UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

PADRÃO CLONAL E PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE CEPAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE ALIMENTOS E DE ESPÉCIMES CLÍNICAS

DANIELA BENEVIDES MELO

Salvador-BA
2010

DANIELA BENEVIDES MELO

PADRÃO CLONAL E PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE CEPAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE ALIMENTOS E DE ESPÉCIMES CLÍNICAS

Orientador(a): Prof. Drª Alaíse Gil Guimarães

Co-orientador: Prof. Drª Joice Neves Reis Pedreira

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, para obtenção do título de Mestre.

Salvador-BA

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Padrão clonal e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* isoladas de alimentos e de espécimes clínicas
Autor: Daniela Benevides Melo
Orientador: Prof. Drª Alaíse Gil Guimarães
Co-orientador: Prof. Drª Joice Neves Reis Pedreira

Aprovada em: 31 de Agosto de 2010.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Celso D. C. Filho FFAR- UFBA	Prof. Drª Tânia Fraga Barros FFAR-UFBA

Prof. Drª Alaíse Gil Guimarães
Orientador FFAR-UFBA

Ao meu pai, que infelizmente não viveu para
presenciar mais esta vitória em minha vida.
Nem em seus mais remotos sonhos imaginou
que eu iria tão longe.
Dedico

"Do rio que tudo arrasta se diz que é violento,
mas ninguém diz violentas as margens que o comprimem"
Bertolt Brecht

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser força sempre presente conduzindo meus passos e ações.

À minha família pelo amor e compreensão.

Ao meu marido Filipe Leão Marques por ser meu grande incentivador, pelo companheirismo e amor dedicados.

Aos meus amigos por terem entendido minha ausência durante a realização deste trabalho.

Aos colegas do mestrado por terem tornado essa jornada mais leve, pelos muitos momentos de descontração, desabafos, encontros e comemorações.

A Prof. Drª. Alaíse Gil Guimarães, pela orientação, confiança e paciência dispensados durante a realização deste trabalho.

A Prof.Drª Joice Neves Reis Pedreira, pela co-orientação e possibilidade de me fazer avançar em áreas até então desconhecidas.

Ao Laboratório Central de Saúde Pública Prof. Gonçalo Moniz, pela disponibilidade do laboratório e materiais necessários a realização das análises.

As colegas de trabalho no Laboratório de Microbiologia de Alimentos e a todos os colegas do LACEN-BA pelo apoio, incentivo e compreensão.

Ao Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM) da FIOCRUZ, especialmente, Jailton Azevedo, Milena Soares, Soraia Cordeiro e Gisele Rocha, pelo auxilio na realização das análises.

A Ana Paula de Oliveira Menezes (LPBM-FIOCRUZ), pela preciosa e imprescindível ajuda durante a realização das análises moleculares.

A FAPESB - Ministério da Saúde pelo financiamento do projeto.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse possível.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS ..... **vii**
LISTA DE FIGURAS ..... **viii**

INTRODUÇÃO GERAL **9**
OBJETIVOS GERAIS **11**

CAPÍTULO 01: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **12**

1. DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (DTA) **13**
1.2. Principais agentes 14
1.3. Ocorrência 15
1.4. Medidas de Prevenção e Controle 17
2. ESCHERICHIA COLI **18**
2.1. Caracterização 18
2.2. Patogenecidade 18
2.3. Resistência a antibióticos 20
3. RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS **21**
3.1. Conceituação e Histórico 21
3.2. Transferência de genes de resistência 22
3.3. Uso não humano de antimicrobianos 23
3.4. Medidas de prevenção e controle de resistência 27
4. BIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR **28**
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **32**

CAPÍTULO 02: PADRÃO CLONAL POR PFGE E PERFIL DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE CEPAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE ALIMENTOS E DE ESPÉCIMES CLÍNICAS **42**

RESUMO **43**
1. INTRODUÇÃO **44**
2. MATERIAL E MÉTODOS **45**
2.1. Cepas de *Escherichia coli* 45
2.2. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos 45
2.3. Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) 46
2.4. Análise de dados 47
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO **49**
3.1. Perfil de sensibilidade 49
3.2. Padrão clonal 57
4. CONCLUSÕES **63**
ABSTRACT **65**
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **66**

CONCLUSÕES GERAIS **70**

APÊNDICES **71**

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 01

Tabela 01 ï Lista dos aditivos proibidos na alimentação animal e legislação correspondente..... 25

Tabela 02 ï Agentes antimicrobianos autorizados para uso em ração animal e espécies a que se destinam..... 26

CAPÍTULO 02

Tabela 01 ï Critérios para interpretação dos padrões de PFGE, segundo Tenover et al. (1995)..... 48

Tabela 02 ï Perfil de resistência aos antimicrobianos das 84 cepas de *Escherichia coli* avaliadas..... 50

Tabela 03 ï Prevalência de resistência de cepas de *Escherichia coli* isoladas de amostras clínicas e de alimentos..... 52

Tabela 04 ï Perfil de multirresistência aos antimicrobianos testados das cepas de *Escherichia coli* de espécimes clínicas e isoladas de alimentos..... 54

Tabela 05 ï Origem das cepas de *E. coli* isoladas de alimentos e sua resistência aos antimicrobianos testados..... 55

Tabela 06 ï Distribuição dos padrões de resistência encontrados entre cepas de espécimes clínicas e isoladas de alimentos..... 56

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 02

Figura 01 - Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* isoladas de amostras clínicas e de alimentos..... 49

Figura 02 ï Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* isoladas de amostras clínicas..... 50

Figura 03 ï Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* isoladas de alimentos..... 51

Figura 04 - Dendrograma gerado pelo software GelCompar II mostrando, através do coeficiente de Dice, a relação entre os 31 perfis representativos dos isolados de *Escherichia coli* clínicos e de alimentos..... 58

Figura 05 - Dendrograma gerado pelo software GelCompar II mostrando, através do coeficiente de Dice, a relação entre os 13 perfis representativos dos isolados de *Escherichia coli* oriundos de alimentos resistentes aos antimicrobianos..... 60

Figura 06 - Dendrograma gerado pelo software GelCompar II mostrando, através do coeficiente de Dice, a relação entre os 18 perfis representativos dos isolados clínicos de *Escherichia coli* resistentes aos antimicrobianos..... 61

INTRODUÇÃO GERAL

As doenças de origem alimentar despertam preocupações entre vários organismos nacionais e internacionais de proteção e promoção da saúde são responsáveis por elevados níveis de morbidade e mortalidade na população em geral, mas particularmente para os grupos de risco, como crianças e jovens, lactentes, idosos e imunodeprimidos (WHO, 2010a).

Cada vez mais aumenta o número de microrganismos que podem ser veiculados através dos alimentos trazendo sérios riscos à saúde publica. Além disso, muitas doenças tidas como controladas tem ressurgido, deixando em alerta estudiosos e autoridades em saúde de todo o mundo.

Os alimentos quando produzidos, transportados e comercializados sem os devidos cuidados higiênico-sanitários podem constituir fonte de contaminação de microrganismos comensais e/ou patogênicos que são transmitidos ao homem por ingestão ou contato, podendo, estes últimos, provocar diversas patologias.

Dentre os principais microrganismos que podem ser veiculados pelos alimentos estão as bactérias e suas toxinas: *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio* spp.; os vírus: Norovírus, Rotavírus, hepatite A; e os fungos produtores de micotoxinas: *Aspergillus* spp. *Fusarium* spp., *Claviceps* spp. (FRANCO e LANDGRAF, 2006).

A *Escherichia coli* tem obtido destaque entre os patógenos alimentares, principalmente em países desenvolvidos, pelas suas características de virulência, especialmente o sorotipo O157:H7 que produz uma potente toxina causando doença severa, entre elas a síndrome urêmico hemolítica. Este sorotipo foi responsável por diversos surtos alimentares nos Estados Unidos entre os anos de 2006 e 2009 (CDC, 2010).

Por ser uma bactéria presente na flora intestinal de homens e animais, a *E. coli* é bem difundida no ambiente e pode ser encontrada como contaminante do solo, água e plantas (ANDRADE et al., 2008).

Devido as características de seu genoma e rápido tempo de geração a *E. coli* funciona como microrganismo modelo para diversos estudos, inclusive de resistência a antimicrobianos.

Cepas comensais podem carrear genes de resistência e transferi-los a microrganismos patogênicos através de seus processos de trocas de materiais genéticos e comunicação celular.

A resistência antimicrobiana é um problema global de saúde pública que é impactado pelo uso de antimicrobianos em humanos e não-humanos. O aparecimento contínuo, o desenvolvimento e a disseminação de organismos patogênicos que são resistentes aos antimicrobianos são motivo de preocupação crescente. O envolvimento da Organização Mundial da Saúde (OMS) na contenção da resistência antimicrobiana, devido ao uso não-humano de antimicrobianos remonta à década de 1990 (WHO, 2010b).

As pesquisas sobre resistência microbiana avançam não só na busca de organismos resistentes, mas também no modo como adquiriram esta característica e na possibilidade de passarem adiante essa informação.

Neste sentido, muitos estudos epidemiológicos têm sido conduzidos, especialmente aqueles relativos às características genéticas dos microrganismos, pois são mais específicos na determinação de ligações epidemiológicas entre eles. Atualmente, as ferramentas de tipagem molecular têm se tornado essenciais na avaliação de inter-relações entre microrganismos em pesquisas epidemiológico-moleculares, auxiliando também a elucidação de surtos de doenças.

Sendo assim, considerando a possibilidade de transferência de genes de resistência entre microrganismos; que a *Escherichia coli* se presta bem a esse papel e a ausência de informações desta natureza, este estudo é pioneiro na investigação da relação entre bactérias isoladas de humanos e de alimentos no Estado da Bahia, buscando avaliar seu perfil de sensibilidade aos antimicrobianos bem como evidências de ligações epidemiológicas entre as mesmas.

OBJETIVOS GERAIS

1. Objetivo Geral

Investigar a relação entre cepas de *Escherichia coli* isoladas de humanos e de alimentos no Estado da Bahia, buscando avaliar seu perfil de sensibilidade aos antimicrobianos bem como evidências de ligações epidemiológicas entre as mesmas.

2. Objetivos Específicos

2.1. Determinar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das cepas de *E. coli* isoladas de alimentos e espécimes clínicos;

2.2. Realizar tipagem molecular por Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) de *E. coli* isoladas de alimentos e de espécimes clínicos que forem resistentes aos antimicrobianos;

2.3. Estabelecer através de perfis clonais a relação epidemiológica entre cepas resistentes de alimentos e de espécimes clínicos.

CAPÍTULO 01
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (DTA)

1.1. Histórico

A contaminação dos alimentos é conhecida desde tempos remotos. Em 2000 a.C., Moisés determinou algumas leis sobre métodos de preparo dos alimentos (incluindo aqueles que se podia comer e os que se deveria rejeitar), bem como a importância da limpeza das mãos antes de ingerir os alimentos (BRASIL, 2005).

O homem durante sua vida está sujeito a contrair um número elevado de doenças de origem alimentar. Cerca de 250 diferentes tipos de doenças podem ser veiculadas ao homem por alimentos contaminados (CDC, 2005).

Doença transmitida por alimento é causada pela ingestão de um alimento contaminado por um agente infeccioso específico, ou pela toxina por ele produzida, por meio da transmissão desse agente ou de seu produto tóxico (BRASIL, 2001).

De acordo com o Ministério da Saúde (BRASIL, 2009) as doenças transmitidas por alimentos podem ser divididas em: infecções, intoxicações, toxinfecções e ainda as intoxicações não bacterianas. As infecções são causadas pela ingestão de microrganismos patogênicos, denominados invasivos, com capacidade de penetrar e invadir tecidos. As intoxicações são provocadas pela ingestão de toxinas pré-formadas no alimento em decorrência da intensa proliferação do microrganismo. Já as toxinfecções são causadas por microrganismos toxigênicos, que quando se multiplicam, esporulam ou sofrem lise liberam toxinas na luz intestinal. As intoxicações não bacterianas ocorrem quando outros agentes, que não microrganismos, estão envolvidos em surtos de DTA.

Apesar dos esforços significativos por todas as partes envolvidas, ainda há uma carga considerável de doenças transmitidas por alimentos, em que os microrganismos desempenham um papel proeminente. Os microrganismos podem entrar na cadeia alimentar em diferentes etapas, são altamente versáteis e são capazes de se adaptar ao ambiente que permita a

sobrevivência, crescimento e produção de compostos tóxicos (HAVELAAR et al., 2010).

1.2. Principais agentes

Os agentes patogênicos, responsáveis por doenças de origem alimentar, têm evoluído através dos tempos, desenvolvendo estratégias eficientes e eficazes para explorar os alimentos, no todo ou em partes, como veículos de transferência entre hospedeiros humanos ou entre humanos e animais (NEWELL, 2010).

A ingestão de alimentos contaminados com microrganismos patogênicos se dá, muitas vezes, pelo fato de que eles apresentam aspecto, odor e sabor normais e o consumidor não está devidamente esclarecido ou consciente dos perigos envolvidos. Este fato também dificulta a investigação dos surtos notificados, pois o consumidor não consegue identificar qual alimento poderia estar contaminado em suas últimas refeições (FORSYTHE, 2002).

Novas ameaças de doenças de origem alimentar decorrem do modelo econômico vigente, com o aumento em viagens e negócios inter-regionais e internacionais, que favorecem a disseminação de patógenos, ou mesmo de mudanças nos sistemas de produção de alimentos e adaptações na população microbiana, que podem levar à evolução de novos microrganismos, com o desenvolvimento de novos fatores de virulência e resistência a antimicrobianos (KÄFERSTEIN e ABDUSSALAM,1999; SCHLUNDT et al, 2004).

Estudos desenvolvidos em diversos países, afirmam que a contaminação microbiana dos alimentos é fato incontestável, sendo identificada a veiculação de microrganismos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes, Bacillus cerus e Vibrio cholerae* entre outros (MULETA e ASHENAFI, 2001; GARIN et al., 2002).

Alimentos de origem animal, como ovos, carnes, leite e seus derivados são os mais frequentemente envolvidos em surtos de DTA. Os

agentes patogênicos veiculados por eles são na maioria bactérias (GERMANO e GERMANO, 2008).

Alguns pesquisadores estimam que *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, *L. monocytogenes* sejam a causa de 3,5 milhões de casos de DTA com 33.000 hospitalizações e 1.600 mortes a cada ano, nos Estados Unidos, onde as DTA são reconhecidas e bastante divulgadas como relevante problema de saúde pública (TAUXE, 2002; SUN e OCKERMAN, 2005).

O principal reservatório de agentes zoonóticos é o trato gastrintestinal de animais saudáveis destinados à produção de alimentos e a maioria das doenças de origem alimentar é proveniente da contaminação fecal durante o abate ou de contaminação cruzada durante o processamento (AARESTRUP e WEGENER, 1999).

Dentre os principais patógenos oriundos do sistema digestivo de animais e do homem e responsáveis por episódios de doença veiculada por alimentos estão a *Escherichia coli* e *Salmonella* spp.

1.3. Ocorrência

Os principais fatores que contribuem para os surtos de origem alimentar são a temperatura inadequada de armazenagem, tempo e temperatura de cozimento incorretos, equipamentos e utensílios contaminados, matéria-prima de qualidade insatisfatória e más condições higiênicas dos manipuladores (ANDRADE et al., 2008).

As doenças transmitidas por alimentos são responsáveis atualmente pela maior parte dos surtos de diarréia em quase todos os países. O desenvolvimento econômico e a globalização do mercado mundial, as alterações nos hábitos alimentares, com a crescente utilização de alimentos industrializados ou preparados fora de casa, alteraram o perfil epidemiológico dessas doenças, expondo a população a vários tipos de contaminantes (CVE, 2005).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que cerca de 2,2 milhões de pessoas morrem anualmente nos países menos desenvolvidos em

decorrência de doenças diarréicas de origem alimentar e hídrica, das quais cerca de 1,9 milhões são crianças (WHO, 2009).

Nos últimos anos, a ocorrência de doenças transmitidas por alimentos tem sido foco de discussões, devido à preocupação mundial com estratégias que permitam seu controle e, conseqüentemente, garantam a colocação de produtos seguros no mercado consumidor (SHINOHARA et al., 2008).

De acordo com dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2008) no período de 1999 a 2008 ocorreram no Brasil 6.062 surtos de doenças transmitidas por alimentos, com 117.330 pessoas acometidas e 64 óbitos. Neste período, o Estado da Bahia notificou apenas 44 surtos. O principal agente implicado no desencadeamento destas enfermidades foi a *Salmonella* spp. sendo responsável por 42,9% dos surtos registrados.

Contudo, esses números são subestimados, pois a subnotificação de surtos é grande. De acordo com Forsythe (2002), somente 10% do total de surtos de origem alimentar são notificados no Brasil, devido às falhas no sistema de notificação e de fiscalização.

O CDC (Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos) estima que 97% de todos os casos de toxinfecção alimentar são causados por manipulação inadequada dos alimentos; 79% são de alimentos preparados em estabelecimentos comerciais ou instituições e 21% por alimentos preparados nas residências.

No Brasil, cerca de 45% dos casos de surtos de DTA ocorrem nas residências e em seguida aparecem os restaurantes com 19% e instituições de ensino 10% (BRASIL, 2008). O consumo de carne crua ou mal passada e a falta de práticas seguras de manipulação para prevenir contaminação cruzada são considerados fatores críticos para a ocorrência de infecções em níveis domésticos (ZHAO et al., 2003).

Este fato é corroborado por Almeida et al. (2008) e Welker et al. (2010) pois os produtos cárneos foram os principais responsáveis por surtos nos estados da Paraíba e do Rio Grande do Sul, respectivamente. Em âmbito nacional, os dados divergem destes onde as carnes ocupam a terceira posição entre os alimentos mais frequentemente associados a surtos, ficando os ovos crus ou mal cozidos na liderança (BRASIL, 2008).

1.4. Medidas de Prevenção e Controle

A identificação e investigação de surtos causados por alimentos é um componente essencial na prevenção e no controle das DTA. Surtos sem esclarecimento etiológico geralmente têm como causas a notificação tardia, a ausência de coleta de amostras clínicas e/ou de alimentos em tempo oportuno, ou testes laboratoriais inadequados (EDUARDO et al. 2003).

