avaliarem 568 animais, não detectaram a presença de tal gene em nenhum isolado de bovino. Ju et al. (2012) ao avaliarem 480 amostras carne bovina em Washington também não detectaram a presença do gene em questão.

Em contrapartida, o nosso resultado foi menor do que o encontrado por Bolton, Ennis e McDowel (2014), que ao avaliarem 480 amostras fecais de bovinos no norte da Irlanda, obtiveram 5,8% de isolados positivos para *eae*. Os autores enfatizam ainda que os bovinos são uma potencial fonte de aEPEC (EPEC atípica), e que dados epidemiológicos acerca dessa categoria em bovinos ainda são limitados.

O perfil de resistência aqui encontrado supera os dos autores supracitados, onde os mesmos relataram resistência apenas para kanamicina, estreptomicina, ácido nadixílico e sulfonamidas.

Khider e Buyukcangaz (2018) analisaram 111 amostras fecais de bovinos



detectaram a presença do gene *eae* em apenas uma amostra 1 (0,9%). Os mesmos autores relatam que essa única amostra positiva para tal gene foi resistente a enrofloxacina, sulfazotrim, amx+ ácido clavulânico. Multirresistência que também registramos neste estudo, com acréscimo dos antibióticos tetraciclina e ampicilina.

#### 1.4 CONCLUSÃO

As taxas de resistência encontradas neste trabalho colocam em alerta o uso de antibióticos na produção de bovinos principalmente em 12 Municípios (Babaçulândia, Piraquê, Aragominas, Arapoema, Carmolândia, Filadélfia, Santa Fé, Araguaína, Bandeirantes, Muricilândia, Araguanã e Wanderlândia) dos 13 avaliados. Há necessidade de uma normatização para garantir uma utilização mais racional dos antibióticos na linha veterinária, uma vez que são utilizados vários grupos de antibióticos de importância para saúde humana.

A sulfonamida foi o antibiótico com maior frequência de resistência em ambos materiais biológicos e em todos os 13 Municípios apresentaram frequência de resistência superior a 25%, e embora os isolados do conteúdo ruminal tenha sido em menor número, este material clínico apresentou um maior perfil de multirresistência quando comparado com os isolados de fezes.

A frequência de amostras positivas para o gene *eae* foi superior a observada em outras localidades no Brasil e próxima a encontrada em países do continente Europeu, sendo este o primeiro registro do gene *eae* em *E. coli* de bovinos isoladas no Tocantins. O perfil de multirresistência delas também foi maior (6 antibióticos). Houve diferença no perfil de susceptibilidade entre os materiais biológicos. Onde os isolados de fezes apresentaram um maior perfil de multirresistência (8) quando comparados com os de conteúdo ruminal (7).

Não foi possível detectar a presença do gene *rfb* O157:H7 nos isolados de *E. coli* nesse trabalho.

Estudos como esse são de extrema importância para o monitoramento fármaco-epidemiológico regional. Outros genes devem ser pesquisados para elucidar quais os mais frequentes em amostras clínicas semelhantes a este trabalho.

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F.M. The livestock reservoir for antimicrobial resistance: a personal view on changing patterns of risks, effects of interventions and the way forward. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 370, n. 1670, p. 20140085, 2015.

AJEET, A.; MISHRA, A.K.; KUMAR, A. Recent Advances in Development of Sulfonamide Derivatives and Their Pharmacological Effects-A Review. **American Journal of Pharmacological Sciences**, v. 3, n. 1, p. 18-24, 2015.

ANDRADE, G.I. et al. Pcr multiplex para determinação de marcadores de virulência em *Escherichia coli* isoladas de bovinos com diarreia em minas gerais. **Ciência Animal Brasileira**, p. 436-441, 2009.

ARMSTRONG, G. L.; HOLLINGSWORTH, J.; MORRIS J.G. Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* 0157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. **Epidemiologic Reviews**, Baltimore, v. 18, n. 1, p. 29-51, 1996.

ADZITEY, F.; SABA, C.K.S.; GABRIEL, A. T. Antibiotic susceptibility of *Escherichia coli* isolated from milk and hands of milkers in Nyankpala community of Ghana. **Curr. Res. Dairy Sci**, v. 8, p. 6-11, 2016.

BELMAR-LIBERATO, R. et al. Amoxicillin and amoxicillin-clavulanic acid resistance in veterinary medicine—the situation in Europe: a review. **Veterinarni Medicina**, v. 56, n. 10, p. 473-485, 2011.

BOLTON, D. J.; ENNIS, C.; MCDOWELL, D. Occurrence, Virulence Genes and Antibiotic Resistance of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from Twelve Bovine Farms in the North-East of Ireland. **Zoonoses and public health**, v. 61, n. 2, p. 149-156, 2014.

BRASIL. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017 d, Artº 17. **Regulamenta Inspeção Industrial Sanitária de Produtos de Origem Animal (Riispoa)**. Brasília 2017. Disponível em : <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2015-2018/2017/decreto/D9013.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2017/decreto/D9013.htm)>. Acesso em 20 agosto 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 41, de 23 de outubro de 2017 c. **Institui o Programa Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos na Agropecuária – AgroPrevine**. Brasília, 2017. Disponível em:< <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/programas-especiais/resistencia-antimicrobianos/agroprevine>>. Acessado em: 26 dez. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instrução normativa de nº 205, de 17 de fevereiro de 2016. **Define a lista nacional de doenças e agravos, na forma do anexo, a serem monitorados por meio da estratégia de vigilância em unidades sentinelas e**

**suas diretrizes.** Disponível em:< <https://central3.to.gov.br/arquivo/296834/>>. Acesso em 20 agosto 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Morbidade Hospitalar do SUS (SIH/SUS).** Brasília, 2017 a. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def>. Acesso em 20 agosto 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Situação epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos - DTA.** Brasília, 2017 b. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/653-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/doencas-transmitidas-por-alimentos-dta/11220-situacao-epidemiologica-dados>>. Acesso em 20 agosto 2018.

BRENNAN, E. et al. Multidrug-resistant *Escherichia coli* in bovine animals, Europe. **Emerging infectious diseases**, v. 22, n. 9, p. 1650, 2016.

BYWATER, R. et al. A European survey of antimicrobial susceptibility among zoonotic and commensal bacteria isolated from food-producing animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 4, p. 744-754, 2004.

CASTRO, V.S. et al. Shiga-Toxin Producing *Escherichia Coli* in Brazil: A Systematic Review. **Microorganisms**, v. 7, n. 5, p. 137, 2019.

CHAUCHEYRAS-DURAND, F. et al. Fates of acid-resistant and non-acid-resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in ruminant digestive contents in the absence and presence of probiotics. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 76, n. 3, p. 640-647, 2010.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. M100- S22, v.32, n.3, 2012.

COSTA, A.R.F. et al. Desenvolvimento de PCR multiplex para detecção e diferenciação de categorias de *Escherichia coli* diarreiogênicas. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, p. 77-84, 2010.

DAVIS, M.A. et al. Recent emergence of *Escherichia coli* with cephalosporin resistance conferred by bla CTX-M on Washington State dairy farms. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 81, n. 13, p. 4403-4410, 2015.

DE MARCO, B.A. et al. Characteristics, properties and analytical methods of amoxicillin: a review with green approach. **Critical reviews in analytical chemistry**, v. 47, n. 3, p. 267-277, 2017.

DONA, V. et al. Gradual In Vitro Evolution of Cefepime Resistance in an ST131 *Escherichia coli* strain expressing a plasmid-encoded CMY-2  $\beta$ -lactamase. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1311, 2019.

DURAND, A.; MERRICK, M. In vitro analysis of the *Escherichia coli* AmtB-GlnK complex reveals a stoichiometric interaction and sensitivity to ATP and 2-

oxoglutarate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 40, p. 29558-29567, 2006.

EFSA PANEL ON BIOLOGICAL HAZARDS (BIOHAZ). Scientific Opinion on Carbapenem resistance in food animal ecosystems. **EFSA Journal**, v. 11, n. 12, p. 3501, 2013.

GÓRNIAK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 3. ed. São Paulo: Guanabara Koogan.p. 558-573, 2002.

GOW, S. P. et al. Prevalence of antimicrobial resistance in fecal generic *Escherichia coli* isolated in western Canadian beef herds. Part II—Cows and cow-calf pairs. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 72, n. 2, p. 91, 2008.

GRAUKE, L. J. et al. Acid resistance of *Escherichia coli* O157: H7 from the gastrointestinal tract of cattle fed hay or grain. **Veterinary microbiology**, v. 95, n. 3, p. 211-225, 2003.

GUEDES S.L; BRITO, J.L.S. Caracterização socioeconômica da microrregião geográfica de Araguaína (TO). **Observatorium: Revista Eletrônica de Geografia**, v. 6, n. 17, 2014.

HILLE, K. et al. Cefotaxime-resistant *E. coli* in dairy and beef cattle farms—joint analyses of two cross-sectional investigations in Germany. **Preventive veterinary medicine**, v. 142, p. 39-45, 2017.

HUNGATE, R.E. **The rumen and its microbes**. United States, Academic Press., 1966.533 p, 1966.

IWERIEBOR, B. C. et al. Resistência múltipla a antibióticos entre *Escherichia coli* O157 produtora de toxina Shiga nas fezes de fazendas de gado leiteiro no Cabo Oriental da África do Sul. **Microbiologia BMC**, v. 15, n. 1, p. 213, 2015.

JU, W. et al. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in retail ground beef and pork in the Washington DC area. **Food microbiology**, v. 32, n. 2, p. 371-377, 2012.

KHAFIPOUR, E. et al. Population structure of rumen *Escherichia coli* associated with subacute ruminal acidosis (SARA) in dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 1, p. 351-360, 2011.

KHIDER, M.; BUYUKCANGAZ, E. Pathogenic *Escherichia coli* detected in food producing ruminants in turkey. **Fresenius environmental bulletin**, v. 27, n. 1, p. 110-115, 2018.

LAMBRECHT, E. et al. Characterization of cefotaxime-and ciprofloxacin-resistant commensal *Escherichia coli* originating from Belgian farm animals indicates high antibiotic resistance transfer rates. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 6, p. 707-717, 2018.

LANDERS, T.F. et al. A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential. **Public health reports**, v. 127, n. 1, p. 4-22, 2012.

LIU, Y. et al. Simultaneous detection and comparative pharmacokinetics of amoxicillin, clavulanic acid and prednisolone in cows' milk by UPLC–MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 1008, p. 74-80, 2016.

MCDANIELS, A. E. et al. Confirmational identification of *Escherichia coli*, a comparison of genotypic and phenotypic assays for glutamate decarboxylase and beta-D-glucuronidase. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, n. 9, p. 3350-3354, 1996.

MOUTON, J.W. et al. The role of pharmacokinetics/pharmacodynamics in setting clinical MIC breakpoints: the EUCAST approach. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. E37-E45, 2012.

NESPOLO, N M. et al. Ocorrência de *Escherichia coli* O157: H7 e O26 sorbitol negativas em matadouro frigorífico de bovino e suscetibilidade a antimicrobianos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 3, p. 209-217, 2014.

OBAIDAT, M.M. et al. Major diseases, extensive misuse, and high antimicrobial resistance of *Escherichia coli* in large-and small-scale dairy cattle farms in Jordan. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 3, p. 2324-2334, 2018.

ONU, **World Antibiotic Awareness Week 2018- Think Twice**. Seek Advice. Disponível em: <<https://www.who.int/antimicrobial-resistance/en/>>. Acessado em: 25 mar. 2019.

PANTON, A. W.; PATON, J. C. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfbO111, and rfbO157. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 598-602, 1998.

POIREL, L. et al. Acinetobacter spp. produtor de carbapenemases. em gado, França. **Doenças infecciosas emergentes**, v. 18, n. 3, p. 523, 2012.

RASMUSSEN, M.A. et al. Rumen contents as a reservoir of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 114, n. 1, p. 79-84, 1993.

RUSSELL, J. B.; DIEZ-GONZALEZ, F.; JARVIS, G. N. Invited review: effects of diet shifts on *Escherichia coli* in cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 4, p. 863-873, 2000.

SALEHI, T. Z.; BONAB, S. Farashi Antibiotics Susceptibility Pattern of *Escherichia coli* Strains Isolated from Chickens with Colisepticemia in Tabriz Province, Iran. **International Journal of Poultry Science**, v. 5, n. 7, p. 677-684, 2006.

SALEM, A.Z.M et al. Susceptibility of ruminal bacteria isolated from large and small ruminant to multiple conventional antibiotics. **Microbial pathogenesis**, v. 121, p. 93-99, 2018.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootécnica, 265 p., 2002.

