



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

**CINTIA MATOS LIMA**

***Escherichia coli* EM ALIMENTOS PRONTOS PARA O CONSUMO, RESISTÊNCIA  
A ANTIMICROBIANOS E PATOGENICIDADE**

**SALVADOR**

**2016**

**CINTIA MATOS LIMA**

***Escherichia coli* EM ALIMENTOS PRONTOS PARA O CONSUMO, RESISTÊNCIA  
A ANTIMICROBIANOS E PATOGENICIDADE**

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

Orientadora: Profa. Dra. Rogeria Comastri de Castro Almeida

**SALVADOR**

**2016**

Modelo de ficha catalográfica fornecido pelo Sistema Universitário de Bibliotecas da UFBA para ser confeccionada pelo autor

Matos Lima, Cintia

Escherichia coli em alimentos prontos para o consumo, resistência à antimicrobianos e patogenicidade / Cintia Matos Lima. -- Salvador, 2016.  
60 f. : il

Orientador: Rogeria Comastri de Castro Almeida.  
Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos) -- Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, 2016.

1. Escherichia coli. 2. Antimicrobianos. 3. Genes de virulência. 4. Restaurantes. I. Comastri de Castro Almeida, Rogeria. II. Título.



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

## TERMO DE APROVAÇÃO

CINTIA MATOS LIMA

*Escherichia coli* EM ALIMENTOS PRONTOS PARA O CONSUMO,  
RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E PATOGENICIDADE

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (nível Mestrado Acadêmico) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos.

Aprovada em 29 de abril de 2016.

### BANCA EXAMINADORA

Dr<sup>a</sup>. Regeria Comastri de Castro Almeida  
Universidade Federal da Bahia  
Orientadora

Dr<sup>a</sup>. Alaíse Gil Guimarães  
Universidade Federal da Bahia

Dr<sup>a</sup>. Isabella de Matos Mendes da Silva  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

## AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me permitido enfrentar as dificuldades e ter coragem para ir até o fim.

À Profa. Dra. Rogeria Comastri de Castro Almeida pela orientação e pelos ensinamentos transmitidos, paciência e dedicação.

À amiga Ingrid Evelyn Gomes Lima Souza pelo apoio, força, companheirismo e chocolates durante essa caminhada.

À Profa. Clícia Capibaribe Leite e toda equipe do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Farmácia da UFBA pela imensa colaboração nas análises.

Ao Prof. Dr. Tomomasa Yano e Taila dos Santos Alves da Universidade Estadual de Campinas pela colaboração nas análises e suporte dado.

À Profa. Dra. Norma Suely Evangelista-Barreto, à doutoranda Marly e às mestrandas Elaine e Vaneza pela colaboração nas análises e todo suporte dado durante minha passagem pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

Aos membros das bancas de Qualificação e Defesa, Profa. Dra. Alaíse Gil Guimarães e Profa. Dra. Isabella de Matos Mendes da Silva, pela valiosa colaboração.

Ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Farmácia da UFBA pela ajuda e esclarecimentos fornecidos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa da Bahia (FAPESB) pelo Auxílio Dissertação.

À Adrielle Trevisan, Adriana Barros e Aline Leite, grandes companheiras de trabalho e amigas inestimáveis, pelo companheirismo nos momentos de alegrias e de angústias vividos.

Aos queridos velhos amigos, Isis Borges, Fernanda Lorders, Kelly Franco, Vanessa Ribeiro, Jamerson Cavalcante e Felipe Valverde, por todo o amor e dedicação.

Aos amigos que conquistei ao longo dessa jornada, Túlio, Lú e Bali, pelo apoio, carinho e bons momentos compartilhados. Fundamentais para essa vitória.

*"Sonhe com o que você quiser. Vá para onde você queira ir. Seja o que você quer ser, você possui apenas uma vida e nela só temos uma chance de fazer aquilo que queremos. Tenha felicidade bastante para fazê-la doce. Dificuldades para fazê-la forte. Tristeza para fazê-la humana. E esperança suficiente para fazê-la feliz"*

**Clarice Lispector**

LIMA, Cíntia Matos. *Escherichia coli* em alimentos prontos para o consumo, resistência a antimicrobianos e patogenicidade. 58f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016.