O Manual de Integrado de Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por Alimentos, do Ministério da Saúde traz como principais medidas de prevenção e controle de surtos de DTA (BRASIL, 2009):

- estímulo a notificação dos surtos;
- análise e avaliação da cadeia alimentar dos alimentos envolvidos, identificando pontos críticos para o controle;
- educação continuada dos profissionais envolvidos no processo de produção e serviços, com ênfase no Sistema APPCC;
- estímulo a implantação e implementação de normas e rotinas referentes ao assunto;
- educação sanitária como forma de garantir o acesso da população às informações e conhecimentos necessários à prevenção e controle dos surtos;

A conscientização dos manipuladores, dos processadores, enfim, daqueles que de uma forma ou de outra trabalham com alimentos contribui para evitar ou diminuir os surtos de doenças causadas por alimentos. Além disso, a postura do profissional da área de alimentos deve ser eminentemente preventiva, no sentido de evitar que estes surtos ocorram (ANDRADE et al., 2008).

2. *ESCHERICHIA COLI*

2.1. Caracterização

A bactéria *Escherichia coli,* como hoje se conhece, foi descrita pela primeira vez pelo pediatra bávaro Theodor Escherich, no final do século XIX. Em uma série de estudos pioneiros, o Dr. Escherich descreveu um habitante comum da flora intestinal dos bebês, a que chamou de *Bacterium coli* comum, vindo mais tarde a ser renomeado em sua homenagem (KAPER, 2005).

A *E. coli* é uma bactéria pertencente à família Enterobacteriaceae e entre suas principais características destacam-se: bacilos Gram negativos, não esporulados, anaeróbios facultativos, capazes de fermentar glicose com produção de ácido e gás. A maioria fermenta também a lactose (FRANCO e LANDGRAF, 2006).

Comumente presente no trato intestinal de humanos e animais a *E. coli* é frequentemente encontrada em solo, água, e gêneros alimentícios, como resultado de contaminação fecal ou contaminação durante o abate de animais destinados à alimentação humana (SCHROEDER et al., 2002).

A espécie permanece geralmente confinada, inofensiva ao lúmen intestinal, muito embora cepas patogênicas de *E. coli* tenham sido descritas desde o início do século XX sendo responsáveis por doenças dos sistemas nervoso central, gastrintestinal e urinário mesmo nos humanos mais sadios (NATARO e KAPER, 1998).

2.2. Patogenecidade

Em 1945, o pediatra John Bray foi o primeiro a definir um subgrupo de *E. coli* que estava associado a uma doença em particular: a síndrome diarréica infantil. Este subgrupo conhecido como *E. coli* enteropatogênica foi definido e diagnosticado com base em sorotipagem no início dos anos 80 (KAPER, 2005).

Cepas patogênicas de *E. coli*, que adquiriram fatores de virulência, tem a capacidade de causar diarréia em humanos. Estas cepas são geralmente

classificadas em patótipos, baseados em suas características de virulência (LOPEZ-SAUCEDO et al., 2003; NATARO e KAPER, 1998).

Os sorotipos patogênicos de *Escherichia coli* estão associados à gastrenterites caracterizadas pelos sintomas de vômito, febre, náuseas, dor abdominal, calafrios, desidratação e diarréia que ocorrem de 12 a 24 horas após a ingestão de água ou alimentos contaminados (FORSYTHE, 2002; WHO, 2002)

De acordo com os mecanismos de patogenecidade implicados, sete classes de patótipos, ou patovares, são individualmente responsáveis por casos de diarréia em humanos: as *E. coli* enteropatogênicas (EPEC), EPEC atípicas (ATEC), enteroinvasivas (EIEC), enterotoxigênicas (ETEC), enteroagregativas (EAgEC), aderência difusa (DAEC), supressão de lócus eritrocitário (LEE) positiva e LEE negativa produtoras de toxina Shiga (STEC) (GERMANI e LE BOUGUENÉC, 2008).

Cada cepa possui um conjunto distinto de fatores de virulência associados que determinam as características clínicas, patológicas e epidemiológicas das doenças que causam (ROBINS-BROWNE e HARTLAND, 2002).

Mais de 200 sorotipos de *E. coli* foram descritos como produtores de toxina Shiga, no entanto, a maioria destes não é patogênica na ausência de outros fatores de virulência (KAPER, 2005).

Desde o primeiro relato de sua ocorrência a *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) tem emergido como um importante problema de saúde pública. O surgimento do patótipo entero-hemorrágico (EHEC) como um dos principais patógenos para humanos iniciou-se com a identificação do sorotipo O157:H7 no início da década de 80 como causa de vários surtos de doenças veiculadas por alimentos, com enfermidades intestinais severas. Este patótipo é considerado como um subgrupo de STEC (THORPE, 2004; NAYLOR et al., 2005; KARCH et al. 2005).

Estudos sobre a origem dos surtos humanos revelaram que a principal fonte deste microrganismo é o trato gastrointestinal dos ruminantes e uma variedade de rotas de transmissão para os seres humanos foi identificada (NAYLOR *et al*., 2005).

O homem pode se infectar por STEC através da ingestão de alimentos de origem animal contaminados, principalmente carne bovina, o que tornou esta categoria de *E. coli* objeto de estudos na medicina humana, veterinária e na biologia molecular (MAINIL e DAUBE, 2005).

As infecções humanas por STEC cursam com diarréia aquosa, cólicas e dor abdominal por aproximadamente três dias, evoluindo para sintomas mais graves com presença de sangue nas fezes podendo, até mesmo, evoluir para colite hemorrágica e síndrome urêmico hemolítica (KARCH et al., 2005; NAYLOR et al., 2005)

Embora no Brasil oficialmente não haja nenhum surto por *E. coli* O157:H7 registrado, Rigobelo et al. (2006) encontraram 1,2% de positividade para *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), em cepas isoladas de carcaças bovinas num frigorífico na cidade de São Paulo. Além disso, as cepas isoladas apresentaram um alto nível de resistência a dois ou mais agentes antimicrobianos.

Também na cidade de São Paulo Bergamini et al. (2007) encontraram cepas de STEC em amostras de carne moída *in natura* avaliadas, porém nenhuma pertencente ao sorogrupo O157:H7.

2.3. Resistência aos antibióticos

O aparecimento de cepas de *E. coli,* de origens variadas, multirresistentes aos antibióticos foi relatado em diversos países (SAÉNZ et al., 2004; HOYLE et al., 2005; RIGOBELO et al., 2006; MENDONÇA et al., 2007; COSTA et al., 2008; KNEZEVIC e PETROVIC, 2008) e constitui uma séria preocupação para a saúde pública, pois dificulta ou mesmo inviabiliza o tratamento de doenças causadas por estas cepas resistentes.

Assim, tem aumentado as pesquisas em buscas de novas drogas que sejam eficazes contra microrganismos que apresentam resistência aos antimicrobianos já utilizados em terapêutica humana e veterinária (AKSOY e UNAL, 2008; GALINIER et al., 2008; GUALTIERI et al., 2009; YUAN et al., 2010; DEKIĹ et al., 2010).

No Brasil, cepas de *E. coli* resistentes tem sido identificadas em diversas fontes tais como dejetos suínos (SILVA et al., 2008), e de cães (SIQUEIRA et al., 2008), ostras e água do seu cultivo (VIEIRA et al., 2008), leite (MOREIRA et al., 2008), produtos de origem animal (MARTINS et al, 2003; CAMPOS et al., 2006;) e seres humanos (NEVES et al., 2008).

3. RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

3.1. Conceituação e Histórico

Antimicrobiano é qualquer substância de origem natural, semi-sintéticos ou sintéticos que, em concentrações ñ*in vivo*ò, elimina ou inibe o crescimento de microrganismos, interagindo com um alvo específico (CODEX, 2008).

A descoberta da penicilina pelo médico inglês Alexander Fleming em 1928 é um marco no estudo dos antimicrobianos. Durante seus estudos, Fleming viajou e deixou placas com cultura de *Staphylococcus aureus* que se contaminaram acidentalmente pelo fungo *Penicillium notatum*. Ao retornar, o médico observou que ao redor do crescimento do fungo havia um halo de inibição da cultura inicial. A partir deste achado se intensificaram os estudos para isolamento e purificação desta substância (KENNEDY, 2004)

Os antibióticos são usados ñ*in vivo*ò na medicina humana ou animal para eliminar ou inibir o crescimento de microrganismos patogênicos dentro dos tecidos vivos ou de órgãos para que o sistema imune do hospedeiro possa ter controle sobre os agentes patogênicos e eliminá-los (CERF et al., 2010).

A atuação dos antibióticos ocorre através da inibição de processos essenciais a multiplicação da célula bacteriana e, em última instância, a sua sobrevivência. Podem ser classificados em diferentes grupos em função da sua estrutura alvo na célula bacteriana, diferenciando-se em inibidores da membrana citoplasmática, inibidores da síntese de ácidos nucléicos, da síntese proteica ou da síntese da parede celular (MURRAY et al., 2005).

A resistência microbiana se caracteriza pela capacidade dos microrganismos de multiplicar-se em presença de concentrações de

antimicrobianos mais altas do que as que provem de doses terapêuticas dadas a humanos (WANNMACHER, 2004).

A resistência a antimicrobianos é um fenômeno biológico natural. À medida que agentes antimicrobianos são incorporados às práticas clínicas, cepas de microrganismos resistentes são detectadas em laboratório (WHO, 2001).

Os primeiros estudos reportando resistência datam da década de 50. Kitamoto et al. (1965) estudando cepas de *Shigella* isoladas em 1955, de casos de disenteria bacilar no Japão, constataram resistência à estreptomicina, sulfadiazina, tetraciclina e cloranfenicol.

Nos últimos anos mais e mais bactérias com novas características de resistência apareceram pelo mundo, mesmo para quimioterápicos como glicopeptídeos e quinolonas até então considerados eficazes (COOKSON, 2002).

3.2. Transferência de genes de resistência

A transferência de genes de resistência entre bactérias foi descrita pela primeira vez por Smith (1969) em estudo desenvolvido com *E. coli* do trato digestivo de humanos e animais. Cepas de *E. coli* resistentes foram dadas por via oral a uma pessoa e *E. coli* comensais de sua microbiota foram avaliadas posteriormente constatando-se perfil de resistência entre as mesmas. Este achado vem sendo confirmado por diversos estudos ao longo dos anos (AARESTRUP e WEGENER, 1999; WINOKUR et al., 2001; ÂNGULO et al., 2004; WANG et al., 2006)

Bactérias comensais constituem um potencial reservatório de genes de resistência para bactérias patogênicas. Seu nível de resistência é considerado um bom indicador da pressão de seleção pelo uso de antibióticos e para possíveis problemas de resistência em patógenos. O monitoramento da prevalência de resistência em bactérias indicadoras como *Escherichia coli* e enterococos em diferentes populações, animais, pacientes e pessoas saudáveis torna possível comparar a prevalência de resistência, bem como detectar transferência de bactérias resistentes ou genes de resistência dos

animais aos humanos e vice versa (VAN DEN BOGAARD e STOBBERINGH, 2000).

Particularmente as *E. coli* comensais podem transferir sua resistência no meio gastrintestinal, especialmente quando ocorre exposição a antimicrobianos, determinando alta prevalência de resistência; neste caso elementos móveis, como plasmídeos, contribuem significativamente para propagação de resistência (SMITH et al., 2007). Neste contexto a *Escherichia coli* é considerada um importante indicador bacteriano que pode ser utilizado para avaliar a evolução de resistência a antimicrobianos em diferentes ecossistemas (COSTA et al., 2008).

As bactérias tornam-se resistentes aos antibióticos desenvolvendo mecanismos de resistência que impedem o antimicrobiano de exercer seu mecanismo de ação. Estes mecanismos resultam de modificações no alvo da droga, inativação do antibiótico por enzimas, modificações bacterianas que impedem a chegada do antibiótico ao sítio de ação como impermeabilidade da membrana citoplasmática ou ainda existência de proteínas de efluxo (NIKAIDO, 2009).

Estudos desenvolvidos por Saénz et al. (2004) mostraram uma grande variedade de genes de resistência em cepas de *E. coli* multirresistentes não patogênicas de seres humanos, animais, e produtos alimentares. Portanto, essa flora normal pode desempenhar um papel chave como receptor e doador de mecanismos de resistência a antimicrobianos.

3.3. Uso não humano de antimicrobianos

A moderna produção de alimentos de origem animal depende do uso de grandes quantidades de antibióticos para o controle de enfermidades. Isto fornece circunstâncias favoráveis para a seleção, propagação e persistência das bactérias zoonóticas resistentes aos antimicrobianos tais como *Campylobacter* e *Escherichia coli* O157 (AARESTRUP e WEGENER, 1999).

O uso não-humano de antimicrobianos (que inclui a utilização nos alimentos para animais, animais de companhia, aquicultura e horticultura) pode ser dividido em terapêutico, metafilático, profilático e promotor de crescimento.

Os promotores de crescimento são normalmente administrados em concentrações relativamente baixas, variando de 2,5 a 125 mg / kg (ppm), dependendo da droga e espécies tratadas (WHO, 2003).

Alguns microrganismos do trato intestinal dos animais que recebem antimicrobianos como promotores de crescimento na dieta desenvolvem resistência em relação a esses compostos. Em seguida, existe a possibilidade de que bactérias resistentes sejam ocasionalmente transferidas para os criadores de gado no ambiente de criação ou pelo contato direto com os animais (KATSUNUMA et al., 2007).

Mesmo em países como a Islândia, onde antimicrobianos são terminantemente proibidos como promotores de crescimento, há relatos de cepas de *E. coli* multirresistentes isoladas de animais (THORSTEINSDOTTIR, et al., 2010).

O uso de agentes antimicrobianos nos alimentos para animais é mais claramente associado à resistência antimicrobiana em cepas de *Salmonella* e *Campylobacter* isoladas de humanos, mas também pode estar envolvido na resistência entre enterococos, *Escherichia coli* e outras bactérias (ANGULO et al., 2004).

A administração da mesma classe de antibiótico em medicina humana e veterinária pode promover o desenvolvimento de resistência cruzada, e a terapia de infecções causadas por cepas resistentes originários de animais pode falhar se os antibióticos da mesma classe são usados em seres humanos (MEYER et al., 2008).

Na França, Moulin et al. (2008) constataram que os mesmos princípios ativos antimicrobianos são utilizados na medicina humana e veterinária, entretanto em padrões quantitativos diferentes. Enquanto na medicina veterinária a classe mais utilizada é a das tetraciclinas, na medicina humana os ƀ-lactâmicos são predominantes.

No Brasil, é vedado o uso dos antimicrobianos anfenicóis, tetraciclinas, ƀ-lactâmicos (benzilpenicilâmicos e cefalosporinas), quinolonas e sulfonamidas sistêmicas como aditivos alimentares, promotores de crescimento ou como conservantes de alimentos para animais (BRASIL, 2009) (Tabela 01).

Tabela 01 ï Lista dos aditivos proibidos na alimentação animal e legislação correspondente.

ADITIVO	LEGISLAÇÃO
Avoparcina	Of. Circular DFPA Nº 047/98
Cloranfenicol e Nitrofuranos	Instrução Normativa 09, 27/06/2003
Arsenicais e antimoniais	Portaria 31, 29/01/2002
Penicilina, tetraciclinas, sulfonamidas sistêmicas	Instrução Normativa 26, 09/07/2009
Olaquindox	Instrução Normativa 11, 24/11/2004
Violeta Genciana	Instrução Normativa 34, 13/09/2007
Carbadox	Instrução Normativa 35, 14/11/2005
Anabolizantes para bovinos	Instrução Normativa 10, 27/04/2001
Hormônios como aditivos alimentar em aves	Instrução Normativa 17, 18/06/2004

Fonte: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2007.

Outras classes de antimicrobianos podem ser utilizadas desde que haja estudos de eficácia e segurança do uso e há regulamentação no Brasil para o emprego de alguns antimicrobianos em rações para animais (Tabela 02).

No entanto, Aarestrup et al. (1998) já relataram, desde a década de 90, ocorrência de resistência de bactérias patogênicas e comensais a muitos destes antimicrobianos aprovados para aplicação em rações no Brasil.

Os alimentos, notadamente os de origem animal, são um importante veículo para o incremento de patógenos gastrintestinais resistentes a antibióticos como, por exemplo, *Campylobacter jejuni* e *Salmonella enterica*. Em relação à *S. enterica*, os produtos avícolas são os mais implicados na transmissão deste patógeno (RIANO et al., 2006).

Quando os animais recebem antibióticos como aditivos alimentares promotores de crescimento em suas rações a pressão de seleção para o desenvolvimento de resistência a antimicrobianos pelas bactérias pode ser maior nos animais do que nos humanos na mesma fazenda (KATSUNUMA et al., 2008).

Tabela 02 ï Agentes antimicrobianos autorizados para uso em ração animal e espécies a que se destinam.

Antimicrobianos	Espécies animais
AVILAMICINA	Frangos de corte, frangas de reposição, perus de corte, suínos
BACITRACINA METILENO DISALICILATO	Frangos de corte, galinhas poedeiras, perus de corte e suínos
BACITRACINA DE ZINCO	Frangos de corte, galinhas poedeiras, perus de corte,codornas de corte, suínos e bovinos em confinamento
COLISTINA (SULFATO DE)	Frangos de corte, galinhas poedeiras, suínos e bovinos
CLOREXIDINA (CLORIDRATO DE)	Frangos de corte, galinhas reprodutoras ou poedeiras e suínos
ENRAMICINA	Frangos de corte, galinhas poedeiras e suínos
ERITROMICINA	Suínos
ESPIRAMICINA	Frangos de corte, suínos e bezerros
FLAVOMICINA (FLAVOFOSFOLIPOL OU BAMBERMICINA)	Frangos de corte, perus de corte, suínos, coelhos e bovinos (novilhos)
HALQUINOL (CLOROHIDROXIQUINOLINA)	Frangos de corte, galinhas reprodutoras ou poedeiras e suínos
LASALOCIDA	Bovinos e vacas
LINCOMICINA	Frangos de corte e suínos
MONENSINA SÓDICA	Bovinos, vacas e ovinos
SALINOMICINA SÓDICA	Suínos e bovinos de corte
TIAMULINA (FUMARATO HIDROGÊNIO DE)	Suínos
TILOSINA (FOSFATO OU TARTARATO DE)	Frangos de corte, galinhas reprodutoras ou poedeiras e suínos
VIRGINAMICINA	Frangos de corte, perus de corte, suínos, e bovinos

Fonte: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2007.