SCHROEDER, C. M. et al. 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.

SHENG, H. et al. SdiA aids enterohemorrhagic *Escherichia coli* carriage by cattle fed a forage or grain diet. **Infection and immunity**, v. 81, n. 9, p. 3472-3478, 2013.

SINGH, P. et al. Characterization of enteropathogenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle and deer in a shared agroecosystem. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 5, p. 29, 2015.

SKÖLD, O. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. **Veterinary research**, v. 32, n. 3-4, p. 261-273, 2001.

SNYDER, E. et al. Prevalence of multi drug antimicrobial resistance in *Mannheimia haemolytica* isolated from high-risk stocker cattle at arrival and two weeks after processing 1. **Journal of animal science**, v. 95, n. 3, p. 1124-1131, 2016.

TACCONELLI, E. et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **Lancet Infectious Diseases**. v.18, n.3, p. 318–327, 2018.

VIEIRA, A.R. et al. Association between antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from food animals and blood stream isolates from humans in Europe: an ecological study. **Foodborne pathogens and disease**, v. 8, n. 12, p. 1295-1301, 2011.

VU-KHAC, H.; CORNICK, N. A. Prevalence and genetic profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from buffaloes, cattle, and goats in central Vietnam. **Veterinary Microbiology**, 126(4), 356-363., 2008.

WASYL, D. et al. Antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* isolated from animals at slaughter. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 221, 2013.

WEBB, H.E. et al. Carbapenem-resistant bacteria recovered from faeces of dairy cattle in the high plains region of the USA. **PloS one**, v. 11, n. 1, p. e0147363, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Report of the 6rd meeting of the WHO advisory group on integrated surveillance of antimicrobial resistance, Oslo, Norway**. World Health Organization, 2019.

### **Capítulo 3. Distribuição microrregional e susceptibilidade antimicrobiana de *Escherichia coli* O157:H7 e EPEC isoladas de bovinos no município de Araguaína-TO.**

#### **RESUMO**

Os bovinos são sabidamente considerados reservatórios de *E. coli* O157:H7, no entanto, pouco se sabe a respeito da *Escherichia coli* (*E. coli*) enteropatogênciã nessa espécie animal. O rápido e crescente aparecimento de multirresistência para essa espécie de bactéria, é um grave problema de saúde pública global. Desta forma foram realizados testes de aglutinação direta frente aos anti-soros disponibilizados no comércio de 259 isolados de *E. coli* de origem fecal e conteúdo ruminal de bovinos destinados ao abate na microrregião de Araguaína-TO. Foi realizado o teste de aglutinação direta frente aos anti-soros O157:H7, EPEC (A, B e C) e EIEC (A e B). As amostras positivas e negativas frente aos anti-soros foram submetidas ao teste de susceptibilidade antimicrobiana por disco- difusão. Em relação a sorologia, 149 das mostrãas foram positivas frente aos anti-soros O157:H7 e EPEC. Das quais, 22 das amostras foram positivas para o anti-soro O157:H7 e 127 positivas para o anti-soro EPEC (A, B e C), no qual o sorogrupo B foi o que apresentou maior número de positivos 86, e 110 amostras foram negativas frente ao teste de sorologia. Os isolados positivos frente ao anti-soro O157:H7 apresentaram multirresistência a 9 antibióticos, sendo eles: sulfonamida 18, gentamicina 14, florfenicol 10, cloranfenicol 8, enrofloxacina 11, amx + ácido clavulânico 12, cefepime 8, doxiciclina 12 e meropenem 6. Quando analisados os isolados positivos frente ao soro anti EPEC, todos os sorogrupos (A, B e C) em ambos materiais biológicos apresentaram resistênciã a sulfonamida 41 e gentamicina 78. As amostras negativas frente aos anti-soros testados também apresentaram perfil de multirresistência a sulfonamida 84, gentamicina 33, florfenicol 45, amx+ ácido clavulânico 74 e cefepime 32. Os resultados obtidos através da técnica de aglutinação direta utilizada, sugerem bovinos como potencial reservatório da categoria EPEC. O perfil de multirresistência para os isolados é um alerta para a necessidade do uso racional de antibióticos na produção de bovinos destinados ao consumo humano no município de Araguaína- TO.

**Palavras-chave:** bactérias patogênciãas, sorologia, resistênciã, ruminantes

**Capther 3. Microregional distribution and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* O157: H7 and EPEC isolated from cattle in the municipality of Araguaína-TO.**

**ABSTRACT**

Cattle are known to be the reservoirs of O157: H7; however, they may be an enteropathogenic *E. coli* animal in this animal species. The rapid and growing appearance of multidrug resistance for this type of bacteria is a serious global public health problem. Thus, over the years of study, a set of fecal and direct deformation tests for cattle, with the objective of correcting the infection by Araguaína-TO microorganisms. O157: H7, EPEC (A, B and C) and EIEC (A and B). Positive and negative samples against antisera were submitted to antimicrobial susceptibility test by disk diffusion. Regarding serology, 149 of the samples were positive for O157: H7 and EPEC antisera. Which, 22 were positive for O157: H7 antiserum and 127 positive for EPEC antiserum (A, B and C), in which serogroup B is more than positive 86, and 110 were negative compared to serology test. Those positive for O157: H7 multiresistant antisera to 9 antibiotics, namely: sulfonamide 18, gentamicin 14, florfenicol 10, chloramphenicol 8, enrofloxacin 11, amx + clavulanic acid 12, cefepime 8, doxycycline 12 and meropenem 6. When What is a positive factor for anti-epileptic serum, all serogroups (A, B, and C) are different from antisera, gentamicin 33, florfenicol 45, amx + clavulanic acid 74 and cefepime 32. The results obtained through the direct agglutination technique used are considered as potential reservoirs of the EPEC category. The multiresistance profile in cattle production at the same time is necessary for the rational use of antibiotics.

**Key words:** pathogenic bacteria, resistance, ruminants, serology,



## 1. INTRODUÇÃO

*Escherichia coli* (*E. coli*) é uma bactéria Gram-negativa oxidase negativa pertencente a família Enterobacteriaceae, com capacidade de crescimento tanto aerobicamente quanto anaerobicamente (CROXEN et al., 2013).

Sua membrana é composta por lipossacarídeos (LPS), oligossacarídeos e um polissacarídeo único, denominado de antígeno O, que refletem diretamente na virulência e interação patógeno-hospedeiro (SARKAR et al., 2014).

A carne bovina quando contaminada, é considerada uma das principais formas de disseminação de *E. coli* e consequente transmissão aos consumidores da carne bovina embora medidas sanitárias em frigoríficos tenham a finalidade de reduzir a contaminação por *E. coli*, ainda sim essa bactéria representa risco a saúde do consumidor (ATNAFIE et al., 2017).

A principal forma de contaminação de carcaças bovinas por *E. coli* se dá através das fezes (quando há rupturas indesejadas no trato gastrointestinal das carcaças durante o abate), sendo este um potencial meio de disseminação desse patógeno (RUSSEL; DIEZ- GONZALEZ; JAVIS, 2000; NESPOLO et al., 2014).

A identificação de *E. coli* patogênicas isoladas em indústrias frigoríficas é frequentemente realizada pelo teste de aglutinação direta, uma prática comum desde a década de 70 (ANDERSON; BAIRD-PARKER, 1975). No entanto, em meados de 2001, surgiram as primeiras recomendações acerca da confiabilidade desse tipo de teste para confirmação de categorias patogênicas dessa espécie bacteriana (CHART; JENKINS, 2001).

A técnica de aglutinação direta consiste em utilizar anticorpos para testar antígenos de superfície: O (somáticos), H (flagelares) e K (capsulares). Sendo que há aproximadamente 186 grupos O diferentes e 53 H, o que torna a sorotipagem por essa técnica bastante complexa, tendo em vista a heterogenicidade genética dessa espécie (SMITH; FRATAMICO; GUNTHER, 2015).

Os laboratórios de referência levam semanas para concluir a sorotipagem de *E. coli*, realizando uso de múltiplos grupos de soros policlonais para antígenos O e H, e com testes com anti-soros individuais. Porém, existem pequenas variações na especificidade dos lotes ou reatividade cruzada, que podem afetar na reprodutibilidade, limitando dessa forma tal técnica (FENG e REDDY, 2014).

No entanto, em laboratórios de microbiologia de rotina, os isolados caracterizados como *E. coli* são tradicionalmente rastreados por ensaio de

aglutinação direta usando os soros contra os principais sorogrupos. Isto porque esse é ainda considerado um método prático e fácil de se executar, onde a principal vantagem é a disponibilidade comercial dos soros (GOMES et al., 2016).

Desta forma, a não eficácia e rapidez dos métodos para identificação de *E. coli* patogênicas que auxiliem na resposta a surtos alimentares envolvendo carne bovina, são considerados pontos críticos para a saúde pública (PATEL et al., 2016).

Outro ponto importante a ser abordado é a disseminação de resistência bacteriana de *E. coli* tendo a carne bovina como veículo. Atualmente, sabe-se que aproximadamente 80% do consumo de antibióticos mundialmente é utilizado na linha veterinária, com principal enfoque para bovinos. Sendo o monitoramento da resistência um importante passo para o desenvolvimento de estratégias para erradicar tal problema (OMS,2017).

Tendo em vista a relevância do tema, o objetivo do presente estudo foi a identificação de *E. coli* isoladas de fezes e conteúdo ruminal de bovinos abatidos sob Inspeção Estadual na microrregião de Araguaína-TO, através da técnica de sorologia com anti-soros disponibilizados no mercado, assim como o perfil de susceptibilidade antimicrobiana frente aos principais fármacos utilizados atualmente no tratamento de toxiinfecções alimentares.

## **1.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **1.2.1 Declaração de ética**

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Tocantins, com número de protocolo nº 23101.003806/2016-92.

### **1.2.2 Delineamento estatístico**

O tamanho da amostra foi definido considerando-se o número médio de animais abatidos na unidade frigorífica por ano (2000 animais), uma prevalência esperada de 50% e erro de 5%. O cálculo foi realizado utilizando o programa Epi info ® versão 7.0 disponibilizado pelo CDC.

O valor da amostra mínima calculada foi de 323 animais. E a coleta das mesmas foram realizadas de forma a contemplar os 13 municípios, sendo eles: Araguaína, Babaçulândia, Filadélfia, Wanderlândia, Bandeirantes, Carmolândia,

Piraquê, Santá Fé, Muricilândia, Aragominas, Arapoema, Pau D'arco e Araguaína) que compõe a microrregião de Araguaína-To (Figura 1).

As respostas qualitativas foram analisadas pelo teste não paramétricos de qui-quadrado ( $X^2$ ) a 5%, com correção de Yates (SAMPAIO,2002). Utilizou-se o programa estatístico Epi-info versão, 7.0, as associações foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

Para análise de eficácia (sensibilidade) dos antibióticos baseou-se no critério adotado por Salehi e Bonab (2006) e Adzitey, Saba e Gabriel (2016), para que um antibiótico seja eficiente deve apresentar a frequência mínima de sensibilidade a partir do ponto de corte de 75%.

Figura 4. Mapa microrregião Araguaína e os respectivos Municípios coletados nesse estudo. Fonte: Epi Info® 7.0.



Figura 1. Mapa microrregião Araguaína com os municípios em que foram realizadas as coletas. Fonte: Guedes e Brito 2014.

### 1.2.3 Coleta das amostras

As amostras foram coletadas de fêmeas predominantemente aneladas em abatedouro-frigorífico localizado no município de Araguaína-TO (7°11'28" de latitude, 48°12' 26" de longitude) registrado sob SIE (BRASIL, 2017d).

Foram recolhidas amostras fecais através de suabe retal na linha de abate após às manobras de incisão perianal para liberação desta extremidade do trato digestivo e oclusão do reto, utilizando suabe estéril.

Para as porções do conteúdo ruminal foram recolhidas aproximadamente 1 g do conteúdo ruminal de cada bovino imediatamente após processo de evisceração durante o abate de acordo com Hungate (1966). Com o auxílio de um colaborador com mãos enluvadas, o rúmen era seccionado em sua porção inferior para possibilitar a colheita do conteúdo ruminal.

Ambos materiais biológicos foram acondicionados em tubos plásticos estéreis com solução PBS (Tampão Fosfato-salino pH 8) na concentração 1X e armazenados sob refrigeração em caixa isotérmica.