## RESUMO

*Escherichia coli* é normalmente encontrada no trato gastrointestinal de humanos e animais de sangue quente e a maioria das cepas não oferece risco à saúde de seu hospedeiro. Utilizada como indicador de qualidade higiênico-sanitária de alimentos, a sua presença em alimentos pode indicar contaminação fecal recente, falhas na manipulação e presença de outros patógenos. Determinadas cepas de *E. coli*, assim como outros patógenos, causam doenças veiculadas por alimentos (DVA) em humanos representando importante causa de morbimortalidade no mundo e um impedimento significativo para o desenvolvimento socioeconômico de diversos países. Infelizmente, muitas DVA são negligenciadas por comensais e profissionais de saúde, resultando em falhas terapêuticas e subnotificação dos casos. No Brasil o perfil epidemiológico das DVA é pouco conhecido, e apenas alguns estados e municípios dispõem de dados dos agentes etiológicos e alimentos comumente envolvidos, população de maior risco e fatores contribuintes. O objetivo desse estudo foi determinar a ocorrência de *E. coli* em alimentos prontos para o consumo, a patogenicidade dos isolados e a susceptibilidade a antimicrobianos. Um total de 486 amostras de alimentos prontos para o consumo oriundas de restaurantes comerciais, institucionais e da rede hoteleira de Salvador, BA, e municípios vizinhos, foram investigadas. Essas amostras foram agrupadas em cereais e leguminosas, preparações cárneas, saladas cozidas e cruas, guarnições, sopas, molhos, sobremesas e sucos. Para a detecção do microrganismo foi utilizada a metodologia do Número Mais Provável (NMP) e os resultados demonstraram que 3,1% das amostras estavam contaminadas com o microrganismo. As saladas cruas apresentaram o maior percentual de detecção (n=7) 1,4%, seguida pelas saladas cozidas (n=4) 0,8%, preparações cárneas (n=2) 0,4%, cereais e leguminosas (n=2) 0,4%. Um total de 15 isolados foi obtido, sendo cinco identificados como *E. coli* enteropatogênica, três enteroinvasiva e uma enterohemorrágica. A reação em cadeia da polimerase (PCR) demonstrou que nenhum dos isolados apresentou os genes de virulência, *cnf1*, *cnf2*, *eae*, *sta*, *lt1*, *stx1*, *stx2* e *cdtB*. Quanto à susceptibilidade dos isolados aos antimicrobianos, observou-se resistência a nove (60%) dos 15 agentes testados: sulfametoxazol/trimetoprim (n=2) 13,3%, tetraciclina (n=2) 13,3%, ampicilina (n=2) 13,3%,

cefalotina (n=1) 6,7%, cefotaxima (n=1) 6,7%, cefoxitina (n=1) 6,7%, cloranfenicol (n=2) 13,3%, ácido nalidíxico (n=1) 6,7% e estreptomicina (n=1) 6,7%. Um isolado (33,3%) apresentou multi-resistência, mediada por plasmídeo, à tetraciclina, sulfametoxazol/trimetoprim, ampicilina e cloranfenicol. Os resultados sugerem que os alimentos prontos para o consumo, principalmente as saladas cruas, podem atuar como reservatórios de *E. coli* e facilitar a disseminação de genes de resistência a antimicrobianos para os seres humanos.

**Palavras-chave:** *Escherichia coli*. Antimicrobianos. Genes de virulência. Restaurantes.



LIMA, Cíntia Matos. *Escherichia coli* from ready-to-eat foods, antimicrobial resistance and pathogenicity. 58f. Dissertation (Master degree) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016.