Bactérias de origem animal podem atingir a população humana de várias formas: contaminação de fontes hídricas, contaminações no abate, efluentes de granjas e outros. Isto se torna particularmente importante com bactérias entéricas. Indivíduos que são mais expostos, como trabalhadores da indústria da carne, tratadores de animais e veterinários, costumam ter um grau de resistência a antimicrobianos maior do que a população em geral (VAZ, 2009).

A população humana torna-se colonizada e/ou infectada através do contato, exposição ocupacional ou pela cadeia alimentar. Além da transmissão de bactérias resistentes, genes de resistência da flora bacteriana residente em animais podem ser transferidos para patógenos que possivelmente infectam humanos (von BAUM e MARRE, 2005).

3.4. Medidas de prevenção e controle de resistência

A Organização Mundial de Saúde apontou um alarmante incremento na resistência a uma gama de antibióticos entre salmonelas isoladas de animais e humanos em pesquisas de todo o mundo, com uma combinação de múltipla resistência a ampicilina, sulfonamidas, estreptomicina, cloranfenicol e tetraciclinas (BRISABOIS et al., 1997)

Na última década, particularmente nos países em desenvolvimento, o aumento da resistência de salmonelas não tifóides oriundas de animais aos antibióticos de amplo espectro como cefalosporinas, tetraciclina e quinolonas tem sido extremamente preocupante (STREIT at al., 2006).

Estudos também têm demonstrado que a aplicação extensiva de desinfetantes na indústria de alimentos pode resultar em aumento da resistência de bactérias aos antibióticos e possivelmente causar falhas em esquemas terapêuticos, já que os desinfetantes, ao contrário dos antibióticos, não têm um alvo específico e podem conter diversas substâncias antimicrobianas propiciando o surgimento de resistência cruzada (CERF et al., 2010).

As principais classes de antibióticos em uso na prática clínica são: os ƀ-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapeninas, oxapeninas e monobactamas), aminoglicosídeos, macrolídeos, cloranfenicol, tetraciclinas, lincosamidas, glicopeptídeos (vancomicina, teicoplamina), lipodepsipeptídeos, rifamicinas, estreptograminas, sulfonamidas, fluoroquinolonas e oxazolidinonas (GUIMARÃES et al., 2010).

As classes das cefalosporinas de 3ª e 4ª geração, quinolonas (incluindo as fluorquinolonas) e macrolídeos são consideradas pela OMS como prioritárias para o desenvolvimento de estratégias de gerenciamento de riscos

relacionados à resistência antimicrobiana, pois são empregadas tanto na terapêutica humana como veterinária e por isso são criticamente importantes para a saúde humana e animal (WHO, 2007).

Visando conter o avanço da resistência antimicrobiana, a Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou em 2001 um documento com os princípios globais para contenção da resistência antimicrobiana em animais destinados à produção de alimentos.

Dentre as intervenções recomendadas por este documento estão: obrigatoriedade de receita para todos os antimicrobianos utilizados em rações para animais, interrupção no uso de antimicrobianos, utilizados em terapêutica humana, como promotores de crescimento quando não há avaliação de segurança para a saúde pública, acompanhamento da utilização de antimicrobianos em alimentos para animais e monitoramento da resistência para a identificação de problemas de saúde

No Brasil, com vistas a ampliar o controle sobre a prescrição e comercialização dos antimicrobianos para humanos e contribuir para a redução da resistência bacteriana na comunidade a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou em 18 de junho a consulta pública nº 58/2010, que prevê a venda controlada, com retenção de receita, destas drogas (BRASIL, 2010).

4. BIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

A epidemiologia molecular estuda o uso estruturado de observações para identificar características microbianas que predizem sua ocorrência, severidade, ou manifestações clínicas de uma doença infecciosa em particular, ou características relevantes dos hospedeiros como idade, sexo e condições predisponentes. Estudos epidemiológicos moleculares buscam conhecer a base molecular para o comportamento de virulência e predileções de hospedeiros pelos patógenos e identificar relevantes reservatórios e vias de transmissão, informações que são necessárias para o desenvolvimento de estratégias de gerenciamento e prevenção de infecções (JOHNSON e RUSSO, 2005)

A epidemiologia tenta identificar os fatores que determinam a distribuição da doença no tempo e no espaço, assim como fatores que determinam a transmissão, a manifestação, e a sua progressão. O que caracteriza a epidemiologia molecular são os termos: ñmolecular,ò o uso das técnicas da biologia molecular para caracterizar ácidos nucléicos ou aminoácidos, e a ñepidemiologia,ò o estudo da distribuição e causas determinantes da ocorrência da doença em populações humanas (FOXMAN e RILEY, 2001)

As técnicas tradicionais de microbiologia de alimentos fundamentam-se na utilização de testes morfológicos e bioquímicos para tipagem, subtipagem e identificação de gêneros, espécies e subespécies microbianas (GANDRA et al., 2008).

Os métodos tradicionais de detecção de microrganismos em alimentos, embora confiáveis e eficientes, requerem de vários dias a semanas para obtenção de resultados. As propriedades fenotípicas pelas quais as bactérias são identificadas podem não ser expressas e quando são, podem ser difíceis de serem interpretadas e classificadas, além da possibilidade de existência de células viáveis, porém não-cultiváveis (MARIN et al. 2006).

Os novos métodos de análise baseados em componentes genéticos têm aumentado a possibilidade de diferenciar as cepas bacterianas e investigar surtos de forma mais rápida e abrangente quando comparados à utilização única de métodos clássicos (MATTAR, 2000).

Os microbiologistas clínicos são frequentemente solicitados para determinar a relação entre um grupo de isolados bacterianos, isto é, tipifica-los. Durante a última década, os métodos tradicionais de tipagem foram suplementados ou substituídos em muitos laboratórios por métodos moleculares (TENOVER et al, 1995).

As técnicas da biologia molecular tornam-se cada vez mais integradas na prática da epidemiologia das doenças infecciosas. Os progressos no domínio da biologia molecular e genética estão modificando a prática da medicina e da saúde pública através do desenvolvimento de diagnóstico molecular e intervenções orientadas com base nas susceptibilidades individuais (FOXMAN e RILEY, 2001, DORMAN, 2000).

Técnicas moleculares não substituem os métodos convencionais. Contudo, podem elucidar problemas epidemiológicos que não são possíveis de serem resolvidos por métodos convencionais ou que necessitariam de um trabalho intensivo, caro, e/ou demorado para ser efetuado por técnicas convencionais (FOXMAN e RILEY, 2001).

A habilidade de discriminar entre genomas é essencial a diversas disciplinas da pesquisa da microbiologia que incluem a taxonomia, os estudos de mecanismos evolucionários e de relacionamentos filogenéticos, a genética de população dos microrganismos, e a epidemiologia microbiana (VAN BELKUM et al., 2001).

A comparação de cepas para estabelecer sua identidade se baseia no fato de que aquelas relacionadas epidemiologicamente provêm da expansão clonal de um precursor único (MATTAR, 2000).

Dentre as técnicas mais utilizadas para tipagem de microrganismos em estudos epidemiológico-moleculares está a Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (Pulsed Field Gel Electrophoresis-PFGE).

Esta técnica permite a separação de fragmentos de DNA de grande tamanho. Devido a alternância periódica do campo elétrico, as moléculas são permanentemente forçadas a modificar a orientação em que se movem. Quanto mais longa for a molécula, maior o tempo que necessita para que encontre uma orientação que favoreça o movimento ao longo do gel (ALVES et al., 2003).

A técnica de PFGE é bastante complexa com um poder discriminatório muito elevado. É considerado padrão ouro em epidemiologia molecular, mas é importante ressaltar que métodos de tipagem não substituem dados epidemiológicos, somente auxiliam e, se utilizados isoladamente, podem levar a conclusões equivocadas (MAGALHÃES et al., 2005).

Nos Estados Unidos é maciço o emprego de PFGE na investigação de surtos de origem alimentar, sobretudo aqueles causados por *E. coli O157:H7*, *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria* e *Campylobacter,* sendo os dados obtidos na investigação reunidos em um sistema de informação, o PulseNet, onde é possível estabelecer relações entre isolados de diversos estados americanos (CDC, 2009).

Diversos estudos utilizando a técnica de PFGE vêm sendo desenvolvidos buscando evidências de uma inter-relação entre bactérias isoladas de animais, alimentos e de humanos. Ramchandani et al. (2005), avaliando 495 cepas de *E. coli* provenientes de animais e do ambiente encontrou 128 (26%) cepas com perfil eletroforético indistinguível em relação ao grupo clonal A que foi previamente identificado como agente causal de infecção do trato urinário em humanos.

Voltattoni et al, (2002) estudando cepas de *E. coli* isoladas de alimentos prontos para consumo na Argentina evidenciaram, nestes alimentos, a disseminação de cepas que expressam fatores de virulência, algumas delas pertencentes a biótipos frequentemente isolados de pacientes com diarréia ou síndrome urêmica hemolítica.

A técnica de PFGE é útil não somente como uma ferramenta importante em investigações epidemiológicas como também na determinação de possíveis fontes de contaminação na indústria de alimentos, pois permite o monitoramente de fontes e rotas de contaminação. (CAMPOS et al., 2009; AVERY et al., 2004).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F.M. et al. Surveillance of antimicrobial resistance in bacteria isolated from food animals to antimicrobial growth promoters and related therapeutic agents in Denmark. **APMIS-Acta pathologica, microbiologica et immunologica Scandinavica**, v. 106, n. 6, p. 606-622, 1998.

AARESTRUP, F.M.; WEGENER H.C.. The effect of antibiotic usage in food animals on the development of antimicrobial resistance of importance for human in *Campylobacter* and *Escherichia coli.* **Microbes and Infection,** Paris, v, 1, n. 8, p. 639-644, jul. 1999.

ANDRADE, N. J. de et al., Controle de doenças de origem alimentar no processamento de alimentos. In: ANDRADE, N. J. de. **Higiene na Indústria de Alimentos.** São Paulo: Varela, 2008, p. 226-269.

ANGULO, F. J.; NARGUND, V. N.; CHILLER, T. C. Evidence of an association between use of anti-microbial agents in food animals and anti-microbial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance. **Journal of Veterinary Medicine Series B,** v. 51, n. 8-9, p. 374-379, Nov. 2004.

AKSOY, D.Y.; UNAL, S. New antimicrobial agents for the treatment of Gram-positive bacterial infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 5, p. 411ï 420, Feb. 2008.

ALMEIDA, C.F. et al. Perfil epidemiológico das intoxicações alimentares notificadas no Centro de Atendimento Toxicológico de Campina Grande, Paraíba. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 11, n. 1, p. 139-146, 2008.

ALVES, A. et al. **Tipagem genética de microrganismos.** Aveiro, 2003. Disponível em: http://www.cesam.ua.pt/files/Manual%20Metodos%20de%20Tipagem.pdf Acesso em: 30 mai 2009

AVERY, S.M. et al. Pulsed field gel electrophoresis of related *Escherichia coli* O157 isolates associated with beef cattle and comparison with unrelated isolates from animals, meats and humans. **International Journal of Food Microbiology**, v. 92, n. 2, p. 161ï 169, Apr. 2004.

BERGAMINI, A. M. M. et al. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing E*scherichia coli* (STEC) strains in ground beef in São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, n. 3, p. 553-556, set. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, Diário Oficial de União, nº. 7-E, 10 jan. 2001

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim eletrônico epidemiológico ï vigilância epidemiológica de doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2004**, ano 5, n.06, 2005. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/svs>, Acesso em: 01 out 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999 ï 2008.** Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/surtos_dta _15. pdf Acesso em: 26 ago. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 26, de 09 de julho de 2009. **Regulamento Técnico para a Fabricação, o Controle de Qualidade, a Comercialização e o Emprego de Produtos Antimicrobianos de Uso Veterinário.** Publicado no Diário Oficial da União de 10/07/2009, Seção 1.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual Integrado de Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por Alimentos.** Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ manual_dta.pdf>. Acesso em: 10 jul. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Anvisa recebe sugestões para proposta que aumenta controle sobre venda de antibióticos. Consulta Pública nº 58, de 17 de junho de 2010. Publicado no Diário Oficial da União de 18/06/10.

BRISABOIS, A., I, et al.. Surveillance of antibiotic resistant *Salmonella*. **Eurosurveillance**, v. 2, n. 3, p.19ï 20, Mar. 1997.

CAMPOS, M. R. H. et al. Caracterização fenotípica pelo antibiograma de cepas de *Escherichia coli* isoladas de manipuladores, de leite cru e de queijo ñMinas Frescalòem um laticínio de Goiás, Brasil, **Ciência Rural,** Santa Maria, v.36, n.4, p. 1221-1227, jul-ago, 2006.

CAMPOS, M. R. H. et al. Genetic heterogeneity of *Escherichia coli* strains isolated from raw milk, Minas Frescal cheese, and food handlers. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia,** Belo Horizonte, v.61, n.5, p.1203-1209, 2009.

CERF, O.; CARPENTIER, B.; SANDERS, P. Tests for determining in-use concentrations of antibiotics and disinfectants are based on entirely different concepts: ñResistanceòhas different meanings. **International Journal of Food Microbiology,** v. 136, n. 3, p. 247-254, Jan. 2010.

CDC. Centers for Diseases Control and Prevention. **Foodborne Illness**, 2005. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/foodborne infections_g.htm>. Acesso em: 05 out 2009.

CDC. Centers for Diseases Control and Prevention. ***E. coli* Outbreak Investigations**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ecoli/outbreaks.html>. Acesso em: 05 mai 2010.

CDC. Center for Diseases Control and Prevention. **PulseNet**. Disponível em: http://www.cdc.gov/pulsenet/ Acesso em: 05 out 2009.

CODEX ALIMENTARIUS COMISSION**. Report Of The Second Session Of The Codex *Ad Hoc* Intergovernmental Task Force On Antimicrobial Resistance. ALINORM 09/32/42.** 32ª Ed. Seoul, Republic of Korea, October 2008.

COOKSON, B. Glycopeptide intermediate resistant Staphylococcus aureus. **Eurosurveillance Weekly**, v. 6, n. 21, May. 2002.

COSTA, D. et al. Mechanisms of Antibiotic Resistance in *Escherichia coli* Isolates Recovered from Wild Animals. **Microbial Drug Resistance**, v. 14, n. 1, p. 71-77, Mar. 2008.

CVE. CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA ñPROFESSOR ALEXANDRE VRANJACò Toxinfecção alimentar por *Salmonella* em um evento científico, São Paulo, 2004. **Revista de Saúde Pública**, v. 39, n. 3, p. 515-518, 2005.

DEKIĹ , B. et al. Synthesis of new antimicrobial 4-aminosubstituted 3-nitrocoumarins. **Chemical Papers**, v. 64, n. 3, p. 354-359, Jun. 2010.

DORMAN, J. S. Molecular epidemiology: The impact of molecular biology in epidemiology research. **Revista Médica de Chile**, Santiago, v. 128, n. 11, p.1261-1268, nov. 2000.

EDUARDO, M. B. P.; KATSUYA, E. M.; BASSIT, N. P. Características dos surtos de doenças transmitidas por alimentos associados a restaurantes no estado de São Paulo - 1999-2002. **Higiene Alimentar***,* v. 17, n. 104/105, (encarte), p. 60-61, 2003.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed; 2002, 424p. ISBN 85-7307-988-6.

FOXMAN B.; RILEY, L. Molecular epidemiology: focus on infection. **American Journal of Epidemiology,** Oxford, v. 153, n. 12, p. 1135-1141, Jun. 2001.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos.** São Paulo: Atheneu, 2006, 182p. ISBN 85-7379-121-7

GALINIER, R. et al. Halocyntin and papillosin, two new antimicrobial peptides isolated from hemocytes of the solitary tunicate, *Halocynthia papillosa.* **Journal of Peptide Science,** v. 15, n. 1, p. 48 ï 55, Dec. 2008.

GANDRA, E. A. et al. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v. 30, n.1, p. 109-118, 2008.

GARIN, B. et al. Multicenter study of street foods in 13 towns on four continents by the food and environmental network of Pasteur and associated institutes. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.65, n. 1, p.146-152, jan 2002.

GERMANI, Y.; LE BOUGUÉNEC, C. Diagnostic des *E. coli* agents de diarrhée chez l'homme. **Revue Francophone dês Laboratoires**, Paris, v. 2008, n. 400, p. 67-76, mar. 2008.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. 3. ed. São Paulo: Manole, 2008. 986p.

GUALTIERI, M.; AUMELAS, A.; THALER. J-O. Identification of a new antimicrobial lysine-rich cyclolipopeptide family from *Xenorhabdus nematophila.* **The Journal of Antibiotics**, v. 65, n. 6, p. 295-302, Jun. 2009.

GUIMARÃES et al. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quimica Nova***,* São Paulo, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010

HAVELAAR, H. A. et al. Future challenges to microbial food safety. **International Journal of Food Microbiology,** v. 139, supplement 1, p. 79-94, May. 2010.

HOYLE, D. V. et al. The molecular epidemiology of antimicrobial resistant commensal *Escherichia coli* in a cohort of new-born calves. **Applied and Enviromental Microbiolology**, Washington, v. 71, n. 11, p. 6680ï 6688. Nov. 2005.

JOHNSON, J.R.; RUSSO, T.A. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli.* **International Journal of Medical Microbiology**, Kusterdingen, v. 295, n. 6-7, p. 383-404, Oct. 2005.

KÄFERSTEIN, F.; ABDUSSALAM, M.. Food safety in the 21st century. **Bulletin of World Health Organization**, v. 77, n. 4, p. 347-351, 1999.

KAPER, J. B. Pathogenic *Escherichia coli*. **International Journal of Medical Microbiology**, Kusterdingen, v. 295, n. 6-7, p. 355ï 356, oct. 2005.

KARCH, H.; TARR, P.I.; BIELASZEWSKA, M. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. **International Journal of Medical Microbiology**, Kusterdingen, v. 295, n. 6-7, p. 405-418, Oct. 2005.