As amostras então foram encaminhadas em caixas isotérmicas para o laboratório de Higiene e Saúde Pública da Escola de Medicina veterinária e Zootecnia da Universidade Federal do Tocantins (UFT/EMVZ) em um prazo máximo de duas horas do momento da coleta.

#### 1.2.4 Isolamento e identificação de *Escherichia coli*

Após transportadas para o laboratório, 0,1 mL de cada amostra foi transferida para tubos contendo 10 mL de caldo selenito cistina (CS) - Himedia®. A incubação dos tubos foi realizada a 37°C por 24h (OLIVEIRA et al., 2004).

A partir do crescimento em CS foram realizadas semeadura por técnica de esgotamento superficial em placas com Ágar Macconkey (MC) - Merck® e incubadas a 37° C por 24h.

As colônias que apresentavam características típicas de *E. coli* de acordo com as recomendações do fabricante foram semeadas em ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) - Himedia®, incubados a 37°C por 24h, verificando-se as reações típicas para *E. coli*. Culturas suspeitas foram submetidas as provas bioquímicas adicionais (indol - Himedia®, vermelho de metila - Himedia®, citrato - Himedia®, ureia - Himedia®, glicose - Himedia®, lactose - Himedia® e sacarose - Himedia®).

Em seguida, as amostras foram estocadas em ágar nutriente Himedia® e mantidas por tempo indeterminado a 8° C até posteriores análises.

#### 1.2.5 Forma de preparo das amostras

Para a extração do DNA foi utilizado o protocolo de termo extração proposto por Andrade et al. (2009). Onde o crescimento bacteriano obtido do ágar Brain Heart Infusion (BHI) foi transferido com auxílio de suabe para microtubos com 1000 µL de água destilada ultrapura - Sigma® e submetidas a 100 °C por 10 min em banho seco, e centrifugadas a 12.000 G por 10 minutos, recuperando o sobrenadante.

#### 1.2.6 Diagnóstico molecular de *Escherichia coli*

Para confirmação genética das amostras identificadas como *E. coli* nas provas bioquímicas, foi utilizado o primer para o gene *uidA* por meio da PCR de acordo com Mcdaniels et al. (1996), como controle positivo foi utilizada a amostra de referência ATCC 25922.

Para o gene pesquisado, foi preparado *mix* individual contendo: 5X solução tampão (Buffer IVB - PHneutria®); dNTPs (10 mM); *primer* F (20 pMol/µL); *primer* R (20 pMol/µL), o oligonucleotídeos utilizados estão descritos no quadro 2; *Taq* polimerase DNA (1 UNID); DNA teste (50 nM a 200 nM). O primer específico utilizado para detecção do gene *uidA* foi: '5-CCAAAAGCCAGACAGAGT-3' e '5-GCACAGCACATCCCCAAAGAG- 3'. Com tamanho de pares de base de 623 e 58° de temperatura de anelamento.

#### 1.2.7 Sorologia

Os isolados foram submetidos ao teste de aglutinação em lâmina com anti-soro polivalentes para sorogrupos *E. coli* enteropatogênica (EPEC) A (O26, O55, O111 e O119), B (O114, O125, O142 e O158) e C (O86, O126, O127 e O128), *E. coli* enteroinvasora, A e B (EIEC) e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), segundo instruções do fabricante - Probac®.

#### 1.2.8 Antibiograma

Para os testes de susceptibilidade a antibióticos as amostras estocadas em ágar nutriente foram repicadas em ágar MacConkey/BHI - Merck® e incubadas a 37°C por 24h para o devido crescimento e obtenção de colônias isoladas. Após este procedimento 1 a 3 colônias foram transferidas para 2mL de caldo Mueller Hinton - Kasvi®. A cultura em caldo foi incubada em estufa a 37°C até alcançar o grau de turbidez de uma solução padrão de McFarland a 0,5 (aproximadamente 10<sup>8</sup>

microrganismos/mL). Esse processo foi realizado para cada amostra de *E. coli* pesquisada. A realização do antibiograma e sua interpretação seguiu a metodologia proposta por CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2012) por meio da técnica Kirby Bauer. Para controle de qualidade e confiabilidade dos resultados obtidos, foi utilizada a cepa de referência *E. coli* ATCC 25922.

Posterior à incubação, cada uma das culturas em caldo foi inoculada individualmente em placa de Petri (150x20 mm) contendo o meio ágar Mueller Hinton - Kasvi®. O procedimento consiste em mergulhar um suabe de algodão estéril na suspensão, em até 15 min após atingir o grau de turbidez esperado. Foi eliminado o excesso de inoculo no suabe e distribuído o restante em toda a superfície da placa.

Para o teste de susceptibilidade a antibióticos, os discos de teste foram depositados na placa semeada e os resultados obtidos pela mensuração do diâmetro dos halos de inibição formado (incluindo o diâmetro do disco) em milímetro, com auxílio de um paquímetro. As amostras foram classificadas em sensíveis, intermediárias ou resistentes aos antibióticos testados, de acordo com a tabela proposta pelo fabricante (Sensifar - Cefar®, anexo 1), para efeito de resultados, consideraram-se apenas as categorias sensíveis e resistentes, nesta última, contabilizaram-se os resultados de intermediários e resistentes.

Utilizou-se os antibióticos preconizados em casos de toxi-infecção alimentar e suas respectivas concentrações de acordo com o Manual Integrado de Vigilância, Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por Alimentos/ Ministério da Saúde (BRASIL, 2010): Meropenem - 10µg, Sulfonamida - 300µg, Enrofloxacina - 5µg, Doxiciclina - 30µg, Ciprofloxacina - 5µg, Cefepima - 30µg, Trimethoprim + Sulfametoxazol (Sulfazotrim) - 1,25/23,75µg, Gentamicina - 10µg, Florfenicol - 30µg, Cloranfenicol - 30µg, Amoxicilina + Ácido Clavulânico - 20/10µg.

Ao término da inoculação dos discos, as placas foram invertidas e incubadas em uma estufa a 37°C até a leitura em 24 horas com auxílio de paquímetro.

### 1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 259 isolados de *E. coli*, 127(49,03%) aglutinaram frente ao anti-soro correspondente a categoria EPEC, 22(8,49%) a O157:H7 e 110 (42,47%) não aglutinaram frente aos soros testados incluindo o sorogrupo EIEC (tabela 1).

Tabela 1. Frequência de *E. coli* isoladas de fezes e rúmen de bovinos abatidos sob Inspeção Estadual em Araguaína -To no período de abril a agosto de 2016.

Sorogrupo	Amostra clínica		Total ( $p= 0,04$ )
	Fezes	Rúmen	
EPEC	100(53,76%)	27(36,98%)	127(49,03%)
O157	15(8,06%)	7(9,58%)	22(8,49%)
Negativas*	71(64,55%)	39(53,42%)	110(42,47%)
Total	186(71,81%)	73(28,18%)	259(100%)

\*Total de amostras negativas frente aos anti-soros O157:H7 e EPEC A, B e C e EIEC por material biológico.

Embora não seja comum uma maior taxa de EPEC para bovinos, já existem relatos que os mesmos podem ser disseminadores de tal categoria bacteriana para consumidores humanos (WANG et al., 2017; UM et al., 2018).

Além disso, EPEC possui a capacidade de apresentar inúmeros fatores de virulência comuns e específicos de outras categorias patogênicas como a EHEC, tal fenômeno é definido como interconversão pode ser a justificativa para o aumento da frequência epidemiológica das EPEC (SOUZA et al., 2016).

As taxas de isolados negativos ao teste sorológico 110(42,47%) são superiores aos encontrados por Seedy et al., (2016), onde em 75,6% de isolados, obtiveram uma taxa de 9,4% de negativos.

O teste sorológico de aglutinação direta deve ser adotado como prova adicional para confirmação de *E. coli* patogênica (WIJSMA et al., 2016), porém cuidado deve ser adotado na execução desse tipo de teste, pois pode haver potencial reatividade cruzada (WIJSMA et al., 2019).

Quando subdividimos a categoria EPEC (A, B e C), dos 127 isolados positivos, 86 (67,71%) foram positivos para o sorogrupo B, 50 (39,37%) para o sorogrupo C, e 10 (7,87%) para o sorogrupo A (tabela 2).

A mesma ordem de isolados por sorogrupo também ocorreu para ambos os materiais biológicos. Para isolados de fezes 63 (63%) foram positivos para o sorogrupo B, 29 (29%) para sorogrupo C, e 8 (8%) para sorogrupo A; para isolados de conteúdo ruminal foram obtidas as respectivas taxas: 14 (51,85%), 12 (44,44%), e 1 (3,70%), (tabela 2).

Tabela 2. Frequência de *E. coli* EPEC e seus respectivos sorogrupos A, B e C isoladas de fezes e rúmen de bovinos abatidos sob Inspeção Estadual em Araguaína -To no período de abril a agosto de 2016.

<b>Amostra clínica</b>			
<b>Sorogrupo</b>	<b>Fezes</b>	<b>Rúmen</b>	<b>Total (p= 0,27)</b>
EPEC A	8(8%)	1(3,70%)	10(7,87%)
EPEC B	63(63%)	14(51,85%)	86(67,71%)
EPEC C	29(29%)	12(44,44%)	50(39,37%)
Total	100(77,95%)	27(21,85%)	127(100%)

Uma maior prevalência do sorogrupo B representado pelos sorotipos O114, O125, O142 e O158 é justificável pelo fato de serem os mais comumente isolados no Brasil (TORRES, 2017). Os resultados obtidos para fezes estão acima do já relatado, Rios et al. (2019) também utilizaram teste sorológico em laboratório de referência e obtiveram uma taxa de 33,3% de positivos para EPEC em amostras fecais de bovinos na Espanha.

Cabe ressaltar ainda que, no sorogrupo A, destaca-se a presença do sorotipo O26 por ser o segundo mais importante em casos de doenças transmitidas por alimentos em todo o mundo ficando atrás apenas da O157:H7. E bovinos tem sido alvo de estudos de prevalência desse sorotipo por sua importância como potencial disseminador (GONZALEZ- ESCALONA et al., 2016; LAJHAR; BROWNLIE; BARLOW, 2017).

Ao analisarmos a distribuição espacial dos isolados positivos para O157:H7 (figura 2), Araguaína foi o município com maior número de positivos 6(27,27%) seguido de Piraquê 4(18,18%).



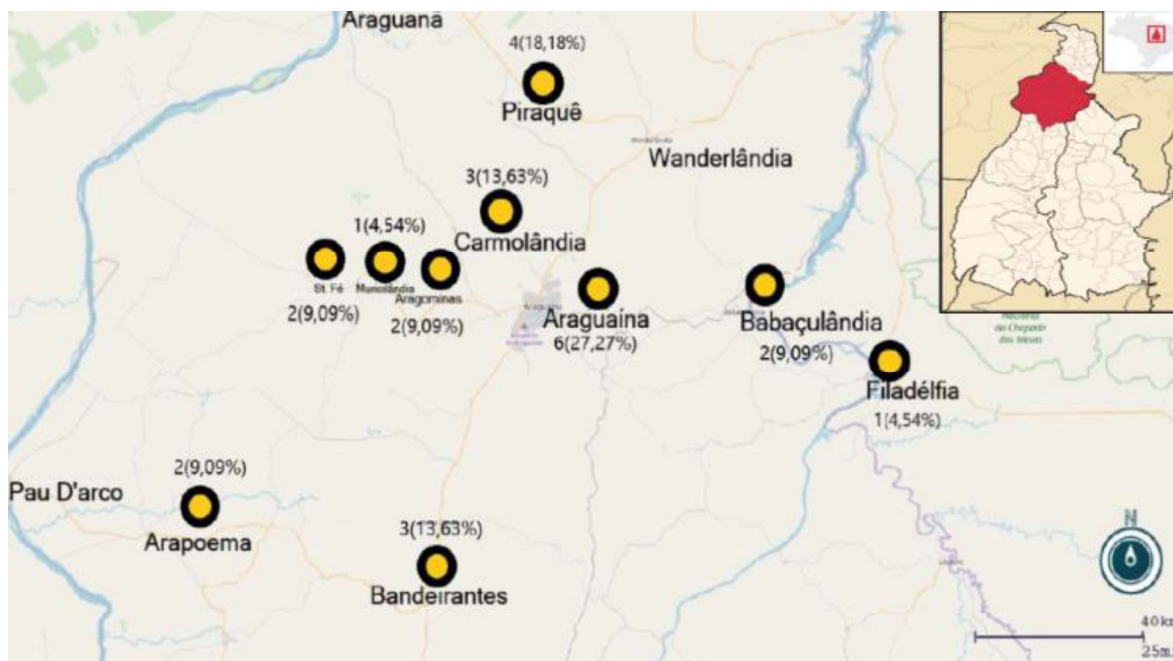


Figura 2. Distribuição espacial de isolados positivos frente ao anti-soro O157:H7 e seus respectivos municípios de origem. Fonte: Epi info@ 7.0.