## ABSTRACT

*Escherichia coli* is normally found in the gastrointestinal tract of humans and warm blooded animals and most poses no risk to the health of its host. It is used as an indicator of sanitary quality of food, and their presence in food may indicate recent fecal contamination, fault handling and the presence of other pathogens residents in the gastrointestinal tract. Certain strains of *E. coli* cause gastroenteritis in humans and represent an important cause of morbidity and mortality in the world and a significant impediment to socio-economic development of many countries. Unfortunately, various foodborne illnesses are neglected by consumers and health professionals, resulting in treatment failures and underreporting. In Brazil, the epidemiological profile of the foodborne illnesses is little known, and only a few states and municipalities have data of the etiologic agents and food commonly involved, high-risk population and contributing factors. The aim of this study was to determine the occurrence of *E. coli* in ready to eat food, the pathogenicity of isolates and resistance to antimicrobials. For that, a total of 486 food samples obtained from commercial and institutional restaurants and hotel' restaurants from Salvador, BA, and neighboring municipalities, were investigated. The samples were grouped in cereals and vegetables, meat-based preparations, cooked and raw salads, garnishes, soups and sauces, desserts and juices. For microorganism detection the Most Probable Number (MPN) methodology was used and the results demonstrated that 3.1% of the samples was contaminated by microorganism. The raw salads showed the highest detection rate (n = 7) 1.4%, followed by the cooked salad (n = 4) 0.8% meat-based preparations (n = 2) 0.4% and cereals and vegetables (n = 2) 0.4%. A total of 15 isolates was obtained and five of them were identified as *E. coli enteropathogenic*, three enteroinvasive and one enterohemorrhagic. Polymerase Chain Reaction (PCR) assay showed that none of the isolates presented the virulence genes, *cnf1*, *cnf2*, *eae*, *sta*, *lt1*, *stx1*, *stx2* and *cdtB*. Regarding to susceptibility/resistance to antimicrobials, the isolates showed resistance to nine antimicrobials (60%) of the 15 tested: sulfamethoxazole/trimethoprim (n = 2) 13.3%, tetracycline (n = 2) 13.3%, ampicillin (n = 2) 13.3%, cephalothin (n = 1) 6.7%, cefotaxime (n = 1) 6.7%, cefoxitin (n = 1) 6.7% chloramphenicol (n = 2) 13.3%, nalidixic acid (n = 1), and 6.7% streptomycin (n = 1) 6.7%. One iso-

late (33.3%) showed multi-resistance plasmid mediated to tetracycline, trimethoprim/sulfamethoxazole, ampicillin and chloramphenicol. These results suggest that ready to eat food, especially raw salads, can act as reservoirs of *E. coli* and facilitate the spread of antibiotic resistance genes to humans.

**Keywords:** *Escherichia coli*. Antimicrobial. Virulence genes. Restaurants.

## LISTA DE TABELAS

|            |  |    |
|------------|--|----|
| Tabela 1 - | Primers, tamanho dos amplicons, e condições de amplificação usados no ensaio da PCR para pesquisa de fatores de virulência dos isolados de <i>Escherichia coli</i> .   | 44 |
| Tabela 2 - | Alimentos prontos para o consumo analisados, de acordo com a procedência   | 48 |
| Tabela 3 - | Ocorrência de coliformes termotolerantes e <i>Escherichia coli</i> em alimentos prontos para o consumo distribuídos em restaurantes comerciais, restaurantes institucionais e restaurantes da rede hoteleira de Salvador, BA, e municípios circunvizinhos.   | 49 |
| Tabela 4 - | Frequência dos sorotipos EIEC, EHEC e EPEC de isolados de <i>Escherichia coli</i> provenientes de alimentos prontos para o consumo distribuídos em restaurantes comerciais, institucionais e na rede hoteleira de Salvador, BA, e municípios circunvizinhos. | 50 |
| Tabela 5 - | Susceptibilidade dos isolados de <i>Escherichia coli</i> aos agentes antimicrobianos.  | 52 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|      |  |
|------|--|
| A/E  | <i>Attaching and effacing</i>                      |
| ABNT | Associação Brasileira de Normas Técnicas           |
| AMI  | Amicacina  |
| AMC  | Amoxicilina/ Ácido clavulânico                     |
| AMP  | Ampicilina   |
| APHA | <i>American Public Health Association</i>          |
| BPF  | Boas Práticas de Fabricação                        |
| CAZ  | Ceftazidima  |
| CDC  | <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>  |
| CH   | Colite hemorrágica                                 |
| CIP  | Ciprofloxacina                                     |
| CF   | Cefalotina   |
| CFX  | Cefoxitina   |
| CL   | Cloranfenicol                                      |
| CLSI | <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> |
| CTX  | Cefotaxima   |
| DAEC | <i>Escherichia coli</i> aderência difusa           |
| DEC  | <i>Escherichia coli</i> diarreiogênicas            |
| DNA  | <i>Deoxyribonucleic acid</i>                       |
| DVA  | Doenças Veiculadas por Alimentos                   |
| EAEC | <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa           |
| EHEC | <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica          |
| EIEC | <i>Escherichia coli</i> enteroinvasora             |