KATSUNUMA, Y. et al. Associations between the use of antimicrobial agents for growth promotion and the occurrence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* and enterococci in the feces of livestock and livestock farmers in Japan. **The Journal of General and Applied Microbiology,** v. 53, n. 5, p. 273ï 279, 2007.

KATSUNUMA, Y. et al. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis patterns of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* and enterococci isolates from the feces of livestock and livestock farmers in Japan. **The Journal of General and Applied Microbiology,** v. 54, n. 1, p. 39-50, 2008.

KENNEDY, M. T. A brief history of disease, science and medicine: from the ice age to the genome project. Califórnia: Asklepiad Press; 2004.

KITAMOTO, O. et al. Drug-sensitivity of *Shigella* strain isolated in 1955. **Journal Japan Association Infectious Disease**, v. 30, p.403-404, 1965.

KNEZEVIC, P.; PETROVIC, O. Antibiotic resistance of commensal *Escherichia coli* of food-producing animals from three Vojvodinian farms, Serbia. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 31, n. 4, p. 360ï 363, Apr. 2008

LOPEZ-SAUCEDO, C. et al. Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases,** Atlanta, v. 9, n. 1, p. 127ï 131, Jan. 2003.

MAINIL, J. G.; DAUBE, G. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animal, humans and foods: whoôs who? **Journal of Applied Microbiology***,* Oxford*,* v. 99, n. 6, p. 1332-1344, Dec. 2005.

MAGALHAES, V. D. et al. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia ï uma revisão técnica. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 155-161, 2005.

MARIN, V. A. et al. Detecção de patógenos presentes nos alimentos: a falta de padronização e validação de métodos moleculares no Brasil. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20, n. 145, p. 46-50, out. 2006.

MARTINS, S. C. S. et al. ñScreeningòde linhagens de *Escherichia coli* multiresistentes a antibióticos, em alimentos de origem animal, no estado do Ceará, Brasil. **Higiene Alimentar**, v.17, n. 104/105, p. 71-76, jan/fev, 2003.

MÁTTAR S. Utilidad de la biología molecular en el estudio de las zoonosis. **Revista MVZ-Córdoba,** Córdoba, v. 5, n. 1, p. 46-50, ene-jun. 2000.

MENDONÇA, N. et al. Spread of extended-spectrum ß-lactamase CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in community and nosocomial environments in Portugal. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 51, n. 6, p. 1946ï 1955, Jun. 2007.

MEYER, E. et al. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Strains Isolated from Food, Animals and Humans in Germany. **Infection**, v, 36, n. 1, p. 59-61, Feb. 2008.

MOREIRA, M. A. S. et al. Resistência a antimicrobianos dependente do sistema de efluxo multidrogas em *Escherichia coli* isoladas de leite mastítico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia***,* v. 60, n. 6, p.1307-1314, dez. 2008.

MOULIN, G. et al. A comparison of antimicrobial usage in human and veterinary medicine in France from 1999 to 2005. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 62, n. 3, p. 617-625, Sep. 2008.

MULETA, D.; ASHENAFI, M. *Salmonella*, *Shigella* and growth potential of other food-borne pathogens in Ethiopian street vended foods. **East African Medical Journal**, Kenya, v. 78, n. 11, p.576-580, 2001.

MURRAY, P.; ROSENTHAL, K.; PEALLER, M. **Medical Microbiology**. Fifth edition. Elsevier Mosby, USA. 2005

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 11, n. 1, p. 142ï 203, Jan. 1998.

NAYLOR, S. W.; GALLY, D. L.; LOW, J. C. Enterohaemorrhagic *E. coli* in veterinary medicine. **International Journal of Medical Microbiology,** Kusterdingen, v. 295, n.6-7, p. 419ï 441, Oct. 2005.

NEVES, G. K. et al. Análise molecular de estirpes de *Escherichia coli* isoladas a partir de amostras de urina de pacientes ambulatoriais por RFLP da região intergência 16s-23s`. **RBAC,** v. 40, n. 1, p. 61-64, jan/mar. 2008.

NEWELL, D. G. et al. Food-borne diseases ð The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, supplement 1, p. S3ï S15, May. 2010.

NIKAIDO, H. Multidrug resistance in bacteria. **Anual Review of Biochemistry**, v. 78, p. 119-146, Jul. 2009.

RAMCHANDANI, M. et al. Possible animal origin of human-associated, multidrugresistant, uropathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Infectious Diseases,** v. 40, n. 2, p. 251ï 257, Jan. 2005.

RIANO, I. et al. Detection and characterization of extended-spectrum b-lactamases in *Salmonella* enterica strains of healthy food animals in Spain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy,** Oxford, v. 58, n. 4, p. 844ï 847, Oct. 2006.

RIGOBELO, E. C. et al. Characterization of *Escherichia coli* isolated from carcasses of beef cattle during their processing at an abattoir in Brazil. **International Journal of Food Microbiology,** Kusterdingen, v. 110, n. 2, p. 194ï 198, jul. 2006.

ROBINS-BROWNE, R. M.; HARTLAND, E. L. *Escherichia coli* as a cause of diarrhea. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, Malden, v. 17, n. 4, p. 467-75, Apr. 2002.

SAENZ, Y. et al. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy,** Washington, v. 48, n. 10, p. 3996ï 4001, Oct. 2004.

SCHLUNDT, J. et al. Emerging foodborne zoonoses. **Revue Scientifique Et Technique**, Paris, v. 23, n. 2, p. 513- 533, aug. 2004.

SCHROEDER, C.M. et al. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from humans, cattle, swine, and food. **Applied Environmental Microbiology,** v. 68, n. 2, p. 576ï 581, feb. 2002.

SHINOHARA, N. K. S. et al. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, n. 5, p, 1675-1683, 2008.

SILVA, F. F. P.; SANTOS, M. A. A.; SCHMIDT, V. Resistência a antimicrobianos de *Escherichia coli* isolada de dejetos suínos em esterqueiras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** Belo Horizonte, v. 60, n. 3, p. 762-765, jun. 2008.

SIQUEIRA, A. K. et al. Perfil de sensibilidade e multirresistência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de infecção do trato urinário, de piometra e de fezes de cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** Belo Horizonte, v. 60, n. 5, p.1263-1266, out. 2008.

SMITH, D.H. Transfer of antibiotic resistance from animal and human strains of *Escherichia coli* to resident *E. coli* in the alimentary tract of man. **The Lancet**, v. 293, n. 7607, p. 1174-1179, jun. 1969.

SMITH, J. L. et al. Impact of antimicrobial usage on antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* strains colonizing broiler chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 5, p. 1404ï 1414, Mar. 2007.

STREIT, J. M. et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility patterns among gastroenteritis-causing pathogens recovered in Europe and Latin America and *Salmonella* isolates recovered from bloodstream infections in North America and Latin America: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2003). **International Journal of Antimicrobial Agents,** v. 27, n. 5, p. 367-375, May. 2006.

SUN, Y. M.; OCKERMAN, H. W. A review of the needs and current applications of hazard analysis and critical control points (HACCP) system in food service areas. **Food Control,** v. 16, n. 4, p. 325-332, Apr. 2005.

TAUXE, R. V. Emerging foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, n. 1-2, p. 31- 41, nov. 2002.

TENOVER, F.C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology,** Washington, v. 33, n. 9, p. 2233ï 2239, Sep. 1995.

THORPE, C. M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. **Clinical Infectious Disease**, v. 38, n. 9, p. 1298ï 1303, May .2004

THORSTEINSDOTTIR, T. R. et al. Prevalence and genetic relatedness of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolated from animals, foods and humans in Iceland. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, n. 3, p. 189-196, May. 2010.

von BAUM, H.; MARRE, R. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, n. 6-7, p. 503ï 511, Oct. 2005.

van BELKUM, A. et al. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 3, p. 547ï 560, Jul. 2001.

van den BOGAARD, A.E.; STOBBERINGH, E.E. Epidemiology of resistance to antibiotics links between animals and humans. **International Journal of Antimicrobial Agents,** v.14, n. 4, p.327-335, May. 2000.

VAZ, E. K. Resistência antimicrobiana: como surge e o que representa para a suinocultura**. Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37. Supl 1, p.147-150, 2009.

VIEIRA, R. H. S. F. et al. Contaminação fecal da ostra *Crassostrea rhizophorae* e da água de cultivo do estuário do Rio Pacoti (Eusébio, Estado do Ceará): Isolamento e identificação de *Escherichia coli* e sua susceptibilidade a diferentes antimicrobianos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science,** São Paulo, v. 45, n. 3, p. 180-189, 2008.

VOLTATTONI, P. et al. Identificación de virotipos de *Escherichia coli* aislados de alimentos listos para el consumo. **Revista Investigación en Salud,** v. 5, n. 1-2, p. 75-83, 2002.

WANG, H.H. et al. Food commensal microbes as a potentially important avenue in transmitting antibiotic resistance genes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 254, n. 2, p. 226ï 231, Feb. 2006.

WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida? **Boletim da Organização Pan-Americana de Saúde**, Brasília, v. 01, n. 04, p. 1-6, mar. 2004

WELKER, C.A.D. et al. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Brazilian Journal of Biosciences**, Porto Alegre, v. 8, n. 1, p. 44-48, jan./mar. 2010.

WHO. World Health Organization. **Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance, 2001.** Disponível em: <http://www.who.int/drugresistance/WHO_Global_ Strategy_English.pdf> Acesso em: 08 mar 2009.

WHO. World Health Organization. **Monitoring antimicrobial usage in food animals for the protection of human health.** Report of a WHO consultation Oslo, Norway 10-13 September 2001**.** Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.11.pdf Acesso em: 10 nov 2009.

WHO. World Health Organization. **Emerging foodborne diseases**. Fact Sheet 124. 2002. Disponível em: www.hoint/inffs/en/fact124html Acesso em: 15 out 2009.

WHO. World Health Organization. **Joint FAO/OIE/WHO Expert Workshop on Non-human Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance: Scientific Assessment**. Geneva, December 1-5, 2003. Disponível em: http://www.who.int/foodsafety/micro/meetings/nov2003/en/ Acesso em 09 nov 2009.

WHO/FAO/OIE. **Joint FAO/WHO/OIE Expert Meeting on Critically Important Antimicrobials.** Report of a meeting held in FAO, Rome, Italy, 26ï 30 November 2007. FAO, Rome, Italy, and WHO, Geneva, Switzerland.

WHO. World Health Organization. Food Safety. Disponível em: http://www.who.int/foodsafety/en/ Acesso em: 07 set 2009.

WHO. World Health Organization. **Foodborne Disease.** Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/foodborne_disease/en/> Acesso em: 08 mar 2010a.

WHO. World Health Organization. **Antimicrobial resistance.** Disponível em: < http://www.who.int/foodborne_disease/resistance/en/index.html > Acesso em: 08 mar 2010b.

WINOKUR, P.L. et al. Evidence for transfer of CMY-2 AmpC beta-lactamase plasmids between *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and humans. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 45, n. 10, p. 2716ï 2722, Oct. 2001.

YUAN, W. et al. Cloning and functional characterization of a new antimicrobial peptide gene StCT1 from the venom of the scorpion *Scorpiops tibetanus.* **Peptides**, v. 31, n. 1, p. 22-26, Jan. 2010.

ZHAO, S. et al. Characterization of *Salmonella* enterica serotype Newport isolated from humans and food animals. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 12, p. 5366-5377, Dec. 2003.

CAPÍTULO 02

PADRÃO CLONAL POR PFGE E PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE CEPAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE ALIMENTOS E DE ESPÉCIMES CLÍNICAS.

RESUMO

MELO, D. B**. Padrão clonal por PFGE e perfil de sensibilidade a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* isoladas de alimentos e de espécimes clínicas.** [Dissertação de Mestrado]. Orientador: Profª. Drª. Alaíse Gil Guimarães**.**

A resistência de microrganismos aos antimicrobianos tem aumentado nos últimos tempos despertando a preocupação dos órgãos de saúde publica. Microrganismos resistentes podem ser transferidos aos humanos através do consumo de alimentos contaminados, podendo causar doenças de difícil tratamento ou promover a disseminação de genes de resistência. O objetivo deste trabalho foi investigar a relação entre cepas de *Escherichia coli* isoladas de humanos e de alimentos no Estado da Bahia, buscando avaliar seu perfil de sensibilidade aos antimicrobianos bem como evidências de ligações epidemiológicas entre as mesmas. A avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos foi realizada por disco difusão em ágar, conforme metodologia do CLSI sendo testados 11 antibióticos e o perfil clonal foi obtido por *Pulsed Field Gel Electrophoresis* ï PFGE. As fotografias dos géis foram avaliadas pelo software GelCompar II para avaliação da semelhança entre os perfis e criação dos dendrogramas. Das 84 cepas avaliadas 53(63%) foram sensíveis aos 11 antimicrobianos testados, duas(2,4%) tiveram perfil de sensibilidade intermediária e 29(34,6%) apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano. Ampicilina e tetraciclina foram os antibióticos para os quais os isolados clínicos apresentaram o maior grau de resistência, já entre as cepas isoladas de alimentos o padrão de resistência foi maior para tetraciclina. Houve um elevado percentual de cepas multirresistentes, sobretudo entre os isolados clínicos. Observou-se a formação de 14 perfis de resistência entre as cepas sendo três perfis comuns entre os isolados clínicos e de alimentos e desconsiderando-se a origem das cepas a tetraciclina apareceu em primeiro lugar em número de *E. coli* resistentes. Em relação ao perfil genético das cepas obtido por *Pulsed Field* (PFGE) foram encontrados 31 perfis distintos não se observando cepas com padrão eletroforético indistinguível que pudessem caracterizar um clone. Assim, em virtude da não existência de correlação genética entre os isolados não foi possível estabelecer relação epidemiológica entre os mesmos. O maior percentual de similaridade encontrado foi de 84,21%, entre um isolado clínico e uma cepa de alimentos o que representou 6,5% das amostras. Entre as cepas de alimentos esse percentual foi de 72,73% e para as cepas clínicas 81,82%. Cepas com maior percentual de similaridade apresentaram em comum resistência a tetraciclina. As cepas de *Escherichia coli* estudadas não apresentaram altos percentuais de resistência aos antimicrobianos, no entanto observou-se grande percentual de isolados multirresistentes. Dois antibióticos se destacaram em número de cepas resistentes: ampicilina e tetraciclina. Através da tipagem molecular não foram encontrados clones bem como não se pôde estabelecer relação epidemiológica entre as cepas, pois seus perfis eram bem diferentes. Assim, sugere-se que entre isolados de origem diferente a possibilidade de ocorrência de clones é pequena.

Palavras-chave: resistência, *Escherichia coli*, PFGE, clonalidade

1. INTRODUÇÃO

A *Escherichia coli,* membro da família Enterobacteriaceae, é um habitante comum do trato intestinal de homens e animais, sendo a causa mais comum de infecções hospitalares e comunitárias por microrganismos Gram-negativos (von BAUM e MARRE,2005).

Essa bactéria é frequentemente envolvida em infecções humanas ou animais que requerem o uso de antimicrobianos e a resistência está associada a falhas no tratamento tanto na medicina humana quanto veterinária (COSTA et al., 2008).

Particularmente as *E. coli* comensais podem transferir sua resistência no meio gastrintestinal, especialmente quando ocorre exposição a antimicrobianos, determinando alta prevalência de resistência (SMITH et al., 2007).

A transferência de genes de resistência entre bactérias foi descrita pela primeira vez por Smith (1969) em estudo desenvolvido com *E. coli* do trato digestivo de humanos e animais. Este achado vem sendo confirmado por diversos estudos ao longo dos anos (AARESTRUP e WEGENER, 1999; WINOKUR et al., 2001; ÂNGULO et al., 2004; WANG et al., 2006).

A população humana torna-se colonizada e/ou infectada através do contato, exposição ocupacional ou pela cadeia alimentar. Os alimentos, notadamente os de origem animal, são um importante veículo para o incremento de patógenos gastrintestinais resistentes a antibióticos (von BAUM e MARRE, 2005; RIANO et al., 2006).

Alguns estudos têm demonstrado haver relação epidemiológica entre cepas de *E. coli* isoladas de alimentos e de humanos, bem como um aumento no número de isolados resistentes (VOLTATTONI et al, (2002) RAMCHANDANI et al., 2005; MANGES et al., 2007; JOHNSON et al. 2007; THORSTEINSDOTTIR et al., 2010).

O objetivo deste estudo foi investigar a relação entre cepas de *Escherichia coli* isoladas de humanos e de alimentos no Estado da Bahia, buscando avaliar seu perfil de sensibilidade aos antimicrobianos bem como evidências de ligações epidemiológicas entre as mesmas

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Cepas de Escherichia coli

Foram avaliadas 84 cepas de *E. coli*, sendo 36 isoladas de alimentos e outras 48 isoladas de amostras clínicas. As cepas de alimentos eram provenientes da bacterioteca do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (UFBA) e do Laboratório Central de Saúde Pública Prof. Gonçalo Moniz (LACEN/BA) isoladas de acordo com APHA (2001) de diversos alimentos como: carne, leite, queijos, pratos prontos para consumo e de sobremesas, enquanto as cepas clínicas eram oriundas de isolados de coproculturas e uroculturas realizadas por dois hospitais na cidade de Salvador, BA. As cepas obtidas foram armazenadas em, no mínimo, três tubos de ensaio identificados, contendo caldo BHI (Oxoid®) com 20% de glicerol e mantidas em temperaturas inferiores a -20ºC para posterior análise.

Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Saúde do Estado da Bahia, inscrito no CEP-CAA sob nº 0028.0053.000-09 tendo sido aprovado pelo parecer nº 373/2009.

Para coleta de dados das cepas empregadas, utilizou-se dois formulários, visando obter informações sobre as mesmas como forma de auxiliar nas discussões futuras, com base nos resultados encontrados. As informações relativas às cepas isoladas de humanos foram obtidas pelo próprio pessoal do hospital e transmitidas à equipe executora do projeto sem que os pesquisadores tivessem acesso à qualquer informação do paciente, além daquelas previstas no formulário.