Ao analisarmos o perfil de susceptibilidade dos 22 isolados positivos frente ao anti-soro O157:H7, os mesmos apresentaram multirresistência a 9 antibióticos, sendo eles: sulfonamida 18 (81,81%), gentamicina 14 (63,63%), florfenicol 10 (45,45%), cloranfenicol 8 (36,36%), enrofloxacin 11 (50%), amx+ ácido clavulânico 12 (54,54%), cefepime 8 (36,36%), doxiciclina 12 (54,54%) e meropenem 6 (27,27%). Enquanto os antibióticos que inibiram o crescimento bacteriano foram: sulfazotrim e ciprofloxacina ambos com 18 (81,81%), (tabela 3).

A resistência a enrofloxacin requer uma análise minuciosa sobre a cautela do uso do mesmo em bovinos, uma vez que a facilidade com que esse antibiótico é administrado e o seu amplo espectro favorecem a seleção de bactérias resistentes espontaneamente. Além disso, a biodisponibilidade do mesmo nos solos após excreção das fezes e urinas dos bovinos é considerado um fator de risco para a transmissão de resistência para humanos e animais (SUBBIAH; MITCHELL; CALL, 2016).

A dispersão do perfil de multirresistência de isolados de O157:H7 está disposto no gráfico 1. Onde pode-se observar que os isolados de ambos materiais biológicos tiveram perfil de multirresistência semelhantes, sendo que um isolado de conteúdo ruminal oriundo de Araguaína apresentou multirresistência a 10 dos 11 antibióticos testados (gráfico 1).

Navajan- Berito et al. (2017) ao pesquisarem o perfil de susceptibilidade de 78 isolados de *E. coli* em uma propriedade criadora de bovinos também detectaram uma amostra multirresistente a cloranfenicol, sulfazotrim, doxiciclina e quinolonas assim como em nosso estudo. Os mesmos autores afirmam ainda que uma das principais justificativas para a propagação de multirresistência em *E. coli* em bovinos é o aerotransporte, e que esse representa um risco e consequente entrada de amostras multirresistentes na cadeia alimentar.

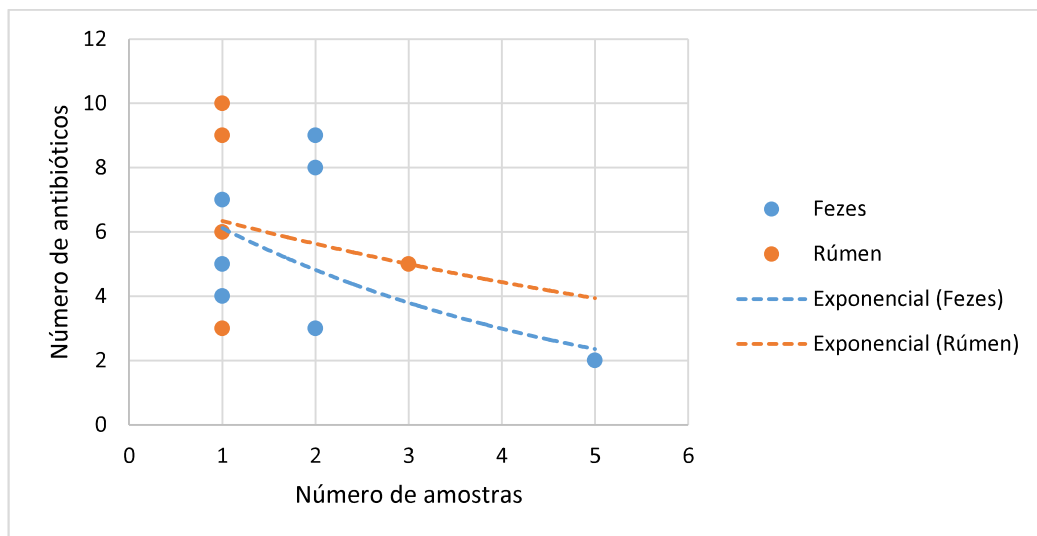


Gráfico 1. Perfil de multirresistência de isolados de fezes e conteúdo ruminal positivos frente ao anti-soro O157:H7.

O perfil de multirresistência de O157:H7 neste trabalho foi superior ao encontrado por Abdissa et al., 2017 e Rehman et al. (2017), onde os mesmos relataram resistência desse sorogrupo apenas para amoxicilina, cefalosporina de terceira geração e tetraciclina.

Existe ainda uma relação entre a resistência antimicrobiana e a *E. coli* O157, e o uso de subdosagem de antibióticos na criação de bovinos, na forma terapêutica e/ou de promotores de crescimento (SASAKI et al., 2012). O que pode justificar a multirresistência obtidas nesse trabalho para esse sorogrupo em questão.

Chama atenção a resistência ao antibiótico cefepime, uma vez que a resistência é estabelecida pela presença da enzima ESBL que representa um problema global de saúde pública, pois sua disseminação através de *E. coli* ocorre rapidamente por transferência do gene codificador de ESBL por conjugação (MKALA; AZIZI, 2017).

Mesmo após uma década de proibição do uso veterinário do cloranfenicol foi possível encontrar resistência ao mesmo em nosso estudo. O mecanismo pelo qual as bactérias conseguem resistir a ação desse fármaco se baseia na presença de enzimas denominadas cloranfenicol acetiltransferases (CATs), e o grande problema é que a transferência do gene codificador dessas enzimas podem ocorrer por conjugação, mobilização, transdução ou transformação entre bactérias de diferentes gêneros e espécies. O que torna a disseminação de resistência rápida (ROBERTS e SCHWARZ, 2017).

Cabe ainda ressaltar a importância do uso do cloranfenicol em humanos. Esse foi o primeiro antibiótico de amplo- espectro utilizado no tratamento de bactérias Gram positivo e Gram negativo, com ampla utilização em infecções severas, tais como meningites e febre tifoide (FREITAS e SILVA, 2016).

Quando analisados os materiais biológicos separadamente, os isolados de fezes apresentaram resistência frente ao meropenem 5 (33,33%) e florfenicol 9 (60%) e os isolados do conteúdo ruminal frente ao sulfazotrim 3 (42,85%); para o perfil de sensibilidade os isolados de fezes foram sensíveis frente ao sulfazotrim 14 (93,33%) e os isolados do conteúdo ruminal o flofenicol e meropenem, ambos com 6 (87,71%), (tabela 3).

Tabela 3. Perfil de susceptibilidade de isolados de *E. coli* de fezes e conteúdo ruminal de bovinos abatidos sob Inspeção Estadual em Araguaína-To no período de abril a agosto de 2016 positivos frente ao anti-soro O157:H7.

<b>O157:H7</b>				
<b>ANTIBIÓTICO</b>		<b>FEZES</b>	<b>CONTEÚDO RUMINAL</b>	<b>TOTAL</b>
		<b>**n%</b>	<b>**n%</b>	
<b>Sulfonamidas</b>				
SULF	*SENS	4(26,66%)	-	4(18,18%)
	*RES	11(73,33%)	7(100%)	18(81,81%)
SZT	*SENS	14(93,33%)	4(57,14%)	18(81,81%)
	*RES	1(6,66%)	3(42,85%)	4(18,18%)
<b>Aminoglicosídeo</b>				
GENT	*SENS	7(46,66%)	1(14,28%)	8(36,36%)
	*RES	8(53,33%)	6(87,71%)	14(63,63%)
<b>Anfenicóis</b>				
FLOR	*SENS	6(40%)	6(87,71%)	12(54,54%)
	*RES	9(60%)	1(12,29%)	10(45,45%)
CLOR	*SENS	10(66,66%)	4(57,14%)	14(63,63%)
	*RES	5(33,33%)	3(42,85%)	8(36,36%)
<b>Quinolonas</b>				
ENRO	*SENS	7(46,66%)	4(57,14%)	11(50%)
	*RES	8(53,33%)	3(42,85%)	11(50%)
CIPRO	*SENS	12(80%)	6(87,71%)	18(81,81%)
	*RES	3(20%)	1(12,29%)	4(18,18%)
<b>β-Lactâmico (penicilina)</b>				
AMX	*SENS	6(40%)	4(57,14%)	10(45,45%)
	*RES	9(60%)	3(42,85%)	12(54,54%)
<b>β- Lactâmico (cefalosporina)</b>				
CEFEP	*SENS	10(66,66%)	4(57,14%)	14(63,63%)
	*RES	5(33,33%)	3(42,85%)	8(36,36%)
<b>Tetraciclina</b>				
DOX	*SENS	10(66,66%)	0	10(45,45%)
	*RES	5(33,33%)	7(100%)	12(54,54%)
<b>β- Lactâmico (carbapenêmico)</b>				
MERO	*SENS	10(66,66%)	6(87,71%)	16(72,72%)
	*RES	5(33,33%)	1(12,29%)	6(27,27%)

SULF= sulfonamidas; SZT= sulfazotrim; GENT= gentamicina; FLOR= florfenicol; CLOR=cloranfenicol; ENRO= enrofloxacina; CIPRO= ciprofloxacina; AMX= amoxicilina+ ácido clavulânico; CEFEP= cefepima; DOX= doxiciclina; MERO= meropenem. \*RES= resistente; \*SENS= sensível. \*\*n/= número total de cepas e suas respectivas percentagens.

Ao analisarmos a distribuição espacial dos isolados positivos para EPEC (Figura 3), para o sorogrupo A Aragominas e Bandeirantes foram os municípios com maior número de isolados positivos, ambos com 2(20%); para o sorogrupo B, Araguaína 14(16,27%) e Filadélfia 10(11,62%); e para o sorogrupo C, Araguaína 10(20%).

A dispersão do perfil de multirresistência de isolados de fezes positivos frente aos anti-soros de EPEC (A, B e C) está disposto no gráfico 2. Onde o sorogrupo A apresentou menor perfil de multirresistência, sorogrupo C intermediário e B um maior perfil. Cabe ressaltar, que para o sorogrupo C, um único isolado oriundo de Filadélfia foi multirresistente a 8 antibióticos (gráfico 2).

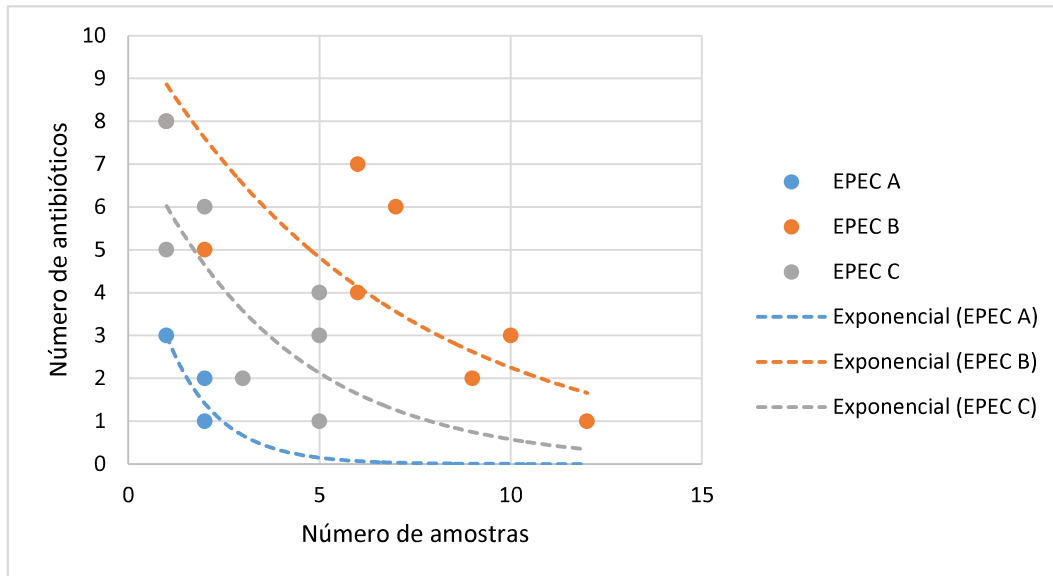


Gráfico 2. Perfil de multirresistência de isolados de fezes positivos frente ao anti-soro EPEC A, B e C.