|       |   |
|-------|---|
| EPEC  | <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica          |
| ETEC  | <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica          |
| FAO   | <i>Food and Agriculture Organization</i>          |
| FDA   | <i>Food and Drug Administration</i>               |
| GEN   | Gentamicina                                       |
| IMAR  | Índice de Múltipla Resistência Antimicrobiana     |
| KAN   | Canamicina  |
| LA    | Alaranjado de acridina                            |
| LEE   | <i>Locus of enterocyte effacement</i>             |
| L-EMB | Levine Eosina Azul de Metileno                    |
| LT    | Enterotoxina termolábil                           |
| NAL   | Ácido nalidíxico                                  |
| NMP   | Número Mais Provável                              |
| OMS   | Organização Mundial de Saúde                      |
| PAI   | Ilha de patogenicidade                            |
| PCR   | <i>Polymerase Chain Reaction</i>                  |
| SHU   | Síndrome Urêmica Hemolítica                       |
| SIHD  | Sistema de Informação Hospitalar Descentralizado  |
| ST    | Enterotoxina termoestável                         |
| STEC  | <i>Escherichia coli</i> produtora de toxina Shiga |
| STR   | Estreptomicina                                    |
| STX   | Sulfametoxazol/ Trimetoprim                       |
| SUS   | Sistema Único de Saúde                            |
| TTP   | Síndrome púrpura trombocitopênia                  |
| TET   | Tetraciclina                                      |

|     |                                  |
|-----|----------------------------------|
| TSA | Ágar tripticase de soja          |
| VM  | Vermelho de metila               |
| WHO | <i>World Health Organization</i> |

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| INTRODUÇÃO GERAL   | 15 |
| OBJETIVOS  | 17 |
| Objetivo geral   | 17 |
| Objetivos específicos  | 17 |
| CAPÍTULO I   | 18 |
| REVISÃO DE LITERATURA  | 18 |
| 1 <i>Escherichia coli</i>  | 18 |
| 1.1 <i>Escherichia coli</i> diarreiogênica   | 19 |
| 1.1.1 <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica   | 20 |
| 1.1.2 <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica   | 21 |
| 1.1.3 <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica  | 22 |
| 1.1.4 <i>Escherichia coli</i> enteroinvasora   | 24 |
| 1.2 <i>Escherichia coli</i> e a resistência a antimicrobianos  | 25 |
| 1.3 <i>Escherichia coli</i> como agente causador de doenças veiculadas<br>por alimentos e ações da vigilância sanitária e epidemiológica | 28 |
| REFERÊNCIAS  | 31 |
| CAPÍTULO II  | 37 |
| ARTIGO   | 37 |
| RESUMO   | 38 |
| ABSTRACT   | 39 |
| 1. Introdução  | 40 |
| 2. Material e métodos  | 41 |

|   |    |
|---|----|
| 2.1. <i>Ocorrência de Escherichia coli em alimentos prontos para o consumo</i>  | 41 |
| 2.1.1. <i>Detecção de Escherichia coli</i>  | 41 |
| 2.1.2. <i>Identificação dos sorogrupos dos isolados de Escherichia coli</i>   | 42 |
| 2.1.3. <i>Detecção de genes de virulência dos isolados de Escherichia coli</i>  | 42 |
| 2.2. <i>Susceptibilidade dos isolados de Escherichia coli a antimicrobianos</i>   | 46 |
| 2.2.1. <i>Detecção de resistência mediada por plasmídeos-R</i>  | 46 |
| 2.3. <i>Análise estatística</i>   | 47 |
| 3. Resultados   | 47 |
| 3.1. <i>Ocorrência de coliformes termotolerantes e Escherichia coli em alimentos prontos para o consumo</i>                                 | 47 |
| 3.2. <i>Identificação sorológica dos isolados de Escherichia coli e detecção de genes de virulência</i>                                     | 48 |
| 3.3. <i>Perfil de sensibilidade dos isolados de Escherichia coli aos antimicrobianos e detecção de resistência mediada por plasmídeos-R</i> | 50 |
| 4. Discussão  | 53 |
| 5. Conclusão  | 55 |
| Agradecimentos  | 56 |
| Conflito de interesse   | 56 |
| Declaração de submissão e verificação   | 56 |
| Referências   | 56 |



## INTRODUÇÃO GERAL

A cada ano ocorrem dois milhões de mortes no mundo decorrentes do consumo de alimentos contaminados. A ocorrência das doenças veiculadas por alimentos (DVA), além de ser uma importante causa de morbi-mortalidade em diversos países, é um importante impedimento para o desenvolvimento socioeconômico. Como agravante, a extensão do problema não é totalmente conhecida por muitos governos, o que impede o adequado direcionamento dos recursos para o controle da segurança dos alimentos e intervenções necessárias (WHO, 2015).