2.2. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos

A caracterização do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos foi executada conforme o protocolo padrão de disco difusão em ágar do Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2010). As cepas passaram por dois repiques em ágar Tripticase de Soja (Oxoid®) de 18h cada, sendo

posteriormente suspensas em solução salina 0,85% estéril até atingir o padrão 0,5 da escala de McFarland, correspondendo a $1,5x10^8$ UFC/mL. A suspensão padronizada foi inoculada em placas de ágar Mueller-Hinton (Oxoid®) com auxílio de swab estéril (Absorve®) para em seguida serem dispostos os discos antimicrobianos sobre a superfície do ágar. As placas foram incubadas invertidas por 18h e os halos de inibição foram medidos com régua milimetrada.

Utilizou-se discos comerciais (Laborclin®) dos seguintes antibióticos: ampicilina 10 µg (AMP), cefalotina 30 µg (CFL), cefotaxima 30 µg (CTX), gentamicina 10 µg (GEN), tetraciclina 30 µg (TET), cloranfenicol 30 µg (CMP), trimetoprim/sulfametoxazol 1,25/23,75 µg (TMS), ciprofloxacina 5 µg (CIP), amoxicilina/clavulanato 20/10 µg (AMC), levofloxacina 5 µg (LEV) e cefotriaxona 30 µg (CRO). Os critérios interpretativos do CLSI foram empregados para determinar o perfil de susceptibilidade dos microrganismos, sendo classificados em sensíveis, sensibilidade intermediária e resistentes. Cepas resistentes a pelo menos dois antimicrobianos foram consideradas multirresistentes (KNEZEVIC e PETROVIC, 2008). Cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como referência. Devido ao impacto na saúde publica da resistência aos antimicrobianos, apenas as cepas resistentes foram tipadas por PFGE.

2.3. Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)

As cepas resistentes de *E. coli* foram avaliadas por eletroforese em gel de campo pulsado, e esta foi realizada em um sistema CHEF DR II (Bio-Rad) a 14º C em 0.5 XTBE conforme protocolo padrão para PFGE com modificações.

Inicialmente a cepas passaram por dois repiques, de 18h à 24h cada, em ágar Tripticase de Soja (Oxoid®) sendo depois suspensas em 500 µL de solução salina 0,85% (Oxoid®), centrifugadas por 2min, a 5 rpm, em microcentrífuga refrigerada (Eppendorf®) em seguida desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se 500 µL de PIV (NaCl 1M em 10mM tris-HCL, pH

7,6) até atingir turvação comparável à escala 1 de McFarland. A cada tubo foram adicionados 4µL de proteinase K (Sigma®) (25mg/mL).

Para o preparo dos *plugs* adicionou-se 500µL de agarose Low Melting Point (Sigma®) a 2% à suspensão bacteriana e homogeneizou-se com delicadeza. Em seguida, a mistura foi dispensada no molde de *plugs* (Bio-Rad®) e deixada por 10min à 4ºC para solidificação. Após, os *plugs* foram transferidos para tubos contendo 1mL do tampão ES e 20µL de proteinase K (Sigma®) (25mg/mL) sendo incubados *overnight* em banho-maria à 56ºC e após incubação foram submetidos a lavagens sucessivas com tampão TE (10nM Tris, 1mM EDTA pH 8,0) durante três dias.

Para a digestão do DNA microbiano foram utilizados 2,5µL da enzima de restrição *Xba*I(12U/ µL) (Promega®) *overnight*, conforme indicado por Tenover et al. (1995). Como padrão de peso molecular utilizou-se o marcador Pulse Marker 50-1.000kb (Sigma®). Em seguida os fragmentos obtidos foram separados em gel de agarose para PFGE (Bio-Rad®) a 1%, em tampão TBE 0,5X, nas seguintes condições de eletroforese: tempo inicial de 2,2seg, tempo final de 54,2seg, voltagem de 6v/cm e tempo de corrida de 17h.

Transcorrido o período de corrida, o gel foi corado em solução de brometo de etidio por 20min e descorado em água por cinco minutos, sendo, em seguida, fotografado através de fototransiluminação UV por fotodocumentador Bio-Rad Gel Doc 1000, software Quantity One.

2.4. Análise de dados

As fotos dos géis foram avaliadas pelo software GelCompar II versão 4.0 (Applied Maths®) para criação dos dendrogramas utilizando o método *unweighted-pair-group* (UPGMA) e o coeficiente de Dice, através de similaridade entre bandas considerando uma tolerância de 1,0%. Os isolados foram alocados em diferentes grupos quando se observou diferenças genéticas entre eles. Perfis com similaridade de 90% entre bandas foram considerados relacionados.

Os perfis foram organizados em grupos, por ordem alfabética, tomando-se por base o primeiro isolado obtido na pesquisa ao qual foi atribuída

a letra ñAò seguida do número ñ1ò sendo aos demais atribuídas as letras subseqüentes de acordo com a semelhança entre os mesmos. Sendo assim, perfis com a mesma letra e número pertencem ao mesmo grupo e são clones; perfis com a mesma letra e número diferente são do mesmo grupo, mas não são clones, pois possuem algumas diferenças de bandas; e perfis com letras e números diferentes são completamente diferentes não formando grupos e tampouco clones.

Além disso, utilizou-se os critérios de Tenover et al. (1995), descritos na Tabela 01, para avaliação dos perfis das cepas gerados por PFGE.

Tabela 01 ï Critérios para interpretação dos padrões de PFGE, segundo Tenover et al. (1995).

Categoria	**Nº de diferenças genéticas comparadas com cepas de surto**	**Nº de fragmentos diferentes comparados com o padrão do surto**	**Interpretação epidemiológica**
Indistinguivel	0	0	O isolado é parte do surto
Clone relacionado	1	2-3	O isolado é provavelmente parte do surto
Possivelmente relacionado	2	4-6	O isolado é possivelmente parte do surto
Diferente	Ó3	Ó7	O isolado não é parte do surto

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Perfil de suscetibilidade

Foram testadas 84 cepas de *Escherichia coli*, sendo 48 (57%) isoladas de humanos e 36 (43%) de alimentos. Do total de isolados, 29 (34,6%) apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano dos 11 testados, duas (2,4%) tiveram perfil de sensibilidade intermediária e 53 (63%) foram pansensíveis (Figura 01).

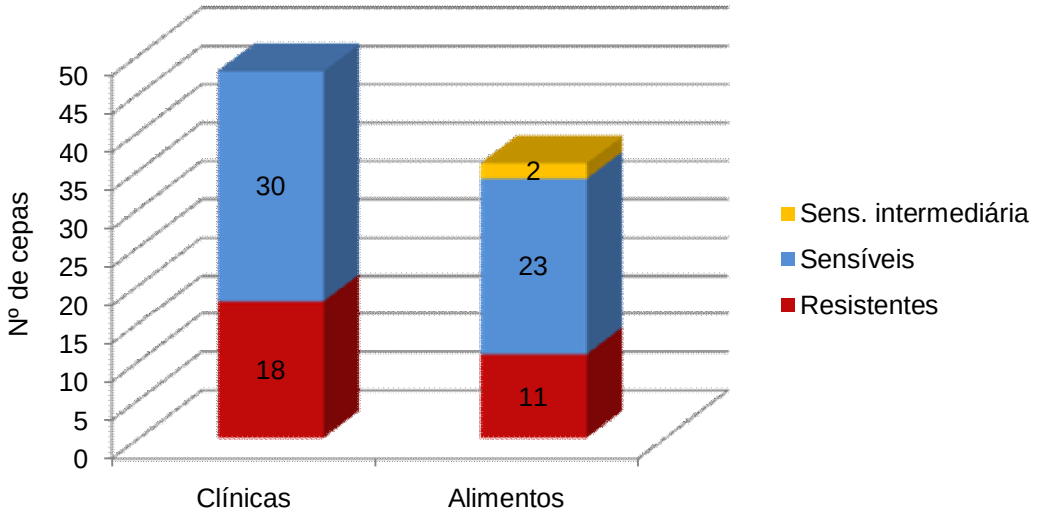


Figura 01 - Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* isoladas de amostras clínicas e de alimentos.

Desconsiderando a origem das cepas, a tetraciclina aparece em primeiro lugar em número de *E. coli* resistentes (22/84; 26,2%), seguida por ampicilina(17/84; 20,3%), trimetoprim/sulfametoxazole (13/84; 15,5%) e cefalotina (5/84; 6,0%). Para os antibióticos cefotaxima, cefotriaxona, amoxicilina/clavulanato, gentamicina e levofloxacina houve baixa frequência de resistência (Tabela 02).

Tabela 02 ï Perfil de resistência aos antimicrobianos das 84 cepas de *Escherichia coli* avaliadas

Antibióticos	Sensível		Intermediário		Resistente	
	Nº cepas	%	Nº cepas	%	Nº cepas	%
Ampicilina	66	78,5	1	1,2	17	20,3
Amoxicilina/Clavulanato	82	97,7	0	0	2	2,3
Cefalotina	74	88,0	5	6,0	5	6,0
Cefotaxima	83	98,8	1	1,2	0	0
Cefotriaxona	83	97,7	1	1,2	0	0
Ciprofloxacina	80	95,2	0	0	4	4,8
Cloranfenicol	78	92,8	2	2,3	4	4,8
Gentamicina	82	97,7	0	0	2	2,3
Levofloxacina	80	95,2	1	1,2	3	3,5
Tetraciclina	62	73,8	0	0	22	26,2
Trimetoprim/Sulfametoxazole	71	84,5	0	0	13	15,5

Este perfil de resistência difere daquele descrito por Hannah et al. (2009) que observaram maior prevalência de resistência para trimetoprim/sulfametoxazole, seguido por ácido nalidíxico e cefalosporinas de espectro estendido (ceftriaxona, ceftazidima e cefpodoxima) entre cepas de *E. coli* isoladas de fontes alimentares e humanas. No entanto, ambos os estudos relatam existência de isolados multirresistentes. Predominância de resistência a trimetoprim/sulfametoxazole também foi descrita por Johnson et al. (2007) entre isolados de alimentos e humanos.

Em relação às cepas clínicas do total de isolados 30(62%) foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados e 18(38%) foram resistentes ao menos a um antibiótico (Figura 02).

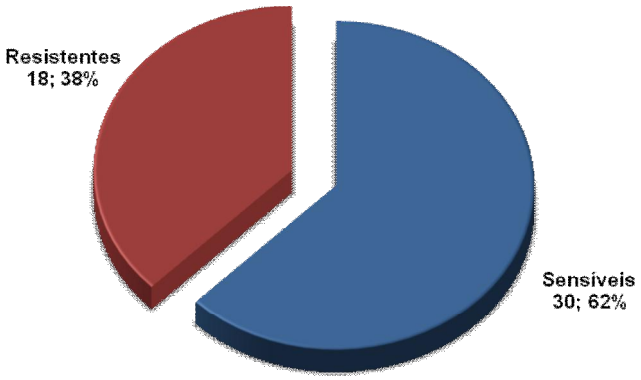


Figura 02 - Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* isoladas de amostras clínicas.

Estes resultados estão em consonância com os achados de Jakobsen et al. (2010) onde isolados clínicos de *E. coli* apresentaram maior percentual de resistência para ampicilina, trimetoprim/sulfametoxazol e tetraciclina, nesta ordem. Outrossim, Pires et al. (2007) descreveram maior percentual de resistência para ampicilina seguida de trimetoprim/sulfametoxazol entre os isolados clínicos.

Ainda neste sentido e consoante aos resultados ora apresentados Thorsteinsdottir et al. (2010) obtiveram 66,7% das *E. coli* humanas resistentes à ampicilina, assim como Bartoloni et al. (2008) observaram altas taxas de resistência para ampicilina, tetraciclina, trimetoprim/sulfametoxazol e cloranfenicol em cepas clínicas de *E. coli*.

Entre as cepas de alimentos, das 36 testadas, 23 (64%) foram sensíveis a todos os antimicrobianos, 2 (5%) apresentaram sensibilidade intermediária e 11 (31%) demonstraram resistência. (Figura 03)

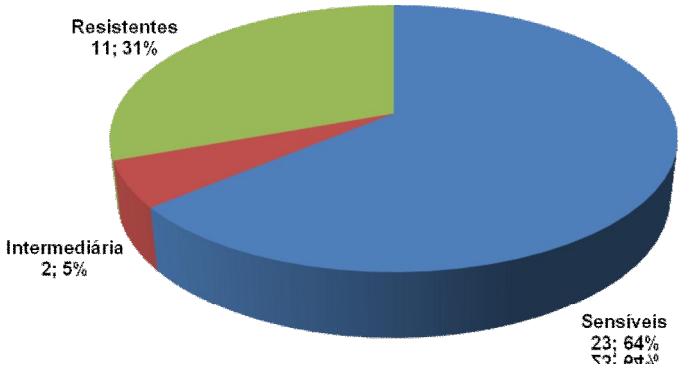


Figura 03 - Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* isoladas de alimentos.

Em relação às cepas isoladas de alimentos o padrão de resistência foi maior para tetraciclina com nove (82%) das 11 cepas resistentes testadas. A ampicilina apresentou quatro (36%) cepas resistentes, cefalotina três (27%), amoxicilina/clavulanato e trimetoprim/sulfametoxazol duas (18%), enquanto que cloranfenicol, gentamicina e ciprofloxacina uma (9%) cepa cada (Tabela 03). Houve, ainda, três cepas com sensibilidade intermediária à cefalotina. Todos os isolados foram sensíveis a levofloxacina, cefotriaxona e cefotaxima.

Ampicilina e tetraciclina foram os antibióticos para os quais as cepas clínicas apresentaram o maior grau de resistência; das 18 cepas clínicas, 13 (72%) foram resistentes a estas drogas. Em segundo lugar ficou trimetoprim/sulfametoxazol com 11(61%) cepas, cloranfenicol, levofloxacina e ciprofloxacina com três (16,6%), cefalotina com duas (11%), gentamicina com uma (5,3%) cepa. Além disso, duas cepas apresentaram padrão de sensibilidade intermediário para cefalotina, uma cepa para cefotaxima e uma para ceftriaxona. Todos os isolados foram sensíveis à associação amoxicilina/clavulanato (Tabela 03).

Tabela 03 ï Prevalência de resistência de cepas de *Escherichia coli* isoladas de amostras clínicas e de alimentos.

Antimicrobianos	Nº Cepas Resistentes			
	Clínicas		Alimentos	
	nº	%	nº	%
AMP	13	72	4	36
TET	13	72	9	82
SUT	11	61	2	18
CFL	2	11	3	27
CLO	3	17	1	9
AMC	0	0	2	18
LVX	3	17	0	0
CIP	3	17	1	9
GEN	1	5	1	9
CRO	0	0	0	0
CTX	1	5	0	0

AMP, ampicilina; TET, tetraciclina; SUT, trimetoprim/sulfametoxazol; CLO, cloranfenicol; CFL, cefalotina; AMC, amoxicilina/clavulanato; LVX, levofloxacina; CIP, ciprofloxacina; GEN, gentamicina, CRO, ceftriaxona, CTX, cefotaxima.

Neste estudo a prevalência de resistência às tetraciclinas foi semelhante entre as cepas clínicas e de alimentos, achado diverso do encontrado por Meyer et al. (2008) que analisando cepas de *E. coli* isoladas de alimentos, animais e humanos na Alemanha observaram que as cepas isoladas de animais e de alimentos tinham maior percentual de resistência à tetraciclina do que as *E. coli* de humanos. No entanto, em ambos os estudos a ampicilina assumiu o segundo lugar em número de cepas resistentes isoladas de fontes alimentares.

Em estudo semelhante, realizado por Jakobsen et al. (2010) na Dinamarca, o perfil de resistência às tetraciclinas foi mais acentuado entre cepas de alimentos do que clínicas. Neste país a tetraciclina é muito utilizada principalmente nas criações de suínos (VIEIRA, et al., 2009).

Meyer et al. (2008) imputam este elevado grau de resistência à tetraciclinas em isolados alimentares na Alemanha, ao amplo uso deste antimicrobiano em alimentos para animais naquele país. No Brasil, a utilização da tetraciclina como promotor de crescimento em rações para animais não é permitida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento desde o ano de 1998 através da Portaria nº. 193 de 12/05/1998, revogada pela Instrução Normativa nº. 26 de 09/07/2009.

A resistência a tetraciclinas é mediadas por plasmídeos e os genes que conferem resistência estão associados aos de outros fármacos como, por exemplo, aminoglicosídeos, sulfonamidas e cloranfenicol. Assim, os plasmídeos geralmente transmitem resistência a múltiplos fármacos e não apenas à tetraciclina (KATZUNG, 1998).

Apesar de não haver testado as cepas frente à tetraciclina, Altalhi et al. (2010) encontraram elevado percentual de resistência a outros antimicrobianos, principalmente sulfafurazole (89,2%) para *E. coli* isoladas de carne de frango na Arábia Saudita e assim como neste estudo a ampicilina ocupou o segundo lugar (74,4%) em número de cepas resistentes.

Resistência a ampicilina tem sido amplamente constatada inclusive onde há uso restrito de antimicrobianos como descreve Hoyle et al., (2006) em avaliação realizada em isolados de fezes de animais de fazendas orgânicas.

O percentual de resistência observado neste estudo para as cepas isoladas de alimentos foi menor do que o encontrado por Van et al. (2007), Van et al. (2008) no Vietnam e Altalhi et al. (2010) na Arábia Saudita, que reportam percentuais próximos de 100% de resistência. Em virtude da utilização de antimicrobianos na alimentação animal e da pressão de seleção que estas drogas exercem sobre os microrganismos presume-se que isolados de alimentos de origem animal tenham um perfil de resistência superior aos de outras fontes alimentares.

Dentre os isolados resistentes o percentual de cepas clínicas que apresentaram resistência múltipla foi de 77,7% (14/18) enquanto que naquelas isoladas de alimentos esse número foi de 45,5% (5/11) (Tabela 04). Assim como relatado por Thorsteinsdottir, et al. (2010) encontrou-se maior proporção de multirresistência entre as cepas isoladas de espécimes clínicos do que cepas de alimentos.

Resistência de *E. coli* a pelo menos duas classes de agentes antimicrobianos é um achado comum em humanos e animais e tem um impacto crescente sobre as opções terapêuticas disponíveis (von BAUM e MARRE, 2005).