A dispersão do perfil de multirresistência de isolados de conteúdo ruminal positivos frente aos anti-soros de EPEC (A, B e C) está disposto no gráfico 3. Onde pode-se observar que o sorogrupo C teve um perfil de multirresistência maior, e um isolado oriundo de Araguañã apresentou multirresistência aos 11 antibióticos (gráfico 3).

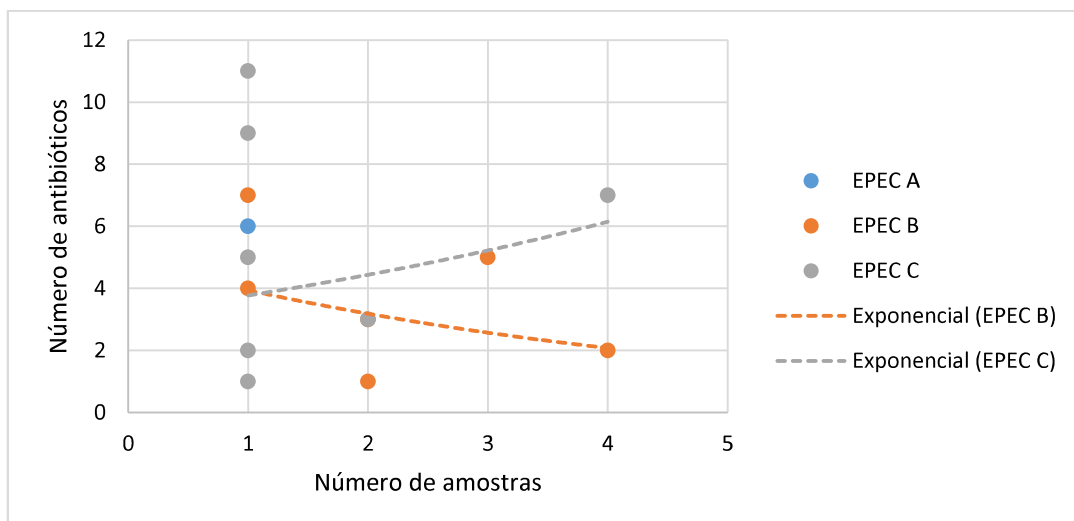


Gráfico 3. Perfil de multirresistência de isolados de conteúdo ruminal positivos frente ao anti-soro EPEC A, B e C.

Os humanos podem entrar em contato com bactérias resistentes de diversas formas, seja pelo contato direto com os animais ou através do consumo de produtos de origem animal. Essas bactérias podem colonizar e/ou transferir resistência as bactérias da microbiota do homem. E quanto maior a resistência a um numero amplo de antibióticos, maiores são os riscos de codificação e transferência de genes de resistência. Por isso tem se tornado cada vez mais importante o rastreamento de bactérias multirresistentes isoladas de animais destinados ao consumo humano (SILVA et al.,2016).

Quando analisados os 127 isolados positivos frente ao soro anti EPEC, todos os sorogrupos (A, B e C) em ambos materiais biológicos apresentaram resistência a sulfonamida 41 (32,28%) e gentamicina 78 (61,41%), (tabela 4).

Porém, quando analisados por material biológico, o perfil de multirresistência foi diferente, sendo que para os isolados de fezes houve resistência a diferentes antibióticos entre os sorogrupos, sendo para o sorogrupo A resistente a amx + ácido clavulânico, B a cefepime 16 (25,39%), e C ao cloranfenicol 8 (27,58%); os isolados do conteúdo ruminal apresentaram resistência no sorogrupo C frente ao meropenem 3 (25%) (tabela 4).

Para o perfil de sensibilidade os isolados de fezes no sorogrupo A foi sensível frente a gentamicina 8 (100%), e para conteúdo ruminal o sorogrupo A ao cefepime 1(100%) e no sorogrupo B a ciprofloxacina e doxiciclina, ambos com 14 (100%), (tabela 4).

A multirresistência encontrada nesse trabalho coloca em questão o uso de antibióticos na bovinocultura extensiva na microrregião avaliada, uma vez que bovinos destinados ao abate criados em pastagens ou em não condições de confinamento deveriam de regra utilizar menos antibióticos no seu processo de criação. E com base nisso, haveria hipoteticamente uma menor prevalência de *E. coli* resistentes (CALL; DAVIS; SAWANT, 2008).

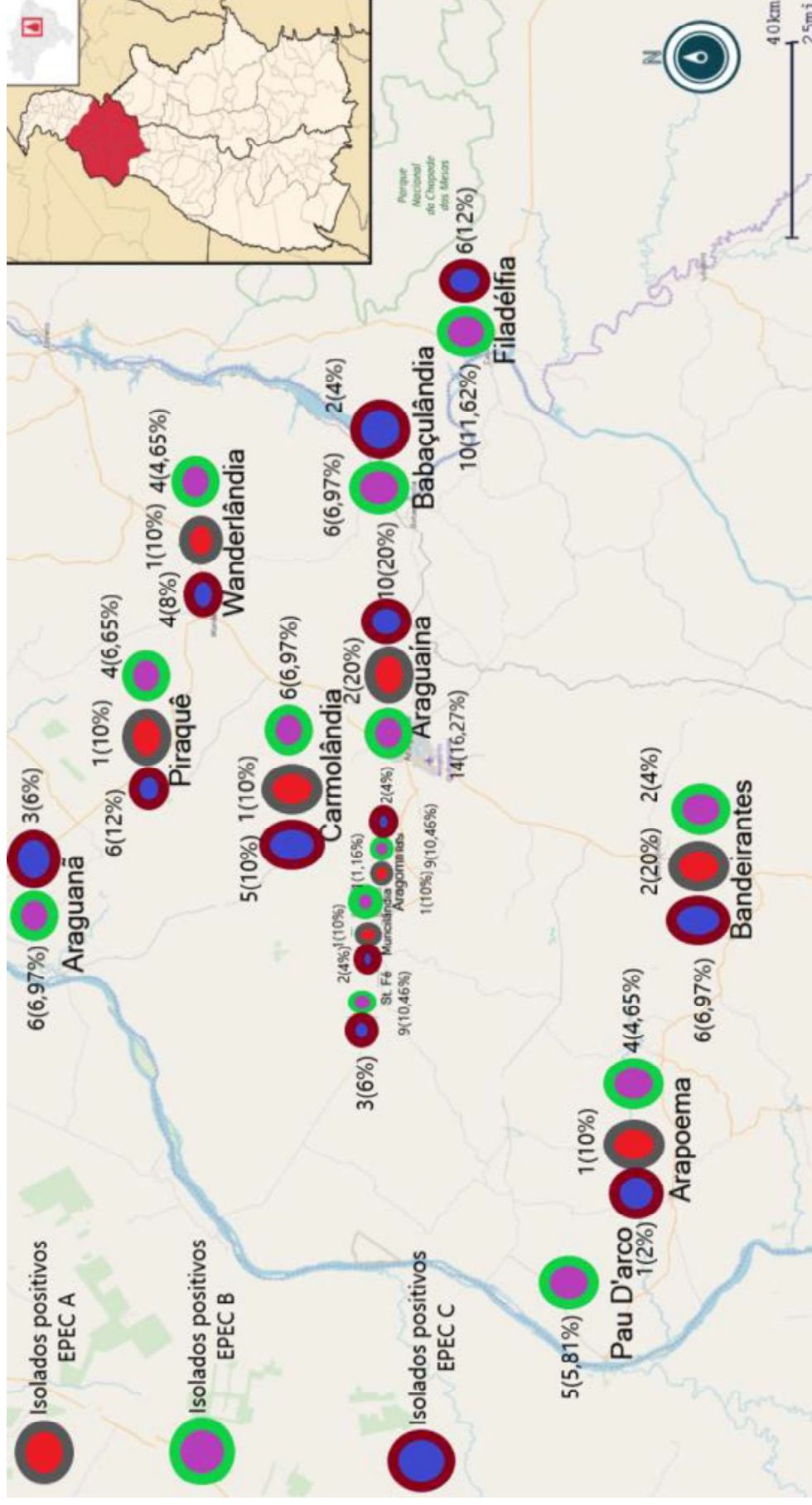


Figura 3. Distribuição espacial de isolados positivos frente ao anti-soro EPEC e seus respectivos municípios de origem. Fonte: Epi info® 7

Tabela 4. Perfil de susceptibilidade de isolados de *E. coli* de fezes e conteúdo ruminal de bovinos abatidos sob Inspeção Estadual em Araguaína-To no período de abril a agosto de 2016 positivos frente ao anti-soro EPEC.

ANTIBIÓTICO	EPEC A		EPEC B		EPEC C		Total	
	F <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	F <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	F <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>		
	**n/%	**n/%	**n/%	**n/%	**n/%	**n/%		
<b>Sulfonamidas</b>								
SULF	*SENS	4(50%)	0	18(28,57%)	3(21,42%)	13(44,82%)	3(25%)	41(32,28%)
	*RES	4(50%)	1(100%)	45(71,42%)	11(78,57%)	16(55,17%)	9(75%)	86(67,71%)
SZT	*SENS	8(100%)	1(100%)	57(90,47%)	14(100%)	27(93,10%)	11(91,66%)	118(92,91%)
	*RES	0	0	6(9,52%)	0	2(8,89%)	1(8,33%)	9(7,08%)
<b>Aminoglicosídeo</b>								
GENT	*SENS	8(100%)	0	37(58,73%)	9(64,28%)	19(65,51%)	5(41,66%)	78(61,41%)
	*RES	0	1(100%)	26(41,26%)	5(35,71%)	10(34,48%)	7(58,33%)	49(38,58%)
<b>Anfenicóis</b>								
FLOR	*SENS	6(75%)	0	44(69,84%)	10(71,42%)	22(75,86%)	3(25%)	85(66,92%)
	*RES	2(25%)	1(100%)	19(30,15%)	4(28,57%)	7(24,13%)	9(75%)	42(33,07%)
CLOR	*SENS	8(100%)	1(100%)	52(82,53%)	9(64,28%)	21(72,41%)	6(50%)	97(76,37%)
	*RES	0	0	11(17,46%)	5(35,71%)	8(27,58%)	6(50%)	30(23,62%)
<b>Quinolonas</b>								
ENRO	*SENS	8(100%)	1(100%)	48(76,19%)	11(78,57%)	25(86,20%)	6(50%)	99(77,95%)
	*RES	0	0	15(23,80%)	3(21,42%)	4(13,79%)	6(50%)	28(22,04%)
CIPRO	*SENS	8(100%)	0	58(92,06%)	14(100%)	26(89,65%)	9(75%)	115(90,55%)
	*RES	0	1(100%)	5(7,93%)	0	3(10,34%)	3(25%)	12(9,44%)
<b>β-Lactâmico (penicilina)</b>								
AMX	*SENS	6(75%)	0	48(76,19%)	8(57,14%)	23(79,31%)	4(33,33%)	89(70,07%)
	*RES	2(25%)	1(100%)	15(23,80%)	6(42,85%)	6(20,68%)	8(66,66%)	38(29,92%)
<b>β- Lactâmico (cefalosporina)</b>								
CEFEP	*SENS	8(100%)	1(100%)	47(74,60%)	9(64,28%)	24(82,75%)	7(58,33%)	96(75,59%)
	*RES	0	0	16(25,39%)	5(35,71%)	5(17,24%)	5(41,66%)	31(24,40%)
<b>Tetraciclina</b>								
DOX	*SENS	7(87,5%)	0	52(82,53%)	14(100%)	25(86,20%)	6(50%)	104(81,88%)
	*RES	1(12,5%)	1(100%)	11(17,46%)	0	4(13,79%)	6(50%)	23(18,11%)
<b>β- Lactâmico (carbapenêmico)</b>								
MERO	*SENS	8(100%)	1(100%)	46(73,01%)	11(78,57%)	23(79,31%)	9(75%)	98(77,18%)
	*RES	0	0	17(29,98%)	3(21,42%)	6(20,68%)	3(25%)	29(22,83%)

SULF= sulfonamidas; SZT= sulfazotrim; GENT= gentamicina; FLOR= florfenicol; CLOR=cloranfenicol; ENRO= enrofloxacina; CIPRO= ciprofloxacina; AMX= amoxicilina+ ácido clavulânico; CEFEP= cefepima; DOX= doxiciclina; MERO= meropenem. \*RES= resistente; \*SENS= sensível. \*\*n/= número total de cepas e suas respectivas percentagens. F<sup>1</sup>= isolados de fezes. R<sup>2</sup>= isolados de conteúdo ruminal.