As DVA são, por vezes, negligenciadas pelos comensais e profissionais de saúde, o que resulta em falhas terapêuticas e subnotificação dos casos. No Brasil, o perfil epidemiológico dessas doenças é pouco conhecido, pois apenas alguns estados e municípios dispõem de dados dos agentes etiológicos mais comuns, alimentos comumente envolvidos, população de maior risco e fatores contribuintes (BRASIL, 2010). Nesse contexto, a identificação do agente etiológico e a notificação das doenças são importantes para o desenvolvimento das políticas públicas de prevenção e tratamento dos casos.

Dentre os microrganismos mais envolvidos em surtos de toxinfecção alimentar, destaca-se a *Escherichia coli* originária do trato intestinal do homem e animais de sangue quente. A ocorrência desse microrganismo em alimentos prontos para o consumo indica contaminação durante o processamento, podendo levantar indícios de alimentos mal cozidos ou contaminação cruzada.

Microrganismos indicadores, como *E. coli*, são comumente usados pela indústria e pelos órgãos de Vigilância Sanitária para assegurar a implementação das Boas Práticas de Fabricação (BPF). Em nível de produção primária, a bactéria tem sido identificada como um critério higiênico-sanitário adequado para hortaliças, assim como sua presença fornece evidências ao aumento do risco de patógenos relacionados (TRUCHADO et al., 2016). Diante disso, o controle da qualidade microbiológica dos alimentos é importante para a verificação da eficácia da adoção das Boas Práticas de Fabricação nos serviços de alimentação (HEALTH PROTECTION AGENCY, 2009).

As cepas de *E. coli* associadas às infecções intestinais são denominadas *E. coli* diarreiogênicas (DEC). Os sintomas e a gravidade da infecção estão relacionados às estratégias de virulência da cepa e à vulnerabilidade do hospedeiro. Dessa forma, as cepas de

*E. coli* DEC são divididas em seis categorias: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* de aderência difusa (DAEC) e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (PERESI et al., 2016).

Atualmente nos estudos envolvendo susceptibilidade de *E. coli* a antimicrobianos, tem-se constatado resistência a pelo menos duas classes do medicamento. Um dos fatores de risco envolvido na propagação de bactérias resistentes e genes de resistência é a pressão antibiótica seletiva que se dá pelo uso excessivo e frequente de antimicrobianos na medicina humana, veterinária e na agricultura. Em função disso, as opções terapêuticas disponíveis tornam-se limitadas. A propagação dos genes de resistência pode ocorrer pela cadeia alimentar, e uma vez no trato gastrointestinal do homem, os genes podem ser transferidos para microrganismos patogênicos ou comensais pertencentes à microbiota bacteriana do hospedeiro, como *E. coli* (VON BAUM & MARRE, 2005).

Baseados nessas primícias, idealizou-se o presente estudo que teve como objetivo avaliar a qualidade higiênico-sanitária de alimentos prontos para o consumo, investigando a ocorrência de *Escherichia coli*, patogenicidade e a resistência a antimicrobianos.

O presente estudo está dividido em dois capítulos. O primeiro é composto pela revisão de literatura com abordagem dos temas relacionados à ocorrência de *Escherichia coli* em alimentos prontos para o consumo e sua patogenicidade em humanos. Obedece ao disposto na Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) para redação de Dissertação.

O segundo capítulo, em forma de artigo, apresenta os resultados da pesquisa, as discussões em torno do tema e as conclusões do estudo realizado. Obedece as normas de formatação para submissão de artigos ao periódico *Food Control*.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

Determinar a ocorrência de *Escherichia coli* em alimentos prontos para o consumo comercializados em Salvador, BA, e municípios vizinhos, a patogenicidade e a susceptibilidade a antimicrobianos dos isolados.

### **Objetivos específicos**

Detectar e identificar cepas de *Escherichia coli* em amostras de alimentos prontos para o consumo, comercializados em restaurantes comerciais, institucionais e na rede hoteleira;

Identificar os sorogrupos dos isolados de *Escherichia coli*;

Detectar genes associados aos fatores de virulência dos isolados de *Escherichia coli*;

Determinar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de interesse médico e multirresistênica dos isolados de *Escherichia coli*;

Pesquisar a presença de plasmídeos-R nos isolados de *Escherichia coli* resistentes a antimicrobianos;

Verificar a ocorrência de associação entre a contaminação dos alimentos por *Escherichia coli* e o local de comercialização dos alimentos.