Tabela 04 ï Perfil de multirresistência aos antimicrobianos testados das cepas de *Escherichia coli* de espécimes clínicas e isoladas de alimentos.

Nº de antibióticos	Nº de resistências			
	Clínicas	%	Alimentos	%
2	6	33	2	18,2
3	2	11	1	9,1
4	4	22	1	9,1
5	1	5,5	0	0
6	1	5,5	1	9,1
Multirresistência*	14	77,8	5	45,5

[a] Resistência a pelo menos dois antibióticos.

Das cinco cepas provenientes de alimentos com característica de resistência múltipla detectadas neste estudo, quatro (80%) foram isoladas de alimentos de origem animal, a saber: carne suína, bovina, e de aves e apenas uma cepa era de origem diversa, sendo isolada de vatapá que é considerado prato pronto para consumo (Tabela 05). No entanto sabe-se que esta preparação normalmente tem entre seus ingredientes produtos de origem animal como peixe e camarão.

Tabela 05 - Origem das cepas de *E. coli* isoladas de alimentos e sua resistência aos antimicrobianos testados.

Alimentos	Perfil de resistência aos antibióticos
Leite pasteurizado	AMP
Vatapá	TET
Salada (complemento de acarajé)	TET
Queijo mussarela	TET
Torta salgada mista	TET
Pão de metro recheado	TET
Carne suína salgada	TET, CLO
Carne bovina moída *in natura*	CFL, AMC
Vatapá	AMP, TET, SUT
Carne bovina moída *in natura*	AMP, CFL, TET, AMC
Frango *in natura*	AMP, CFL, GEN, TET, SUT, CIP

AMP, ampicilina; TET, tetraciclina; SUT, trimetoprim/sulfametoxazol; CLO, cloranfenicol; CFL, cefalotina; AMC, amoxicilina/clavulanato; GEN, gentamicina; CIP, ciprofloxacina.

Estes achados são semelhantes àqueles reportados por Martins et al., (2003) que avaliaram 124 cepas de *Escherichia coli* isoladas de alimentos de origem animal no estado do Ceará e constataram multirresistência em 63% delas, resultados similares também foram encontrados por Jouini et al. (2009) entre *E. coli* provenientes de alimentos de origem animal.

Campos et al., (2006) avaliaram 69 cepas de *E. coli* isoladas de queijo e leite e de mãos e secreção nasal de manipuladores obtendo percentual de resistência de 39,1% para cefalotina, tetraciclina e trimetoprim/sulfametoxazol. As cepas isoladas de leite apresentaram maior percentual de resistência à tetraciclina o que pode ser explicado pelo fato deste antimicrobiano ser muito utilizado no tratamento de infecções da glândula mamária.

Em caso de mastites, além da tetraciclina, são também prescritos trimetoprim/sulfametoxazol, enrofloxacina, neomicina, estreptomicina e gentamicina (MOREIRA et al., 2008), portanto em produtos lácteos é de se esperar um maior percentual de cepas resistentes a estes antibióticos.

Com base no perfil de susceptibilidade exibido pelas cepas estudadas, observou-se a formação de 14 perfis distintos de resistência aos

antibióticos testados. Puderam-se identificar três perfis idênticos entre as cepas clínicas e de alimentos: AMP; TET; e AMP, TET, SUT (Tabela 06).

Tabela 06 ï Distribuição dos padrões de resistência encontrados entre cepas de espécimes clínicas e isoladas de alimentos.

Antibióticos	Nº de Cepas	
	Clínicas	Alimentos
AMP	2	1
TET	2	5
AMP, TET	1	0
AMP, SUT	3	0
TET, CLO	0	1
TET, SUT	2	0
AMC, CFL	0	1
AMP, TET, SUT	2	1
AMP, TET, SUT, CLO	3	0
AMP, TET, CFL, AMC	0	1
TET, GEN, CIP, LVX	1	0
AMP, TET, CFL, CIP, LVX	1	0
AMP, TET, SUT, CFL, GEN, CIP	0	1
AMP, TET, SUT, CFL, CIP, LVX	1	0
Total	**18**	**11**

AMP, ampicilina; TET, tetraciclina; SUT, trimetoprim/sulfametoxazol; CLO, cloranfenicol; CFL, cefalotina; AMC, amoxicilina/clavulanato; LVX, levofloxacina; CIP, ciprofloxacina; GEN, gentamicina, CRO, ceftriaxona, CTX, cefotaxima.

3.2. Padrão clonal

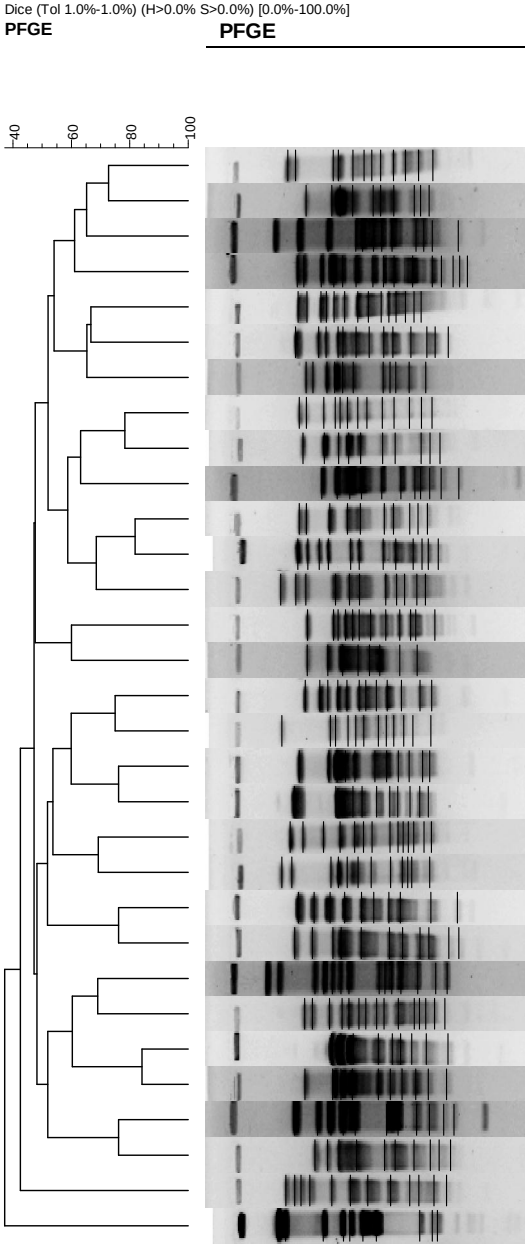
Em relação ao perfil genético das cepas obtido por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) foram encontrados 31 perfis distintos. Não se observou cepas com padrão eletroforético indistinguível que pudessem caracterizar um clone.

De acordo com Tenover et al. (1995) cepas geneticamente indistinguíveis tem, em seu padrão de PFGE, o mesmo número de bandas, aparentemente com o mesmo tamanho. Eventos genéticos como mutações ou inserções de DNA alteram este padrão resultando em diferenças de duas ou três bandas entre isolados.

O maior percentual de similaridade encontrado foi de 84,21%, entre um isolado clínico e uma cepa de alimentos o que representa 6,5% das amostras (Figura 04).

Estes perfis tiveram, entre si, diferença de três bandas, e pelos critérios de Tenover et al. (1995) seriam classificados como clones relacionados. No entanto, o percentual de similaridade não atingiu o valor de corte estabelecido de 90% de semelhança pelo coeficiente de Dice para ser considerado como perfil relacionado.

A ausência de um clone, neste estudo, pode ser explicada pelo fato de que as cepas não eram relacionadas epidemiologicamente, sendo isoladas em locais diferentes e tendo apenas em comum o período em que foram obtidas e algumas características de resistência. Além disso, as cepas clínicas foram obtidas de pacientes ambulatoriais não relacionadas epidemiologicamente. Corroborando este achado, Avery et al. (2004) observaram maior semelhança entre os perfis dos isolados de *E. coli* relacionados do que entre aqueles de origens diversa sem qualquer relação epidemiológica.



ID Strain	Origem	Data de Isolamento	Antimicrobial resistance	PFGE Profile
C7	Copro	30/03/2009	AMP, TET	I1
A42	Alimento	28/07/2009	TET, CLO	AA1
C37	Copro	09/04/2009	TET, SUT	Q1
C58	Copro	26/05/2009	AMP, SUT	V1
C8	Urina	31/03/2009	AMP, TET, SUT	J1
C59	Copro	29/05/2009	AMP, TET, SUT, CLO	X1
A49	Alimento	10/08/2009	TET	DD1
C11	Urina	01/04/2009	AMP, SUT	N1
C25	Copro	09/04/2009	AMP, SUT	P1
A51	Alimento	10/08/2009	AMP, CFL, GEN, TET, CIP, SUT	G1
C19	Copro	31/03/2009	TET, SUT	M1
C40	Copro	04/05/2009	AMP, CFL, TET, CIP, LVX	M2
A20	Alimento	26/08/2008	TET	C1
A32	Alimento	21/07/2009	AMP, AMC, CFL, TET,	Y1
A56	Alimento	16/09/2009	*CFL	BB1
C66	Copro	30/05/2009	AMP	W1
C9	Copro	31/03/2009	AMP, SUT	L1
A17	Alimento	22/07/2008	AMP, TET, SUT	A1
C56	Copro	25/05/2009	TET	K1
C12	Copro	04/04/2009	AMP	O1
C27	Copro	07/04/2009	AMP, TET, SUT, CLO	R1
C60	Copro	29/05/2009	TET	Z1
A63	Alimento	29/09/2009	AMP	H1
C43	Copro	06/05/2009	GEN, TET, CIP, LVX	T1
A15	Alimento	26/08/2008	TET	B1
C73	Copro	05/06/2009	AMP, CFL, TET, CIP, LVX, SUT	F1
A48	Alimento	10/08/2009	TET	F2
C47	Copro	15/05/2009	AMP, TET, SUT, CLO	U1
A30	Alimento	24/06/2009	TET	CC1
A31	Alimento	25/06/2009	*CFL	D1
A38	Alimento	21/07/2009	AMC, CFL	E1

Figura 04 - Dendrograma gerado pelo software GelCompar II mostrando, através do coeficiente de Dice, a relação entre os 31 perfis representativos dos isolados de *Escherichia coli* clínicos e de alimentos.
* sensibilidade intermediária

Mesmo quando se estuda cepas geograficamente relacionadas é possível a não ocorrência de clones conforme relatado por Campos et al. (2009), que observaram ausência de um clone endêmico e grande diversidade entre cepas de *E. coli* humanas e de alimentos isoladas em um laticínio.

Na prática a tipagem de microrganismos é mais efetiva como auxiliar nas investigações de surto, quando são aplicadas a pequenos números de isolados relacionados epidemiologicamente (TENOVER et al, 1995). Contudo, faz-se necessário estudar cepas de origens diferentes, não pertencentes a surtos, especialmente aquelas que apresentam resistência a antimicrobianos, para avaliar possíveis modificações do seu genoma que reflitam sobre suas similaridades buscando informações sobre sua origem, bem como o impacto sobre a saúde pública, trazendo, por conseguinte, estratégias de controle.

Há semelhança entre os resultados obtidos por este trabalho e os descritos por Thorsteinsdottir et al. (2010) que encontraram baixa relação de similaridade entre isolados humanos, de animais e alimentos, no entanto, observaram que um isolado humano tinha perfil idêntico a isolados de carne de frango sugerindo a transmissão de bactérias resistentes entre homens e animais.

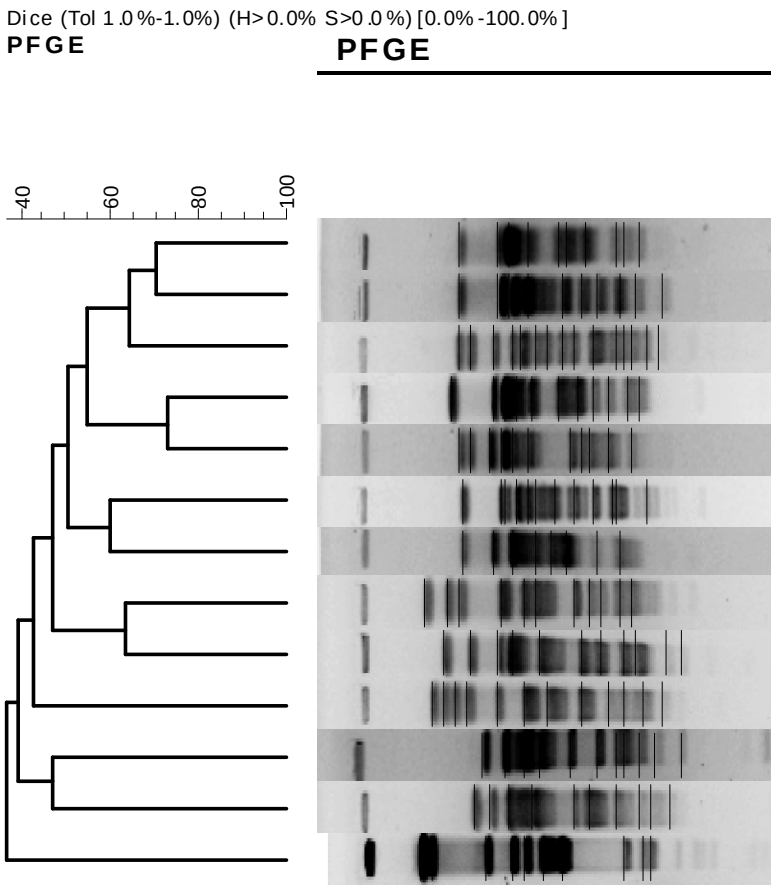
Alguns estudos, todavia, conseguiram observar a ocorrência de clones entre cepas de origens diversas como Cesaris et al. (2007) entre cepas não relacionadas e Katsunuma et al. (2008) que encontrou padrões idênticos entre cepas oriundas de frangos de corte e humanos, entretanto os isolados eram geograficamente relacionados.

Neste trabalho, em virtude da não existência de correlação genética entre os isolados não foi possível estabelecer relação epidemiológica entre os mesmos, ao contrário de Ramchandani et al. (2005) que descreveram cepas resistentes de *E. coli* proveniente de animais com perfil eletroforético indistinguível em relação a um grupo clonal responsável por infecções do trato urinário nos Estado Unidos, aventando a hipótese de que estas infecções em humanos seriam, na verdade, doenças de origem alimentar, o que traria sérias implicações para a saúde pública.

Assim também Manges et al., (2007) demonstraram evidências epidemiológicas de que mulheres com infecções do trato urinário por *E. coli* resistente haviam adquirido esta cepa através de alimentos de origem animal e Johnson et al. (2007) revelaram que na população norte americana muitas das *E. coli* fecais resistentes foram adquiridas muito provavelmente de aves de capoeira do que dos próprios humanos.

O maior percentual de similaridade encontrado entre as cepas de alimentos foi de 72,73% entre dois isolados oriundos das matrizes vatapá e pão metro com lombinho e queijo provenientes, inclusive, de municípios diferentes (dados não mostrados), mas que apresentaram em comum resistência à tetraciclina (Figura 05). Entre as cepas clínicas esse percentual foi de 81,82%, também encontrado entre duas cepas sendo as mesmas obtidas de coproculturas e ambas resistentes a tetraciclina (Figura 06).

A resistência a antimicrobianos é uma característica que pode facilitar o agrupamento de microrganismos resistentes em estudos de genotipagem, no entanto, neste estudo as cepas que apresentavam o mesmo perfil de resistência, conforme mostrado na Tabela 05, não foram alocadas em grupos semelhantes quando seus perfis foram avaliados, sugerindo-se então que somente a característica de resistência a antimicrobianos não é suficiente para determinar agrupamento de perfis em se tratando de cepas não relacionadas epidemiologicamente. As cepas com maior percentual de similaridade apresentavam em comum resistência a tetraciclina, mas tinham padrões de resistência diferentes em relação aos outros dez antimicrobianos testados.