As amostras negativas frente aos anti-soros utilizados neste trabalho 110 (42,47%), apresentaram resistência frente a sulfonamida 84 (76,36%), gentamicina 33(30%), florfenicol 45 (40,91%), amx + ácido clavulânico 74 (67,27%), e cefepime 32 (29,09%); e apresentou sensibilidade a sulfazotrim 100



(90,91%), cloranfenicol 85 (77,27%), enrofloxacin 84 (76,36%), ciprofloxacina 101 (91,82%), doxiciclina 89 (80,91%), e meropenem 95 (86,36%), (Tabela 5).

Quando analisado o perfil de resistência entre os materiais biológicos, os isolados de conteúdo ruminal foram resistentes ao cloranfenicol 11 (28,20%), enrofloxacin 10 (25,64%), e doxiciclina 10 (25,64%) (tabela 5).

O monitoramento de *E. coli* comensal é de suma importância, pois permite a comparação dos efeitos da pressão seletiva em todas as demais populações bacterianas relevantes, além de servir como um alerta precoce para rastreamento de resistência emergente em bovinos e sua possível disseminação em alimentos derivados de sua carne (ANDREOLETTI et al., 2018).

Os resultados de resistência para isolados negativos frente a sorologia, superam o encontrado por Bywater et al. (2004), que ao avaliarem *E. coli* comensais isoladas de bovinos na Europa, afirmaram ter baixa resistência ou até mesmo ausente para cefepime e ciprofloxacina.

Wasył et al. (2013) encontraram sensibilidade em isolados para cefalosporinas de terceira geração e amx + ácido clavulânico. Os mesmos autores afirmam ainda que o uso constante em animais saudáveis pode ser uma das principais causas da disseminação de resistência em *E. coli* comensais em bovinos.

Lambrecht et al. (2018) afirmam que a *E. coli* tida como comensal em animais destinados a alimentação humana pode ser uma fonte de rápida disseminação de resistência bacteriana. Reforçando dessa forma o constante monitoramento epidemiológico de susceptibilidade nessa categoria de *E. coli* em bovinos destinados ao consumo humano.

Tabela 5. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de isolados de *E. coli* negativos frente aos anti-soros disponíveis para realização de prova de aglutinação direta de fezes e conteúdo ruminal de bovinos abatidos sob Inspeção Estadual em Araguaína- To no período de abril a agosto de 2016.

CLASSE/ ANTIBIÓTICO	FEZES		CONTEÚDO RUMINAL		TOTAL	
	*RES	*SEN	*RES	*SEN	*RES	*SENS
	**n/%	**n/%	**n/%	**n/%	**n/%	**n/%
<b>Sulfonamidas</b>						
SULF	56(78,87%)	15(21,12%)	28(71,79%)	11(28,20%)	84(76,36%)	26(23,64%)
SZT	6(8,45%)	65(91,54%)	4(10,25%)	35(89,74%)	10(9,09%)	100(90,91%)
<b>Aminoglicosídeo</b>						
GENT	20(28,16%)	51(71,83%)	13(33,33%)	26(74,35%)	33(30%)	77(70%)
<b>Anfenicóis</b>						
FLOR	27(38,02%)	44(61,97%)	18(46,15%)	21(53,84%)	45(40,91%)	65(59,09%)
CLOR	14(19,71%)	57(80,28%)	11(28,20%)	28(71,79%)	25(22,73%)	85(77,27%)
<b>Quinolonas</b>						
ENRO	16(22,53%)	55(77,46%)	10(25,64%)	29(74,35%)	26(23,64%)	84(76,36%)
CIPRO	5(7,04%)	66(92,95%)	4(10,25%)	35(89,74%)	9(8,18%)	101(91,82%)
<b>β- Lactâmico (Penicilina)</b>						
AMX	23(32,39%)	48(67,60%)	13(33,33%)	26(74,35%)	74(67,27%)	36(32,73%)
<b>β- Lactâmico (cefalosporina)</b>						
CEFEP	18(25,35%)	53(74,64%)	14(35,89%)	25(64,10%)	32(29,09%)	78(70,91%)
<b>Tetraciclina</b>						
DOX	11(15,49%)	60(84,50%)	10(25,64%)	29(74,35%)	21(19,09%)	89(80,91%)
<b>β- Lactâmico (carbapenêmico)</b>						
MERO	9(12,67%)	62(87,32%)	6(15,38%)	33(84,61%)	15(13,64%)	95(86,36%)

SULF= sulfonamidas; SZT= sulfazotrim; GENT= gentamicina; FLOR= florfenicol; CLOR=cloranfenicol; ENRO= enrofloxacina; CIPRO= ciprofloxacina; AMX= amoxicilina+ ácido clavulânico; CEFEP= cefepima; DOX= doxiciclina; MERO= meropenem.

\*RES= resistente; \*SENS= sensível. \*\*n/%= número total de cepas e suas respectivas percentagens.

A dispersão do perfil de multirresistência de isolados de conteúdo ruminal negativos frente aos anti-soros estão dispostos no gráfico 4. Onde pode-se observar que isolados do conteúdo ruminal apresentam um maior perfil de multirresistência, e que um isolado oriundo de Piraquê apresentou multirresistência a 9 antibióticos (Gráfico 4).

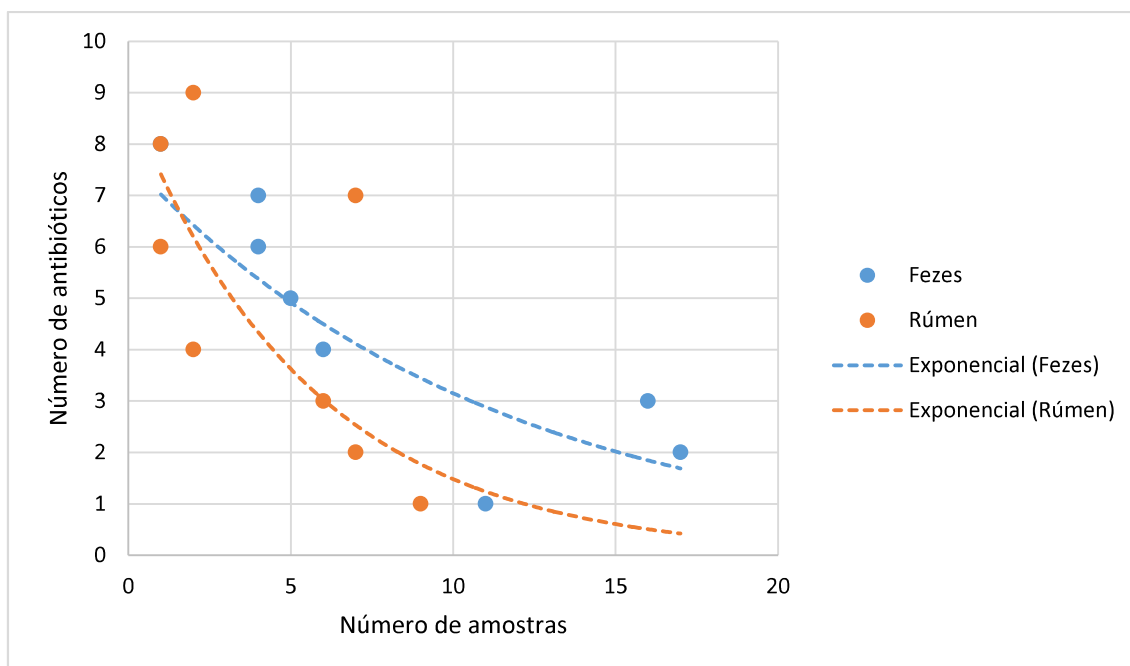


Gráfico 4. Perfil de multirresistência de isolados de fezes e conteúdo ruminal negativos frente aos anti-soros testados.

Caudel et al. (2017) ao avaliarem o comportamento de uso de antimicrobianos por criadores de bovinos de forma extensiva na Tanzânia concluíram que existe uma tendência de auto-administração de antibióticos em pequenos produtores em pequenas extensões territoriais e essa associação fornece informações sobre pressões de seleção que podem contribuir diretamente para a evolução e disseminação da resistência antimicrobiana. Tais informações podem auxiliar no entendimento do comportamento de pequenos municípios como Araguañã, Filadélfia e Piraquê (Gráficos 2, 3 E 4) terem se destacado por possuírem amostras multirresistentes.

Pesquisas futuras sobre multirresistência deverão utilizar métodos comportamentais para estimar taxas de uso e dosagem de antibióticos em bovinos para uma estimação de potenciais pressões de seleção e relação com fatores socioculturais para que haja uma melhor comunicação entre os profissionais veterinários e os produtores para uma mitigação da seleção de bactérias multirresistentes (AHMED et al., 2018).

#### 1.4 CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi possível detectar a presença de *E. coli* sorogrupo O157:H7 e EPEC, sendo este último sorogrupo maior que o primeiro, além de amostras negativas aos anti-soros testados.

Houve perfil de multirresistência em ambos sorogrupos testados. Sendo que para o sorogrupo O157:H7, os isolados de *E. coli* de fezes foram multirresistentes a 9 antibióticos, e os isolados do conteúdo ruminal a 8.

Para os sorogrupos de EPEC, em todos os sorogrupos (A, B e C) houve maior perfil de multirresistência para isolados do conteúdo ruminal, 6, 10 e 10 antibióticos respectivamente.

As amostras negativas (não aglutinaram frente aos anti-soros testados), também apresentaram perfil de multirresistência, sendo que os isolados do conteúdo ruminal apresentaram maior número, 8 antibióticos quando comparados com isolados de fezes, 5 antibióticos.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que através da técnica de aglutinação direta comumente utilizada para identificação de *E. coli* patogênica, que bovinos podem ser reservatórios além da categoria O157:H7. No entanto, a contraprova através de técnicas de identificação de genes de virulência faz-se necessário, afim de respaldar e eliminar a presença de falsos positivos e vice-versa.

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADZITEY, F.; SABA, C.K.S.; GABRIEL, A. T. Antibiotic susceptibility of *Escherichia coli* isolated from milk and hands of milkers in Nyankpala community of Ghana. **Curr. Res. Dairy Sci**, v. 8, p. 6-11, 2016.

AHMED, H. et al. Relationships between livestock grazing practices, disease risk, and antimicrobial use among East African Agropastoralists. **Environment and Development Economics**, v. 23, n. 1, p. 80-97, 2018.

ANDERSON, J.M.; BAIRD-PARKER, A. C. A rapid and direct plate method for enumerating *Escherichia coli* biotype I in food. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 39, n. 2, p. 111-117, 1975.

ATNAFIE, B. et al. Occurrence of *Escherichia coli* O157 : H7 in cattle feces and contamination of carcass and various contact surfaces in abattoir and butcher shops of Hawassa , Ethiopia. **BMC Microbiology**, p. 1–7, 2017

BRASIL. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017, Artº 17. **Regulamenta Inspeção Industrial Sanitária de Produtos de Origem Animal (Riispoa)**. Brasília 2017. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2015-2018/2017/decreto/D9013.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2017/decreto/D9013.htm)>. Acesso em 20 agosto 2018.

BRASIL. **Manual Integrado de Vigilância, Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por alimentos**. Brasília 2010. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_integrado\\_vigilancia\\_doencas\\_alimentos.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_vigilancia_doencas_alimentos.pdf)>. Acesso em: 22 ago. 2018.

BYWATER, R. et al. A European survey of antimicrobial susceptibility among zoonotic and commensal bacteria isolated from food-producing animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 4, p. 744-754, 2004.

CAUDELL, M.A. et al. Antimicrobial use and veterinary care among agro-pastoralists in Northern Tanzania. **PloS one**, v. 12, n. 1, p. e0170328, 2017.

CALL, D. R.; DAVIS, M. A.; SAWANT, A. A. Antimicrobial resistance in beef and dairy cattle production. **Animal Health Research Reviews**, v.9, n.02, p.159–167, 2008.

CHART, H.; JENKINS, C. The serodiagnosis of infections caused by Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. **Journal of applied microbiology**, v. 86, n. 5, p. 731-740, 1999.

CLSI - **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Twenty-Second Informational Supplement. M100- S22, v.32, n.3, 2012.

CROXEN, M. A. et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 822–880, 2013.