## CAPÍTULO I

### REVISÃO DE LITERATURA

#### 1 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* é normalmente encontrada no trato gastrintestinal de humanos e animais de sangue quente, sendo geralmente comensal e não oferecendo risco à saúde de seu hospedeiro. Bioquimicamente, as cepas são Gram negativas, anaeróbias facultativas, oxidase negativa e não esporogênicas (LUCATELLI, 2012). Pertencem à família Enterobacteriaceae, juntamente com outras bactérias entéricas Gram negativas, e compõem o grupo dos coliformes termotolerantes, sendo distinguidas por suas características de crescimento no meio de cultura Eosina Azul de Metileno de Levine (L-EMB) e pelo perfil apresentado nos testes de indol, vermelho de metila, Voges Proskauer e citrato (SILVA et al., 2010).

Diferentemente de outras bactérias residentes do trato gastrintestinal, *E. coli* é facilmente detectada pela sua capacidade de fermentar a lactose, por este motivo, é normalmente utilizada como indicadora de qualidade higiênico-sanitária de alimentos. A sua presença pode estar relacionada à contaminação fecal recente, falhas na manipulação de alimentos e presença de outras bactérias patogênicas (FDA, 2011).

*E. coli* possui antígenos somáticos O, relacionados à polissacarídeos na membrana externa, antígenos flagelares H, relacionados à proteínas dos flagelos e antígenos K, relacionados à polissacarídeos capsulares. Os grupos e os tipos sorológicos compreendem um grande número entre as cepas de *E. coli*, identificados por meio de anti-soros preparados com a variedade dos antígenos (O, H e K), considerando que a combinação dos antígenos é variada e nem sempre ocorrem os três tipos simultaneamente (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Embora a maioria dos isolados de *E. coli* não seja patogênica, determinadas cepas são responsáveis por três tipos de doenças em humanos: meningite neonatal, infecções crônicas do sistema urinário e gastroenterites (BEAUCHAMP & SOFOS, 2010). Acredita-se que ao longo do tempo, algumas cepas adquiriram diferentes combinações de genes, tornando-se capazes de promover uma ampla variedade de enfermidades em humanos. Além

disso, mutações no material genético podem levar à aquisição de novos fenótipos de *E. coli* e promover vantagens, como a patogenicidade (KAPER, 2004).

Outra forma de aquisição de material genético ocorre através da transferência de genes de virulência entre bactérias, denominada conjugação (troca de genes através de estruturas móveis contendo DNA extra-cromossômico, denominadas plasmídeos); transformação (resgate de DNA livre no meio ambiente); e transdução ou conversão lisogênica (transferência de genes oriundos de bacteriófagos). Os genes de virulência normalmente estão situados em segmentos de DNA que apresentam propriedades diferenciadas do genoma bacteriano e grande instabilidade, as denominadas ilhas de patogenicidade (PAI). Essas ilhas codificam diversos fatores de virulência, como as invasivas, adesinas e toxinas, e os componentes responsáveis por possibilitarem a ação desses fatores. Todo esse processo determina as estratégias de virulência da *E. coli* (VIEIRA, 2009).

### **1.1 *Escherichia coli* diarreio gênicas**

O grupo de *E. coli* patogênica responsável por causar gastroenterites em humanos é também conhecido como diarreio gênico. Os sintomas mais comuns associados à infecção são diarreia, dor abdominal e cólica. Em determinados casos, é possível identificar febre, cefaléia, náuseas e vômitos. A incidência da enfermidade é maior em indivíduos imunocomprometidos ou com sistema imunológico imaturo (crianças). Em adultos saudáveis a doença é rara, exceto para aqueles que viajam para países em desenvolvimento (BEAUCHAMP & SOFOS, 2010).

Assim como outros microrganismos patogênicos, o processo de infecção por *E. coli* diarreio gênica no hospedeiro consiste na colonização do sítio na mucosa intestinal e multiplicação, e, por fim, ocasiona os danos. O local de adesão e mecanismo de fixação dependerá do subgrupo da *E. coli* (KAPER, 2004).