ID Strain	Data de Isolamento	Antimicrobial resistance	PFGE Profile	Origem
A42	28/07/2009	TET, CLO	AA1	Espinhaço salgado suíno
A48	10/08/2009	TET	F2	Torta de queijo e presunto
A15	26/08/2008	TET	B1	Vatapá
A17	22/07/2008	AMP, TET, SUT	A1	Vatapá
A49	10/08/2009	TET	DD1	Pão metro
A32	21/07/2009	AMP, AMC, CFL, TET,	Y1	Carne bovina *in natura*
A56	16/09/2009	*CFL	BB1	Carne suína *in natura*
A20	26/08/2008	TET	C1	Salada crua
A63	29/09/2009	AMP	H1	Leite pasteurizado tipo C
A31	25/06/2009	*CFL	D1	Queijo minas frescal
A51	10/08/2009	AMP, CFL, GEN, TET, CIP, SUT	G1	Frango *in natura*
A30	24/06/2009	TET	CC1	Queijo mussarela
A38	21/07/2009	AMC, CFL	E1	Carne bovina *in natura*

Figura 05 - Dendrograma gerado pelo software GelCompar II mostrando, através do coeficiente de Dice, a relação entre os 13 perfis representativos dos isolados de *Escherichia coli* oriundos de alimentos resistentes aos antimicrobianos.
* sensibilidade intermediária

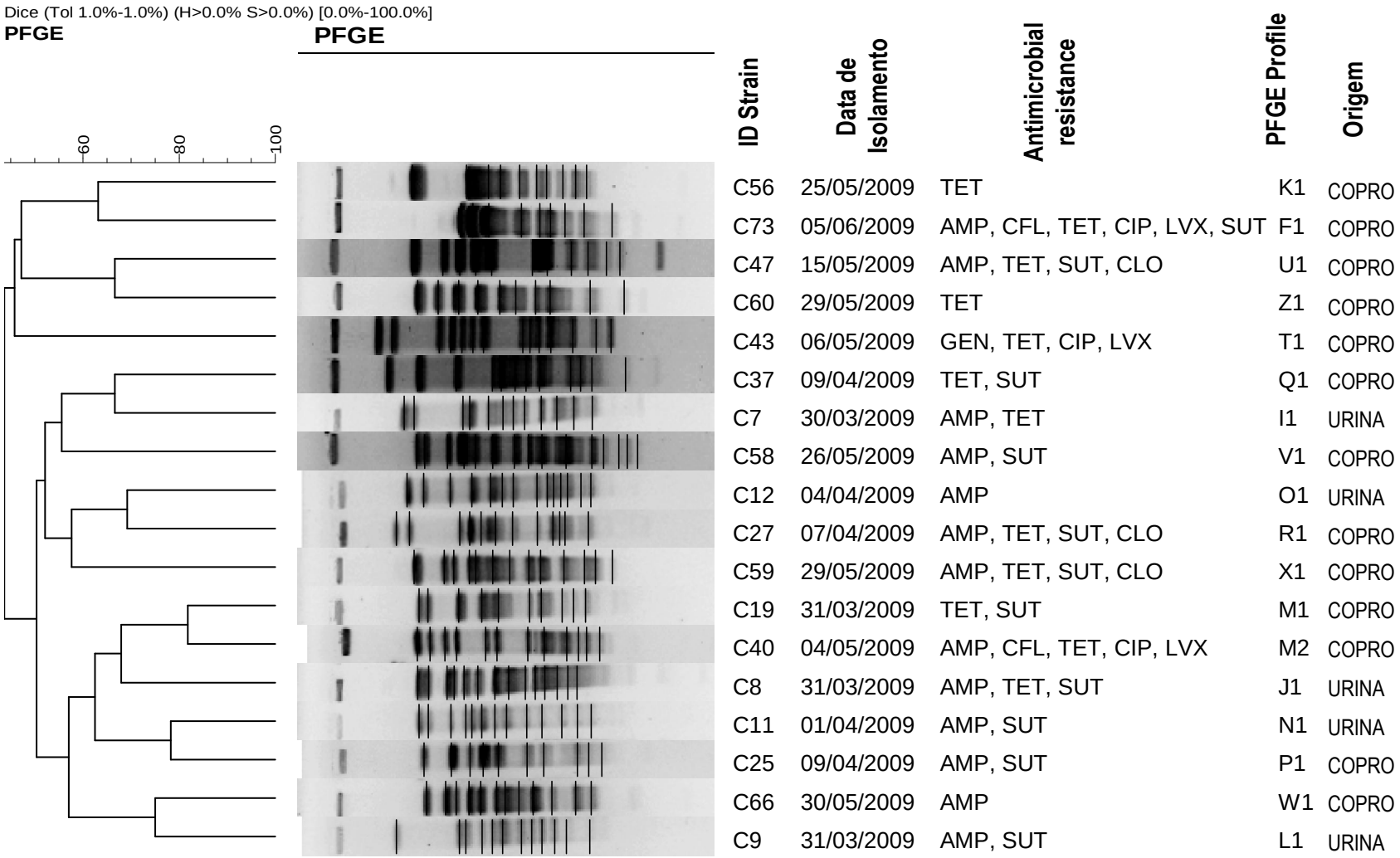


Figura 06 - Dendrograma gerado pelo software GelCompar II mostrando, através do coeficiente de Dice, a relação entre os 18 perfis representativos dos isolados clínicos de *Escherichia coli* resistentes aos antimicrobianos.

4. CONCLUSÕES

Considerando as análises realizadas e os resultados obtidos por este trabalho pode-se concluir que:

- As cepas de *Escherichia coli* estudadas não apresentaram altos percentuais de resistência aos antimicrobianos. No geral, a maioria das cepas foi suscetível aos 11 antimicrobianos testados.

- Dentre as cepas resistentes houve prevalência de resistência a tetraciclina e ampicilina entre os isolados clínicos e para as cepas oriundas de alimentos essa prevalência foi maior para tetraciclina.

- Apesar de a maioria das cepas ter sido sensível aos antimicrobianos testados observou-se, entre as resistentes, percentuais elevados de multirresistência, principalmente entre os isolados clínicos e as cepas de alimentos de origem animal.

- Avaliando os resultados de todas as cepas de *E. coli* testadas, independentemente da origem das mesmas, a tetraciclina aparece em primeiro lugar em número de cepas resistentes.

- Houve coincidência para três perfis de resistência entre cepas clínicas e de alimentos, entretanto essa semelhança não foi suficiente para que as cepas fossem agrupadas como similares após a realização da tipagem molecular dos microrganismos.

- A tipagem molecular dos isolados resistentes por PFGE resultou em 31 perfis distintos, demonstrando a heterogeneidade de perfis encontrada dentre as cepas estudadas.

- Em virtude da diversidade de perfis relatada, não foi possível determinar a presença de clones entre as cepas, tampouco de grupos clonais, pois os padrões de bandas foram bastante distintos. Também não se observou similitude em meio aos isolados de mesma origem que pudesse estabelecer um padrão molecular prevalente entre eles.

- Em face da variedade de perfis determinada, não se pôde estabelecer ligação epidemiológica entre os isolados resistentes de origem diferentes nem mesmo dentre aqueles de mesma procedência.

- Quando se estuda cepas sem relação epidemiológica a possibilidade de ocorrência de clones entre os isolados é pequena. Além disso, nestes casos, características em comum como resistência a antimicrobianos não são suficientes para agrupar os isolados em estudos moleculares.

ABSTRACT

MELO, D. B. **Clonality by PFGE and antimicrobial susceptibility profile of strains of *Escherichia coli* isolated from food and clinical specimens.** Orientador: Prof. Dr. Alaíse Gil Guimarães.

The antimicrobial resistance of microorganisms has increased in recent times arousing concern of organs of public health. Resistant Microorganisms can be transferred to humans through consumption of contaminated food, may cause diseases difficultï to or promote the spread of antibiotic resistance genes. The goal of this work was to determine the antimicrobial susceptibility profile of strains of *Escherichia coli* isolated from clinical samples of foods and in the State of Bahia, and determine their clonal and epidemiologic profile. The antimicrobial sensitivity assessment was performed by disk diffusion on agar as methodology of CLSI being tested 11 antibiotics and the clonal profile was obtained by Pulsed Field Gel Electrophoresis ï PFGE. Photographs of gels were evaluated by software GelCompar II for assessment of the similarity between profiles and creation of dendrogramas. Of 84 strains evaluated 53 (63%) were susceptible to microbial tested 11, two (2.4%) had intermediate sensitivity profile and 29 have resistance to at least one antimicrobial. Ampicillin and tetracycline antibiotics were for which clinical isolates showed the highest degree of resistance, already among the strains isolated from food standard resistance was greater for tetracycline. There was a high percentage of multi-drug resistant strains, particularly among clinical isolates. Further training of 14 profiles of resistance between the strains being three common profiles between clinical isolates and food and ignoring the origin of strains tetracycline appeared first in terms of number of e. coli resistant. In relation to the genetic profile of strains obtained by Pulsed Field (PFGE) were found 31 distinct profiles not observing strains with default eletroforético indistinguishable that could characterize a clone. Thus, on grounds of non-existence of genetic correlation between isolates could not establish epidemiological link between them. The greatest percentage of similarity was found 84.21%, between a clinical and strain isolated from food representing 6.5% of samples. Between the strains of food this percentage was 72.73% and for the clinical strains 81.82%. Strains with higher percentage of similarity presented in common resistance to tetracycline. The strains of *Escherichia coli* studied failed to provide high resistance to antimicrobials, however observed large percentage of multi-drug resistant isolates. Two antibiotics stood out in terms of number of strains resistant: ampicillin and tetracycline. Through molecular typing not detected clones as well as it could not be established epidemiologic relation between the strains, because their profiles were quite different. Thus, it is suggested that between different source isolates the possibility of clones is small.

Keywords: resistance, *Escherichia coli*, PFGE, clonality

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F.M.; WEGENER H.C.. The effect of antibiotic usage in food animals on the development of antimicrobial resistance of importance for human in *Campylobacter* and *Escherichia coli.* **Microbes and Infection,** Paris, v, 1, n. 8, p. 639-644, jul. 1999.

ALTALHI, A.D.; GHERBAWY, Y. A.; HASSAN, S. A. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from retail raw chicken meat in Taif, Saudi Arabia. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 3, p. 281-285, 2010.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. Washington, DC: APHA, 2001. ISBN: 0-87553-175-X

ANGULO, F. J.; NARGUND, V. N.; CHILLER, T. C. Evidence of an association between use of anti-microbial agents in food animals and anti-microbial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance. **Journal of Veterinary Medicine Series B,** v. 51, n. 8-9, p. 374-379, Nov. 2004.

AVERY, S. M. et al. Pulsed field gel electrophoresis of related *Escherichia coli* O157 isolates associated with beef cattle and comparison with unrelated isolates from animals, meats and humans. **International Journal of Food Microbiology**, v. 92, n. 2, p. 161ï 169, Apr. 2004.

BARTOLONI, A. et al. Increasing resistance in commensal *Escherichia coli*, Bolivia and Peru. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 2, p. 338-340, Feb. 2008.

CAMPOS, M. R. H. et al. Caracterização fenotípica pelo antibiograma de cepas de *Escherichia coli* isoladas de manipuladores, de leite cru e de queijo ñMinas Frescalòem um laticínio de Goiás, Brasil, **Ciência Rural,** Santa Maria, v.36, n.4, p. 1221-1227, jul-ago, 2006.

CAMPOS, M. R. H. et al. Genetic heterogeneity of *Escherichia coli* strains isolated from raw milk, Minas Frescal cheese, and food handlers. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia,** Belo Horizonte, v.61, n.5, p.1203-1209, 2009.

CESARIS, L. et al. Discriminating Between Strains of *Escherichia coli* Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis and BOX-PCR. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 4, n. 4, p. 473-480, 2007.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. 2010. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing: Twentieth informational supplement. CLSI document M100-S20, Vol 30, nº 1, replaces M100-S19, Vol. 29, nº. 3. Clinical And Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. January 2010.

COSTA, D. et al. Mechanisms of Antibiotic Resistance in *Escherichia coli* Isolates Recovered from Wild Animals. **Microbial Drug Resistance**, v. 14, n. 1, p. 71-77, Mar. 2008.

HANNAH, E.L. et al. Molecular analysis of antimicrobial-susceptible and -resistant *Escherichia coli* from retail meats and human stool and clinical specimens in a rural community setting. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 3, p. 285-295, 2009.

JAKOBSEN, L. et al. *Escherichia coli* isolates from broiler chicken meat, broiler chickens, pork, and pigs share phylogroups and antimicrobial resistance with community-dwelling humans and patients with urinary tract infection. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 05, p. 537-547, 2010.

JOUINI, A. et al. Detection of multiple-antimicrobial resistance and characterization of the implicated genes in *Escherichia coli* isolates from foods of animal origin in Tunis**. Journal of Food Protection**, v. 72, n. 5, p. 1082-1088, may. 2009.

JOHNSON, J. R. et al. Antimicrobial drugï resistant *Escherichia coli* from humans and poultry products, Minnesota and Wisconsin, 2002ï 2004. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 6, p. 838-846, Jun. 2007.

MANGES, A. R. et al. Retail meat consumption and the acquisition of antimicrobial resistant *Escherichia coli* causing urinary tract infections: a caseï control study. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 4, n. 4, p. 419-431, winter, 2007

MARTINS, S. C. S. et al. ñScreeningòde linhagens de *Escherichia coli* multiresistentes a antibióticos, em alimentos de origem animal, no estado do Ceará, Brasil. **Higiene Alimentar**, v.17, n. 104/105, p. 71-76, jan/fev, 2003.

MEYER, E. LUNKE, C., KIST, M., SCHWAB, F., FRANK, U. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from food, animals and humans in Germany. **Infection**, v. 36, n. 01, p. 59-61, Feb. 2008.

MOREIRA, M. A. S et al. Resistência a antimicrobianos dependente do sistema de efluxo multidrogas em *Escherichia coli* isoladas de leite mastítico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia***,* v.60, n.6, p.1307-1314, 2008

KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica e Clínica**. 6. ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan Artmed. 1998. 1060p

KATSUNUMA, Y. et al. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis patterns of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* and enterococci isolates from the feces of livestock and livestock farmers in Japan. **The Journal of General and Applied Microbiology,** v. 54, n. 1, p. 39-50, 2008.

KNEZEVIC, P.; PETROVIC, O. Antibiotic resistance of commensal *Escherichia coli* of food-producing animals from three Vojvodinian farms, Serbia. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 31, n. 4, p. 360ï 363, Apr. 2008

HOYLE et al. Molecular characterisation of bovine faecal *Escherichia coli* shows persistence of defined ampicillin resistant strains and the presence of class 1 integrons on an organic beef farm. **Veterinary Microbiology**, v. 115, n. 1-3, p. 0250ï 257, Jun. 2006.

PIRES, M. C. S. et al. Prevalência e suscetibilidades bacterianas das infecções comunitárias do trato urinário, em Hospital Universitário de Brasília, no período de 2001 a 2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** v, 40, n. 6, p. 643-647, nov-dez, 2007.

RAMCHANDANI, M. et al. Possible animal origin of human-associated, multidrugresistant, uropathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Infectious Diseases,** v. 40, n. 2, p. 251ï 257, Jan. 2005.

RIANO, I. et al. Detection and characterization of extended-spectrum ƀ-lactamases in *Salmonella* enterica strains of healthy food animals in Spain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy,** Oxford, v. 58, n. 4, p. 844ï 847, Oct. 2006.

SMITH, D.H. Transfer of antibiotic resistance from animal and human strains of *Escherichia coli* to resident *E. coli* in the alimentary tract of man. **The Lancet**, v. 293, n. 7607, p. 1174-1179, jun. 1969.

SMITH, J. L. et al. Impact of antimicrobial usage on antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* strains colonizing broiler chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 5, p. 1404ï 1414, Mar. 2007.

TENOVER, F. C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 33, n. 9, p. 2233ï 2239, Sept. 1995.

THORSTEINSDOTTIR, T. R. et al. Prevalence and genetic relatedness of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolated from animals, foods and humans in Iceland. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, n. 3, p. 189-196, May. 2010.

VAN, T.T.H. et al. Antibiotic resistance in food-borne bacterial contaminants in Vietnam. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 24, p. 7906ï 7911, Dec. 2007.

VAN, T.T.H. et al. Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: an analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, n. 3, p. 217ï 223, Jun. 2008.

VIEIRA, A. R. et al. Association between tetracycline consumption and tetracycline resistance in *Escherichia coli* from healthy danish slaughter pigs. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 1, p. 99-109, 2009.

VOLTATTONI, P. et al. Identificación de virotipos de *Escherichia coli* aislados de alimentos listos para el consumo. **Revista Investigación en Salud,** v. 5, n. 1-2, p. 75-83, 2002.

von BAUM, H.; MARRE, R. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, n. 6-7, p. 503ï 511, Oct. 2005.

WANG, H.H. et al. Food commensal microbes as a potentially important avenue in transmitting antibiotic resistance genes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 254, n. 2, p. 226ï 231, Feb. 2006.

WINOKUR, P.L. et al. Evidence for transfer of CMY-2 AmpC beta-lactamase plasmids between *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and humans. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 45, n. 10, p. 2716ï 2722, Oct. 2001.

CONCLUSÕES GERAIS

A ocorrência e prevalência de cepas resistentes aos antimicrobianos, bem como a preocupação com a propagação de microrganismos resistentes, têm aumentado nos últimos anos fazendo com que estudos nesta área se avolumem.

A conjugação de métodos fenotípicos e genotípicos para avaliação de microrganismos tem se mostrado eficiente nos estudos epidemiológico-moleculares trazendo resultados satisfatórios e contribuindo para evolução das pesquisas neste campo do conhecimento científico.

Este trabalho contribuiu para a pesquisa nesta área, analisando microrganismos isolados no estado da Bahia, através da avaliação de inter-relações entre cepas de *Escherichia coli* resistentes de origem humana e de alimentos, proporcionando a obtenção de dados regionais.

No entanto, como o número de cepas analisadas foi pequeno e sua coleta foi relativamente restrita, faz-se necessária a realização de maiores estudos que englobem um número superior de cepas e que seja mais representativo levando em consideração as dimensões territoriais do estado da Bahia.

APÊNDICES

Apêndice A ï Termo de compromisso para utilização dos dados das cepas de origem humana empregadas na pesquisa.

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DE ALIMENTOS
Rua Barão de Jeremoabo s/n, Campus de Ondina, Salvador-BA, CEP: 40.170-290
Tel: (71) 3283-6920 e-mail: pgali@ufba.br

TERMO DE COMPROMISSO PARA UTILIZAÇÃO DE DADOS

Título do Projeto

	Cadastro no CEP

Os autores do presente projeto se comprometem a preservar a privacidade dos sujeitos da pesquisa, cujos dados serão coletados em prontuários (ou base e/ou banco de dados) do*(a)* .... (*identificar a instituição, e, se necessário, o setor ... ou outra denominação interna da instituição que é detentora do referido banco de dados e/ou prontuários nos quais serão coletados os dados*). Concordam, igualmente, que essas informações serão utilizadas única e exclusivamente com finalidade científica para execução do presente projeto, preservando-se integralmente o anonimato dos pacientes.

Salvador, ____ de _____ de _____

Nome dos Pesquisadores	**Assinatura**

APÊNDICE B ï Formulário utilizado na coleta de informações das cepas de *Escherichia coli* isoladas de alimentos

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS
PESQUISA: Padrão clonal e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* isoladas de alimentos e de espécimes clínicas

FORMULÁRIO DE ISOLADOS ALIMENTARES

Nº	Microrganismo	Data de isolamento	Método de isolamento	Surto / Rotina/ Pesquisa	Cidade	Laboratório de Procedência	Alimento	Outras Informações

APÊNDICE C ï Formulário utilizado na coleta de informações das cepas de *Escherichia coli* isoladas de amostras clínicas

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS
PESQUISA: Padrão clonal e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* isoladas de alimentos e de espécimes clínicas

FORMULÁRIO DE ISOLADOS CLÍNICOS

Nº	Microrganismo	Data de isolamento	Método de isolamento	Material do isolamento	Cidade	Procedência (Hospital, Lab.)	Paciente		
							Sexo	Idade	Observação

APÊNDICE D - Informações das cepas de *Escherichia coli* isoladas de alimentos utilizados no estudo.