- FENG, P.C.H; REDDY, S.P. Prevalence and diversity of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains in fresh produce. **Journal of food protection**, v. 77, n. 5, p. 820-823, 2014.
- FREITAS, D.M.; SILVA, H.M. Aplasia Medular Correlacionada ao uso do Cloranfenicol. **Revista Cereus**, v. 8, n. 1, p. 127-144, 2016.
- GOMES, T.A.T et al. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Brazilian journal of microbiology**, v. 47, p. 3-30, 2016.
- GONZALEZ-ESCALONA, N. et al. Virulence gene profiles and clonal relationships of *Escherichia coli* O26: H11 isolates from feedlot cattle as determined by whole-genome sequencing. **Applied Environmental Microbiology**, v. 82, n. 13, p. 3900-3912, 2016.
- GUEDES, L. S.; BRITO, J. L.S. Caracterização socioeconômica da microrregião geográfica de Araguaína (TO). **Revista Eletrônica de Geografia**, v. 6, n. 17, p. 91-103, 2014.
- HUNGATE, R.E. **The rumen and its microbes**. United States, Academic Press., 1966.533 p, 1966.
- LAJHAR, S.A.; BROWNLIE, J.; BARLOW, R. Survival capabilities of *Escherichia coli* O26 isolated from cattle and clinical sources in Australia to disinfectants, acids and antimicrobials. **BMC microbiology**, v. 17, n. 1, p. 47, 2017.
- LAMBRECHT, E. et al. Characterization of cefotaxime-and ciprofloxacin-resistant commensal *Escherichia coli* originating from Belgian farm animals indicates high antibiotic resistance transfer rates. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 6, p. 707-717, 2018.
- MCDANIELS, A. E. et al. Confirmational identification of *Escherichia coli*, a comparison of genotypic and phenotypic assays for glutamate decarboxylase and beta-D-glucuronidase. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, n. 9, p. 3350-3354, 1996.
- MKALA, R.S.; AZIZI, K.A. Prevalence and Antimicrobial Resistance Patterns of Extended Spectrum Beta Lactamase Producing Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Strain O157: H7 from Cattle and Humans in Moshi, Northern Tanzania. **Microbiology Research Journal International**, v. 19, p. 1-10, 2017.
- NAVAJAS-BENITO, E.V.et al. Molecular characterization of antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains from a dairy cattle farm and its surroundings. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 1, p. 362-365, 2017.
- OMS. Organização Mundial de Saúde. **OMS recomenda que agricultores e indústria alimentar parem de usar antibióticos em animais saudáveis para evitar resistência a esses medicamentos, 2017**. Disponível em: <[https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5540:oms-recomenda-que-agricultores-e-industria-alimentar-parem-de-usar-antibioticos-em-animais-saudaveis-para-preservar-sua-eficacia&Itemid=812](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5540:oms-recomenda-que-agricultores-e-industria-alimentar-parem-de-usar-antibioticos-em-animais-saudaveis-para-preservar-sua-eficacia&Itemid=812)>. Acesso em: junho 2019.

- PATEL, I.R. et al. FDA *Escherichia coli* identification (FDA-ECID) microarray: a pangenome molecular toolbox for serotyping, virulence profiling, molecular epidemiology, and phylogeny. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 82, n. 11, p. 3384-3394, 2016.
- REHMAN, M.U. et al. Molecular epidemiology and antibiotic resistance pattern of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from bovines and their handlers in Jammu, India. **Journal of Advanced Veterinary and Animal Research**, v. 1, n. 4, p. 177-181, 2014.
- RIOS, E.A. et al. Characterisation, antimicrobial resistance and diversity of atypical EPEC and STEC isolated from COW'S milk, cheese and dairy cattle farm environments. **LWT**, 2019.
- ROBERTS, M.C.; SCHWARZ, S. Tetracycline and chloramphenicol resistance mechanisms. In: **Antimicrobial drug resistance**. Springer, Cham, 2017. p. 231-243.
- SALEHI, T. Z.; BONAB, S. Farashi Antibiotics Susceptibility Pattern of *Escherichia coli* Strains Isolated from Chickens with Colisepticemia in Tabriz Province, Iran. **International Journal of Poultry Science**, v. 5, n. 7, p. 677-684, 2006.
- SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootécnica, 265 p., 2002.
- SARKAR, S. et al. Role of capsule and O antigen in the virulence of *uropathogenic Escherichia coli*. **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e94786, 2014.
- SASAKI, Y. et al. Antimicrobial resistance in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O 157 and O 26 isolates from beef cattle. **Japanese journal of infectious diseases**, v. 65, n. 2, p. 117-121, 2012.
- SEEDY, F. R. et al. Prevalence of *Salmonella* and *E. coli* in neonatal diarrheic calves. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 5, n. 1, p. 45-51, 2016.
- SILVA, T.M. et al. Transferência de resistência antimicrobiana entre enterobactérias patogênicas de importação aviária-impactos em saúde pública. **Arquivos da Veterinary Science**, v. 21, n. 2 de 2016.
- SMITH, J.L.; FRATAMICO, P.M.; GUNTHER IV, N.W. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. In: **Advances in applied microbiology**. Academic Press, p. 145-197, 2015.
- SOUSA, C. P. The versatile strategies of *Escherichia coli* pathotypes: a mini review. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 12, n. 3, p. 363-373, 2006.
- SUBBIAH, M.; MITCHELL, S.M.; CALL, D.R. Not all antibiotic use practices in food-animal agriculture afford the same risk. **Journal of environmental quality**, v. 45, n. 2, p. 618-629, 2016.

TORRES, A.G. Maternal immunity, a way to confer protection against enteropathogenic *Escherichia coli*. **Jornal de Pediatria**, v. 93, n. 6, p. 548-550, 2017.

UM, M.M. et al. Antimicrobial resistance profiles of Enterohemorrhagic and Enteropathogenic *Escherichia coli* of serotypes O157: H7, O26: H11, O103: H2, O111: H8, O145: H28 compared to *Escherichia coli* isolated from the same adult cattle. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 6, p. 852-859, 2018.

WANG, L. et al. 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, n. 1, p. 268-278, 2017.

WASYL, D. et al. Antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* isolated from animals at slaughter. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 221, 2013.

WIJNSMA, K.L. et al. Fecal diagnostics in combination with serology: best test to establish STEC-HUS. **Pediatric Nephrology**, v. 31, n. 11, p. 2163-2170, 2016.

WIJNSMA, K.L. et al. Glyco-iELISA: a highly sensitive and unambiguous serological method to diagnose STEC-HUS caused by serotype O157. **Pediatric Nephrology**, v. 34, n. 4, p. 631-639, 2019.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A resistência a antibióticos é um problema mundial, sendo a *E. coli* uma das principais bactérias atreladas a resistência a múltiplas classes desses fármacos. O conhecimento do mecanismo de ação e principalmente a propagação de informação acerca do problema de resistência bacteriana é de fundamental importância para a sociedade de modo geral, sendo essa uma das principais formas de conscientização de Organizações mundiais

Além disso, a *E. coli* O157:H7 e a EPEC, representam um sério risco à saúde pública. A carne bovina tem sido atrelada a surtos de toxinfecções alimentares por O157:H7, sendo o bovino considerado portador assintomático desse sorotipo.

Em contraste com a O157:H7, o papel dos bovinos como reservatórios e conseqüentemente disseminadores de EPEC ainda não está totalmente estabelecido.

Os índices de multirresistência a antibióticos utilizados rotineiramente na atenção à saúde humana encontrados nesse trabalho são um alerta para o uso irracional desses fármacos em bovinos na microrregião de Araguaína- TO. Assim, estudos regionais como esse são de fundamental importância para o monitoramento epidemiológico da resistência bacteriana.

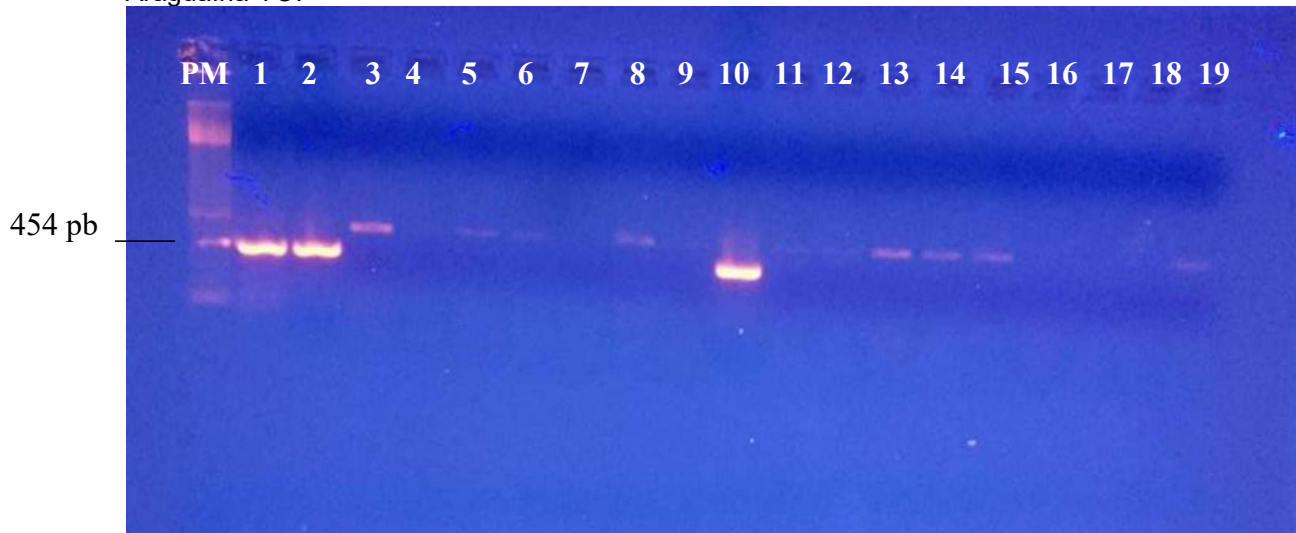
## ANEXOS

Perfil eletroforético em gel de agarose 1,5% dos fragmentos amplificados em reações de PCR para detecção do gene *rfb* O157:H7 em isolados de *E. coli* de bovinos abatidos sob inspeção no município de Araguaína-TO.



Gel corado com brometo de etídio e visualizado em transluminador com luz ultravioleta. Canaletas: PM- Padrão molecular 1 Kb DNA Ladder; Canaletas 1 e 2: controle positivo gene *rfb* O157:H7 (EHEC EDL 933); Canaletas 3 a 18: amostras de *E. coli* negativas; Canaleta 19: controle negativo.

Perfil eletroforético em gel de agarose 1,5% dos fragmentos amplificados em reações de PCR para detecção do gene *eae* em isolados de *E. coli* de bovinos abatidos sob inspeção no município de Araguaína-TO.



Gel corado com brometo de etídio e visualizado em transluminador com luz ultravioleta. Canaletas: PM- Padrão molecular 1 Kb DNA Ladder; Canaletas 1 e 2: controle positivo gene *eae* (EPEC 2348/69); Canaletas 3 a 9: amostras de *E. coli* negativas; Canaleta 10: amostra positiva; canaletas 11 a 18: amostras negativas; canaleta 19: controle negativo



TABELA PADRÃO PARA INTERPRETAÇÃO DE HALOS DE INIBIÇÃO (a)

Abaixo estão relacionados os principais grupos bacterianos, segundo CLSI (1), bem como os antibacterianos disponíveis na terapêutica atual que tem ação sobre eles.