Os subgrupos são classificados conforme os seus fatores de virulência específicos: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC). Entre estas, os primeiros quatro subgrupos estão relacionados com a ocorrência de doenças veiculadas por alimentos, sendo a EHEC a mais comumente envolvida em surtos de toxinfecções alimentares (FDA, 2011; DUTTA et al., 2015).

*E. coli* está entre os agentes patogênicos mais associados à ocorrência de doenças veiculadas por alimentos que afetam milhões de pessoas no mundo, por vezes com resultados graves e fatais (WHO, 2015).

### **1.1.1 *Escherichia coli* enterotoxigênica**

*Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) é responsável por gastroenterites em humanos, principalmente em crianças de países em desenvolvimento. Os surtos envolvendo ETEC são relacionados ao consumo de alimentos contaminados por manipuladores infectados ou pelo uso de água contaminada (BARBOSA et al., 2016). Trata-se de um dos potenciais agentes patogênicos responsáveis por 380 mil casos de morte no mundo, por ano, a grande maioria crianças de países em desenvolvimento (FDA, 2012).

Todavia, existem relatos (esporádicos) de surtos ocorridos nos Estados Unidos relacionados ao consumo de água, queijos e vegetais crus contaminados (FDA, 2011). Estima-se que a dose infectante para adultos saudáveis seja de, pelo menos,  $10^8$  células. Entretanto, crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos são susceptíveis a uma população menor do microrganismo. A contaminação ocorre durante a manipulação do alimento por um indivíduo portador da doença ou através do uso de água contaminada durante a preparação do alimento (FDA, 2012).

Em estudo realizado com fezes de crianças hospitalizadas com diarreia aguda, na China, identificou-se uma prevalência de 14,1% (n=347) de *E. coli* diarreiogênica, destas, 62 (17,9%) eram ETEC (CHEN et al., 2014). Ainda, em uma pesquisa feita por Cerna-Cortes et al. (2013) com feijão comercializado em mercados públicos do México, cepas ETEC foram encontradas em duas amostras (2%), enquanto que STEC foi isolada em 6% (n=6) das amostras.

A patogenicidade da ETEC é desencadeada pela produção de adesinas fimbriais, mediadas por plasmídeos, enterotoxinas e diversos antígenos que facilitam a colonização. As adesinas facilitam a adesão do microrganismo à receptores específicos das células epiteliais jejunal e ileal, e a colonização. As enterotoxinas, conhecidas como termolábil (LT) e termoestável (ST), estimulam a perda de água e eletrólitos para o lúmen intestinal, resultando nos sintomas da infecção, diarreia aquosa, desidratação, podendo ou não apresentar febre (DUTTA et al., 2015). Diferentes cepas podem secretar apenas a enterotoxina termolábil ou a

termoestável, ou ambas, no entanto, os sintomas causados por cada toxina são bastante semelhantes (CDC, 2014).

Existem relatos indicando que os genes que codificam a enterotoxina termolábil (LT) estão presentes em plasmídeos auto-transmissíveis, justificando o aparecimento de cepas de *E. coli* não ETEC, apresentando genes adquiridos de elementos móveis ou bacteriófagos, que codificam a enterotoxina (DUTTA et al., 2015).

A gastroenterite causada pela ETEC é geralmente leve e breve, e ocorre 26 horas após a ingestão do alimento contaminado, podendo variar de 8 a 44 horas. Nos casos mais graves, a duração da enfermidade pode ser estendida por até 19 dias, com mais de cinco dejeções diárias, desidratação severa, cólicas abdominais, febrícula, náuseas e mal estar (FDA, 2012).

O tratamento da doença tem como objetivo a recuperação de líquidos e eletrólitos perdidos e redução do número de evacuações. Os agentes antimicrobianos normalmente não são prescritos, pois muitas cepas ETEC têm se mostrado resistentes aos medicamentos comumente administrados, como trimetoprim/sulfametoxazol e ampicilina. Quando os agentes são prescritos, normalmente fluoroquinolonas, considera-se a gravidade da doença e o risco de reações adversas (CDC, 2014).

### **1.1.2 *Escherichia coli* enteropatogênica**

*Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) foi o primeiro patótipo do grupo de *E. coli* descrito e é considerada um potencial patógeno de origem alimentar, tido como principal causa de diarreia infantil nos Estados Unidos, no período de 1940 a 1950 (FDA, 2012). Atualmente, infecções com EPEC são menos frequentes nos países desenvolvidos, porém, nos países em desenvolvimento, apresentam significativa morbi-mortalidade em crianças menores de dois anos de idade (NEWELL et al., 2010).