ID	FONTE	DATA DE ISOLAMENTO	ORIGEM	ANTIMICROBIANOS										
				AMP	AMC	CFL	CTX	CRO	GEN	TET	CIP	LVX	SUT	CLO
14	ALIMENTO	14/01/2009	Hamburguer cru	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
15	ALIMENTO	26/08/2008	Vatapá	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
16	ALIMENTO	16/06/2008	Camarão	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
17	ALIMENTO	22/07/2008	Vatapá	R	S	I	S	S	S	R	S	S	R	S
19	ALIMENTO	16/06/2008	Salada	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
20	ALIMENTO	26/08/2008	Salada	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
22	ALIMENTO	22/04/2009	Carne bovina *in natura*	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
27	ALIMENTO	27/02/2009	Salada Crua	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
28	ALIMENTO	27/02/2009	Filé de peixe frito	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
29	ALIMENTO	28/02/2009	Macarão cozido	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
30	ALIMENTO	24/06/2009	Queijo mussarela	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
31	ALIMENTO	25/06/2009	Queijo Minas Frescal de búfala	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
32	ALIMENTO	21/07/2009	Carne bovina *in natura*	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S	I
33	ALIMENTO	22/07/2009	Queijo prato lanche	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
34	ALIMENTO	23/07/2009	Manteiga	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
35	ALIMENTO	20/07/2009	Arrumadinho	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
36	ALIMENTO	21/07/2009	Queijo mussarela	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
37	ALIMENTO	01/07/2009	Arroz cozido	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
38	ALIMENTO	21/07/2009	Carne bovina *in natura*	I	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
39	ALIMENTO	21/07/2009	Queijo mussarela	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
40	ALIMENTO	28/07/2009	Carne bovina *in natura* moída	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
41	ALIMENTO	28/07/2009	Carne do sol	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
42	ALIMENTO	28/07/2009	Espinhaço salgado de suíno	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R
43	ALIMENTO	01/07/2009	Frango assado	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
44	ALIMENTO	01/07/2009	Arroz cozido	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
45	ALIMENTO	01/07/2009	Feijão tropeiro	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
46	ALIMENTO	01/07/2009	Frango assado	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
47	ALIMENTO	01/07/2009	Feijão tropeiro	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
48	ALIMENTO	10/08/2009	Torta de queijo e presunto	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
49	ALIMENTO	10/08/2009	Pão metro com lombinho e queijo	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
50	ALIMENTO	04/08/2009	Leite pasteurizado tipo C integral	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
51	ALIMENTO	10/08/2009	Frango *in natura*	R	S	R	S	S	R	R	R	I	R	I
53	ALIMENTO	13/08/2009	Aipim descascado	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
54	ALIMENTO	27/08/2009	Salada de Frutas	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
56	ALIMENTO	16/09/2009	Carne suína *in natura*	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
63	ALIMENTO	29/09/2009	Leite pasteurizado tipo C integral	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

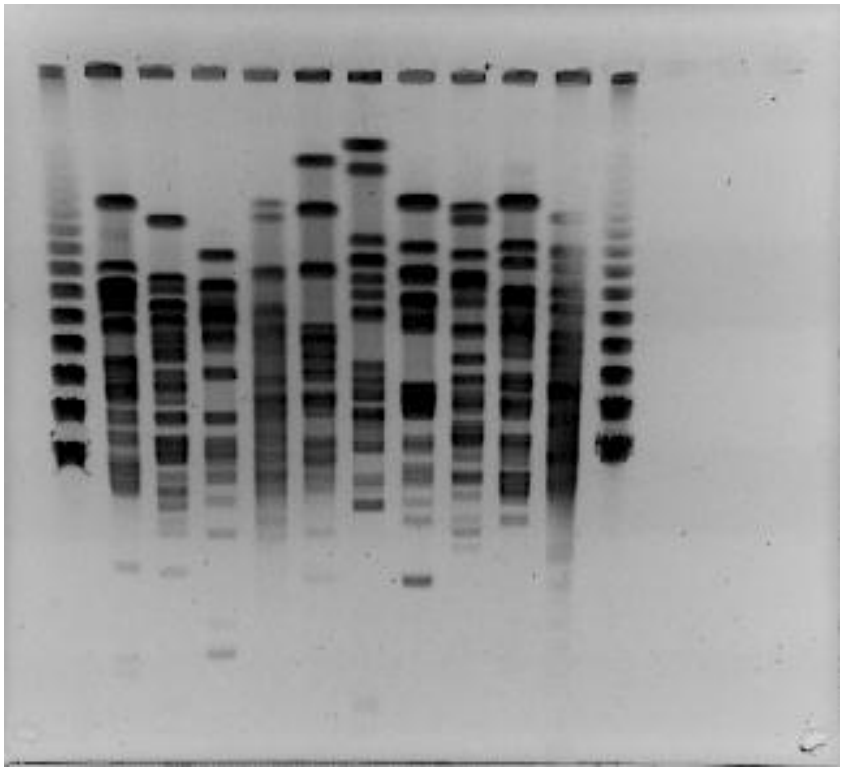
Apêndice E ï Informações das cepas de *Escherichia coli* isoladas de espécimes clínicos utilizadas no estudo.

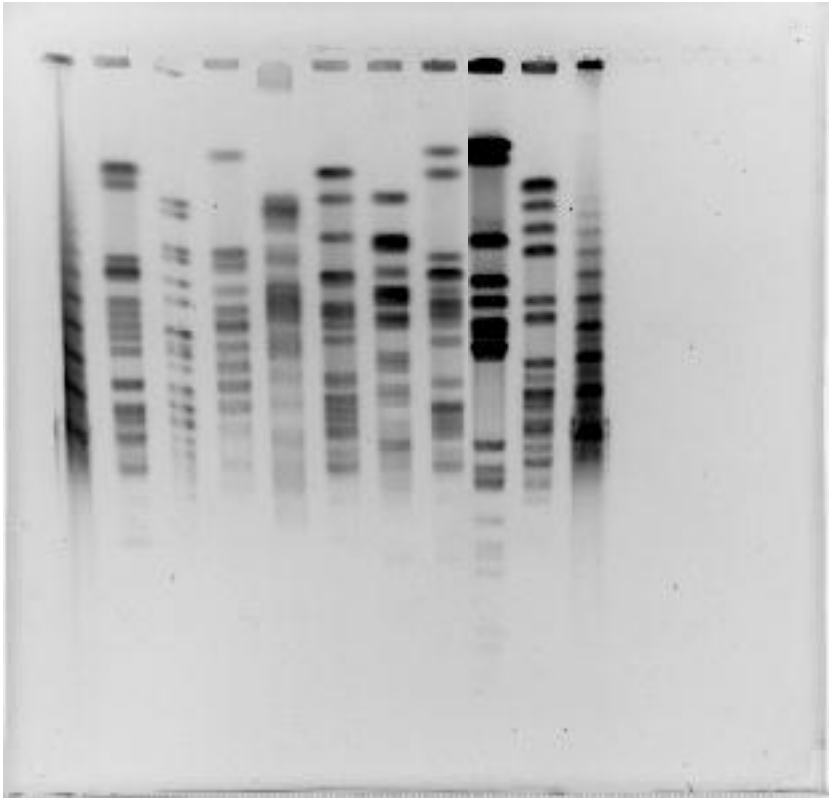
ID	DATA DE ISOLAMENTO	SEXO	FONTE	ANTIMICROBIANOS										
				AMP	AMC	CFL	CTX	CRO	GEN	TET	CIP	LVX	SUT	CLO
4	29/03/2009	F	URINA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5	29/03/2009	M	URINA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6	31/03/2009	F	URINA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
7	30/03/2009	F	URINA	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S
8	31/03/2009	F	URINA	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S
9	31/03/2009	F	URINA	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
10	01/04/2009	F	URINA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
11	01/04/2009	F	URINA	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
12	04/04/2009	F	URINA	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
18	03/04/2009	M	COPRO	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
19	31/03/2009	F	COPRO	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S
20	04/04/2009	F	COPRO	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
21	03/04/2009	M	COPRO	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
22	04/04/2009	F	COPRO	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
25	09/04/2009	F	COPRO	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
26	11/04/2009	F	COPRO	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
27	07/04/2009	M	COPRO	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R
28	13/04/2009	M	COPRO	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
29	09/04/2009	M	COPRO	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
30	06/04/2009	F	COPRO	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
35	28/04/2009	F	COPRO	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
37	09/04/2009	F	COPRO	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S
40	04/05/2009	F	COPRO	R	S	R	I	I	S	R	R	R	S	S
41	28/04/2009	F	COPRO	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
43	06/05/2009	M	COPRO	S	S	I	S	S	R	R	R	R	S	S
45	20/05/2009	F	COPRO	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
46	22/05/2009	F	COPRO	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
47	15/05/2009	M	COPRO	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R
48	22/05/2009	F	COPRO	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
49	08/05/2009	M	COPRO	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

APÊNDICE E, Cont.

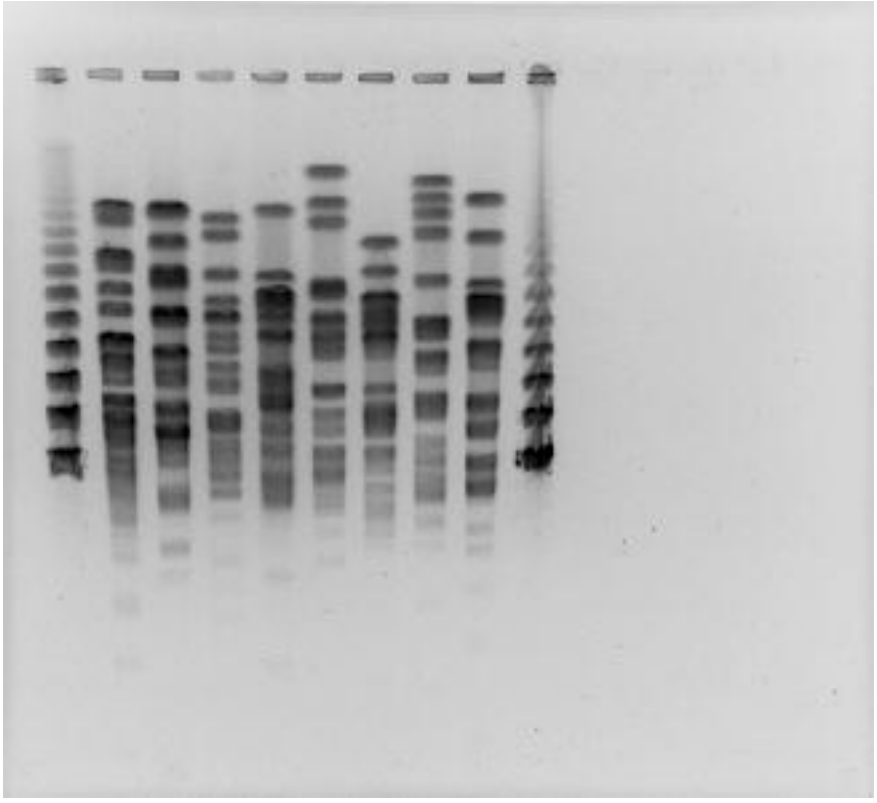
ID	DATA DE ISOLAMENTO	SEXO	FONTE	ANTIMICROBIANOS										
				AMP	AMC	CFL	CTX	CRO	GEN	TET	CIP	LVX	SUT	CLO
50	22/05/2009	F	COPRO	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
51	11/05/2009	F	COPRO	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
55	27/05/2009	F	COPRO	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
56	25/05/2009	F	COPRO	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
57	23/05/2009	F	COPRO	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
58	26/05/2009	F	COPRO	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
59	29/05/2009	M	COPRO	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R
60	29/05/2009	F	COPRO	S	S	I	S	S	S	R	S	S	S	S
63	04/06/2009	M	COPRO	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
64	01/06/2009	M	COPRO	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
65	02/06/2009	M	COPRO	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
66	30/05/2009	F	COPRO	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
67	02/06/2009	F	COPRO	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
68	01/06/2009	F	COPRO	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
72	08/06/2009	F	COPRO	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
73	05/06/2009	F	COPRO	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R	S
74	08/06/2009	F	COPRO	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
75	09/06/2009	M	COPRO	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

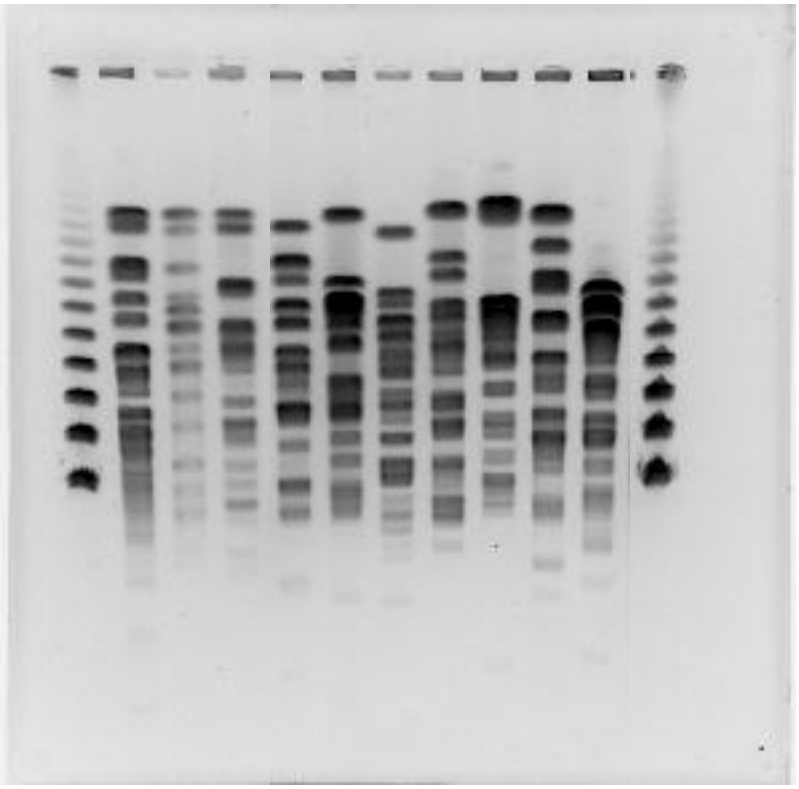
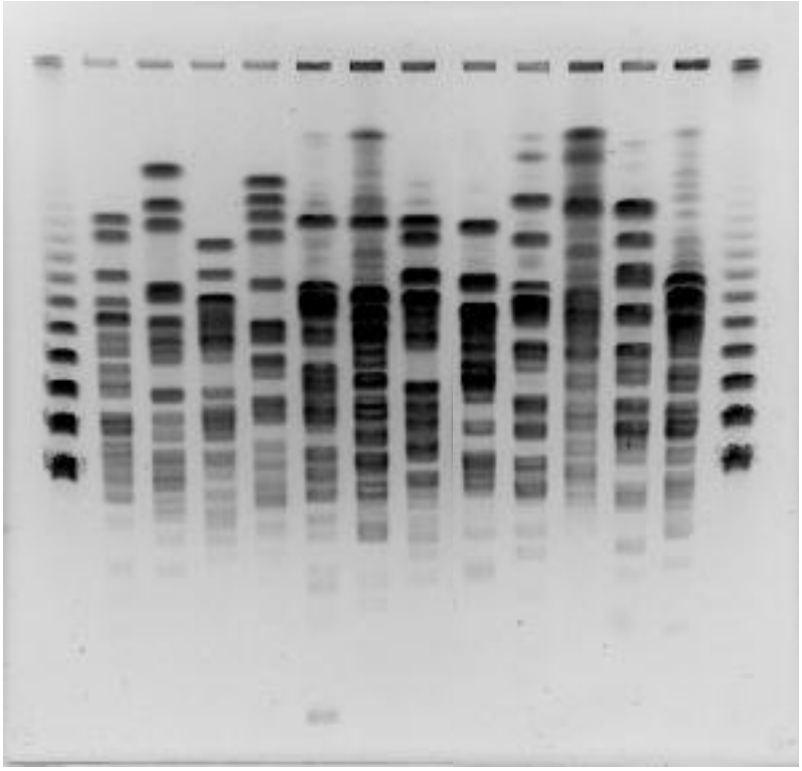
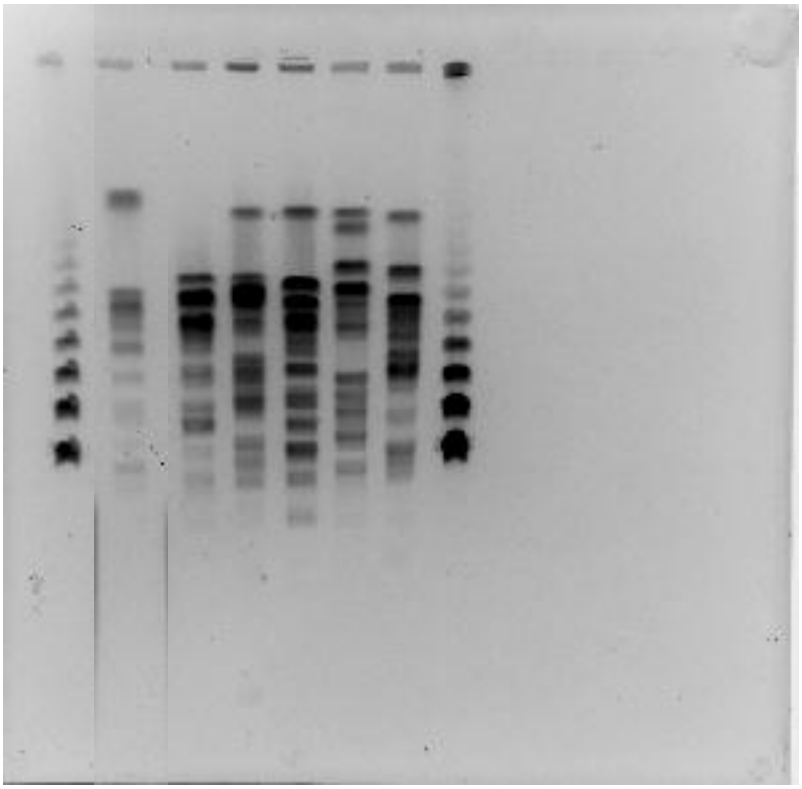
APÊNDICE F. Imagens representativas dos géis de eletroforese em campo pulsado das cepas utilizadas neste estudo.





APÊNDICE F, Cont.





APÊNDICE F, Cont.