- GRUPOS:  
 1. Enterobactérias  
 2. Pseudomonas aeruginosa

3. Acinetobacter spp  
 4. Stenotrophomonas maltophilia  
 5. Burkholderia cepacia

6. Staphylococcus spp  
 7. Enterococcus spp  
 8. Haemophilus spp

9. Streptococcus pneumoniae  
 10. Streptococcus spp (exceto pneumoniae)  
 11. Neisseria gonorrhoeae

12. Neisseria meningitidis  
 13. Morganella spp  
 14. Klebsiella pneumoniae

ANTIBACTERIANOS	Padrão interpretativo Zonas de inibição em mm	Padrão interpretativo		
		RESISTENTE (b)	INTERMEDIÁRIA (c)	SENSÍVEL (d)
<b>Amoxicilina</b>	30µg (AM)			
Enterobactérias		≥14	15-16	≥17
Staphylococcus spp		≥14	15-16	≥17
Acinetobacter spp		≥14	15-16	≥17
<b>Amoxicilina + Ac. Clavulânico</b>	20/10µg (AMC)			
Enterobactérias		≥13	14-17	≥18
Staphylococcus spp		≥19	20	≥21
Haemophilus influenzae e parainfluenzae		≥19	20	≥21
<b>Ampicilina</b>	10µg (AMP)			
Streptococcus spp grupo beta-hemolítico exceto S. pneumoniae		≥13	14-16	≥17
Enterobactérias		≥13	14-16	≥17
Staphylococcus spp		≥18	19-21	≥22
Enterococcus spp		≥18	19-21	≥22
Haemophilus influenzae e parainfluenzae		≥18	19-21	≥22
<b>Ampicilina + Sulbactam</b>	10/10 µg (ASB)			
Enterobactérias		≥11	12-14	≥15
Staphylococcus spp		≥11	12-14	≥15
Acinetobacter spp		≥11	12-14	≥15
Haemophilus influenzae e parainfluenzae		≥19	20	≥21
<b>Aztreonam</b>	30µg (ATM)			
Haemophilus influenzae e parainfluenzae		≥19	20	≥21
Enterobactérias		≥17	18-20	≥21
Staphylococcus spp		≥15	16-21	≥22
Pseudomonas		≥15	16-21	≥22
<b>Azitiromina</b>	15µg (AZI)			
N. meningitidis		≥19	20	≥21
Haemophilus influenzae e parainfluenzae		≥19	20	≥21
Staphylococcus spp		≥13	14-17	≥18
S. pneumoniae		≥13	14-17	≥18
Streptococcus spp grupo β-hemolítico/grupo viduans		≥13	14-17	≥18
<b>Bacitracina (B)</b>	10 UI (BAC)			
Staphylococcus spp		≥8	9-12	≥13
<b>Cefaloroxina</b>	30µg (CFC)			
Haemophilus influenzae e parainfluenzae		≥16	17-19	≥20
Enterobactérias		≥14	15-17	≥18
Staphylococcus spp		≥14	15-17	≥18
<b>Cefalotina</b>	30µg (CFL)			
Enterobactérias		≥14	15-17	≥18
Staphylococcus spp		≥14	15-17	≥18
<b>Cefazolin</b>	30µg (CFZ)			
Enterobactérias para pacientes não complicados de UTI		≥14	15-17	≥18
Enterobactérias		≥19	20-22	≥23
Staphylococcus spp		≥14	15-17	≥18
<b>Cefepime</b>	30µg (CEP)			
N. gonorrhoeae		≥21	22	≥23
Haemophilus influenzae e parainfluenzae		≥21	22	≥23
Streptococcus spp grupo beta-hemolítico exceto S. pneumoniae		≥21	22	≥23
Staphylococcus spp grupo viduans		≥21	22	≥23
Enterobactérias		≥18	19-23	≥24
<b>Enterobactérias</b>				
Enterobactérias		≥14	15-17	≥18
Acinetobacter spp		≥14	15-17	≥18
Staphylococcus spp		≥14	15-17	≥18
Staphylococcus aureus e S. epidermidis		≥21	22	≥23
N. gonorrhoeae		≥23	24-27	≥28
<b>Ceftazidima</b>	30µg (CAZ)			
Haemophilus influenzae e parainfluenzae		≥19	20	≥21
Burkholderia cepacia		≥17	18-20	≥21
Enterobactérias		≥17	18-21	≥22
Staphylococcus spp		≥14	15-17	≥18
Staphylococcus aureus e S. epidermidis		≥21	22	≥23
N. gonorrhoeae		≥23	24-27	≥28
<b>Ceftiofina</b>	30µg (CFI)			
Haemophilus influenzae e parainfluenzae		≥19	20	≥21
Enterobactérias		≥14	15-17	≥18
Staphylococcus spp		≥14	15-17	≥18
N. gonorrhoeae		≥25	26-30	≥31
<b>Ceftina</b>	5µg (CFM)			
Enterobactérias exceto Morganella spp		≥15	16-18	≥19
Haemophilus influenzae e parainfluenzae		≥15	16-18	≥19
N. gonorrhoeae		≥21	22	≥23
<b>Ceftriaxona</b>	30µg (CTR)			
N. meningitidis		≥19	20	≥21
Haemophilus influenzae e parainfluenzae		≥19	20	≥21
Enterobactérias		≥14	15-17	≥18
Staphylococcus spp		≥14	15-17	≥18
Staphylococcus aureus e S. epidermidis		≥21	22	≥23
N. gonorrhoeae		≥25	26-30	≥31
Streptococcus spp grupo beta-hemolítico exceto S. pneumoniae		≥25	26-30	≥31
Streptococcus grupo viduans		≥24	25-28	≥29
Enterobactérias		≥19	20-22	≥23
Acinetobacter spp		≥13	14-20	≥21
Staphylococcus spp		≥13	14-20	≥21
N. gonorrhoeae		≥35	36	≥37
<b>Carbapenem</b>	5µg (CBP)			
N. meningitidis		≥32	33-34	≥35
Haemophilus influenzae e parainfluenzae		≥32	33-34	≥35
Enterobactérias exceto Salmonella spp		≥15	16-20	≥21
Salmonella spp		≥20	21-30	≥31
Staphylococcus spp		≥15	16-20	≥21
Acinetobacter spp		≥15	16-20	≥21
Staphylococcus spp		≥15	16-20	≥21
N. gonorrhoeae		≥27	28-42	≥43
<b>Clarithromicina</b>	15µg (CLA)			
Staphylococcus spp		≥13	14-17	≥18
Haemophilus influenzae e parainfluenzae		≥10	11-12	≥13
Streptococcus spp grupo β-hemolítico/grupo viduans		≥16	17-20	≥21
<b>Clindamicina</b>	2µg (CLI)			
Staphylococcus spp		≥14	15-20	≥21
S. pneumoniae e Streptococcus spp grupo β-hemolítico/grupo viduans		≥15	16-18	≥19
<b>Cloranfenicol</b>	30µg (CLO)			
Haemophilus influenzae e parainfluenzae		≥25	26-29	≥30
Enterobactérias		≥20	21	≥22
Streptococcus spp grupo β-hemolítico/grupo viduans		≥17	18-21	≥22
Enterobactérias		≥12	13-17	≥18
Staphylococcus spp		≥12	13-17	≥18
Enterococcus spp		≥12	13-17	≥18
N. meningitidis		≥19	20-25	≥26
<b>Cotrimoxazol</b>	25µg (SUT)			
Sulfametoxazol 23,75µg + Trimetoprim 1,25µg		≥15	16-18	≥19
S. pneumoniae		≥10	11-15	≥16
Enterobactérias		≥10	11-15	≥16
Staphylococcus spp		≥10	11-15	≥16
N. meningitidis		≥25	26-30	≥31
Haemophilus influenzae e parainfluenzae		≥10	11-15	≥16
Stenotrophomonas maltophilia		≥10	11-15	≥16
Acinetobacter spp		≥10	11-15	≥16
Burkholderia cepacia		≥10	11-15	≥16
<b>Doxiciclina</b>	30µg (DOX)			
Enterobactérias		≥10	11-13	≥14
Acinetobacter spp		≥9	10-12	≥13
Staphylococcus spp		≥12	13-15	≥16
Enterococcus spp		≥12	13-15	≥16
S. pneumoniae		≥24	25-27	≥28
<b>Eritromicina</b>	15µg (ERI)			
Staphylococcus spp		≥13	14-22	≥23
Enterococcus spp		≥15	16-20	≥21
S. pneumoniae e Streptococcus spp grupo β-hemolítico/grupo viduans		≥13	14-22	≥23
<b>Ergosterina</b>	10µg (ETP)			
Haemophilus influenzae e parainfluenzae		≥19	20	≥21
Enterobactérias		≥18	19-21	≥22
Staphylococcus spp		≥15	16-18	≥19

ANTIBACTERIANOS	Padrão interpretativo Zonas de inibição em mm	Padrão interpretativo		
		RESISTENTE (b)	INTERMEDIÁRIA (c)	SENSÍVEL (d)
<b>Estreptomicina</b>	10µg (EST)			
Enterobactérias		≥11	12-14	≥15
<b>Fofomicina</b>	200µg (FOS)			
E. coli		≥12	13-16	≥17
E. faecalis		≥12	13-16	≥17
<b>Centamicina</b>	10µg (GEN)			
Enterobactérias		≥12	13-14	≥15
Acinetobacter spp		≥12	13-14	≥15
Staphylococcus spp		≥12	13-14	≥15
Pseudomonas		≥12	13-16	≥17
<b>Gemifloxacin</b>	5µg (GEM)			
Klebsiella pneumoniae		≥15	16-19	≥20
Haemophilus influenzae e parainfluenzae		≥19	20	≥21
S. pneumoniae		≥19	20-22	≥23
<b>Imipenem</b>	10µg (IPM)			
Haemophilus influenzae e parainfluenzae		≥19	20-22	≥23
Enterobactérias		≥19	20-22	≥23
Acinetobacter spp		≥18	19-21	≥22
Staphylococcus spp		≥13	14-15	≥16
Pseudomonas		≥15	16-18	≥19
<b>Levofloxacino</b>	5µg (LVX)			
Haemophilus influenzae e parainfluenzae		≥15	16-18	≥19
Staphylococcus spp		≥13	14-16	≥17
Enterobactérias exceto Salmonella spp		≥13	14-16	≥17
Acinetobacter spp		≥13	14-16	≥17
Pseudomonas		≥13	14-16	≥17
Stenotrophomonas maltophilia		≥13	14-16	≥17
S. pneumoniae e Streptococcus spp grupo β-hemolítico/grupo viduans		≥13	14-16	≥17
<b>Lomefloxacino</b>	10µg (LMX)			
S. pneumoniae e Streptococcus spp grupo β-hemolítico/grupo viduans		≥18	19-21	≥22
Staphylococcus spp		≥18	19-21	≥22
Enterobactérias		≥18	19-21	≥22
Pseudomonas		≥18	19-21	≥22
N. gonorrhoeae		≥26	27-31	≥32
<b>Lincamicina (L)</b>	2µg (LIN)			
Enterococcus spp		≥20	21	≥22
Staphylococcus spp		≥20	21-22	≥23
Enterococcus spp		≥20	21-22	≥23
<b>Meropenem</b>	10µg (MER)			
Haemophilus influenzae e parainfluenzae		≥19	20	≥21
Burkholderia cepacia		≥16	16-19	≥20
Enterobactérias		≥19	20-22	≥23
Acinetobacter spp		≥14	15-17	≥18
Staphylococcus spp		≥13	14-15	≥16
Pseudomonas		≥15	16-18	≥19
N. meningitidis		≥25	26	≥27
<b>Moxiciclina</b>	30µg (MOX)			
Enterobactérias		≥12	13-15	≥16
Acinetobacter spp		≥12	13-15	≥16
Staphylococcus spp		≥14	15-18	≥19
Enterobactérias		≥14	15-18	≥19
Stenotrophomonas maltophilia		≥14	15-18	≥19
Burkholderia cepacia		≥14	15-18	≥19
N. meningitidis		≥21	22	≥23
<b>Mupirocina</b>	5µg (MUP)			
Staphylococcus spp		≥20	21-23	≥24
Staphylococcus aureus		≥20	21-23	≥24
<b>Mupirocina (3)</b>	30µg (NAL)			
Enterobactérias		≥13	14-18	≥19
<b>Neomicina (uso tópico) (3)</b>	30µg (NEO)			
Enterobactérias		≥12	13-16	≥17
Staphylococcus spp		≥14	15-16	≥17
Enterococcus spp		≥14	15-16	≥17
Enterobactérias		≥12	13-16	≥17
Staphylococcus spp		≥12	13-16	≥17
Enterococcus spp		≥12	13-16	≥17
Pseudomonas		≥12	13-16	≥17
<b>Ofloxacina</b>	5µg (OFX)			
Pseudomonas aeruginosa		≥12	13-15	≥16
Haemophilus influenzae e parainfluenzae		≥14	15-17	≥18
S. pneumoniae e Streptococcus spp grupo β-hemolítico/grupo viduans		≥12	13-16	≥17
N. gonorrhoeae		≥24	25-30	≥31
<b>Pefloxacina (P)</b>	5µg (PEF)			
Staphylococcus spp		≥15	16-18	≥19
<b>Penicilina</b>	10UI (PEN)			
Staphylococcus β-lactamase positiva		≥28	29	≥30
Enterococcus spp		≥14	15	≥16
Streptococcus spp grupo β-hemolítico exceto S. pneumoniae		≥28	29	≥30
N. gonorrhoeae		≥28	29-46	≥47
<b>Pipemidico Ac (8)</b>	20µg (PIP)			
Haemophilus influenzae e parainfluenzae		≥10	11-13	≥14
Pseudomonas		≥11	12	≥13
<b>Piperacilina + Tazobactam</b>	100/10µg (PPT)			
Haemophilus influenzae e parainfluenzae		≥17	18-20	≥21
Enterobactérias		≥17	18-20	≥21
Acinetobacter spp		≥17	18-20	≥21
Pseudomonas aeruginosa		≥14		