Estima-se que a dose infectante da cepa bacteriana seja em torno de  $10^6$  células para adultos saudáveis. Normalmente é encontrada em produtos cárneos (bovino e ave) e água (NEWELL et al., 2010). Em pesquisa feita com alimentos prontos para consumo comercializados na China, Zhang et al. (2016) isolaram 39 (8,5%) EPEC de 459 amostras, destas 13,2% (n=19) pertenciam ao grupo das preparações à base de carne e 18,6% (n=11) ao grupo de saladas cruas. Gómez-Aldapa et al. (2013) encontraram em seu estudo com tomates

comercializados no México, 21% de isolados de *E. coli* diarreiogênicos, destes 5% eram EPEC. Outro estudo com bebidas a base de beterraba comercializadas também no México, 3% (n=3) dos isolados de *E. coli* foram identificados como EPEC (GÓMEZ-ALDAPA et al., 2014).

Após a ingestão do alimento contaminado, a EPEC se adere à mucosa intestinal, alterando a fisiologia da digestão, na relação enzimas-absorção, resultando na má absorção dos nutrientes e no aparecimento dos sintomas. Normalmente após quatro horas da ingestão do alimento contaminado, instala-se o quadro de diarreia leve, vômito e febre baixa por um período de 12 a 120 dias. A diarreia causada pela EPEC é clinicamente mais grave em relação às demais *E. coli* diarreiogênicas (FDA, 2012).

O principal fator de virulência da EPEC é a sua capacidade de causar lesões do tipo *attaching and effacing* (A/E) nos enterócitos. Esse tipo de lesão é caracterizado pela íntima aderência da *E. coli* à célula, destruição das microvilosidades e formação de pedestais nos enterócitos do hospedeiro. Os genes responsáveis por esse tipo de lesão estão localizados em ilhas de patogenicidade denominada *locus of enterocyte effacement* (LEE), onde está localizado o gene *eae*, responsável por codificar a proteína adesina, intimina. Essa proteína se ligará a outra proteína, a Tir, secretada pela própria bactéria, que servirá de receptor para a intimina na célula hospedeira. A interação Tir-intimina desencadeia a degeneração das microvilosidades intestinais, iniciando os processos de sinalização celular e reorganização dos componentes do citoesqueleto para formar o pedestal que firmará a adesão de EPEC à superfície celular (BEAUCHAMP & SOFOS, 2010; VIEIRA, 2009).

O processo diarréico se inicia após o aumento dos íons cálcio intracelulares e ativação da proteína cinase C, responsável pela fosforilação das proteínas que compõem os canais de cloreto, resultando em perda de Cl<sup>-</sup> e água para a luz intestinal. Simultaneamente ocorre o bloqueio da absorção de NaCl para o interior dos enterócitos (HIRSH, 2012).

### **1.1.3 *Escherichia coli* enterohemorrágica**

A maior parte dos relatos sobre infecções de origem alimentar envolvendo *E. coli* está relacionada à *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), subgrupo de *E. coli* produtora da toxina Shiga (STEC). Devido à elevada incidência de mortes entre crianças e idosos, a ocorrência de EHEC em alimentos possui alta importância para a saúde pública. Estima-se



que a infecção pelo microrganismo é a causa de 70% dos casos de insuficiência renal aguda em crianças (HEALTH PROTECTION AGENCY, 2009).

Os primeiros surtos foram relacionados à ingestão de carne bovina crua ou mal cozida. Atualmente, existem registros também de surtos envolvendo vegetais crus, brotos, frutas, produtos derivados de carne (salames), suco de maçã não pasteurizado, leite cru e água de consumo ou recreativas. Esse aumento da variedade de alimentos envolvidos em surtos mostra a versatilidade da população bacteriana de *E. coli* na cadeia alimentar (NEWELL et al., 2010; WHO, 2011). Além disso, um pequeno número de células viáveis de EHEC é suficiente para a infecção, a dose infectante é estimada em 10 a 10<sup>2</sup> células e para os outros sorotipos não há muita informação a respeito da dose, no entanto, suspeita-se de que seja um valor um pouco maior (HEALTH PROTECTION AGENCY, 2009; FDA, 2012).

Estudos genéticos mostraram a presença de *locus of enterocyte effacement* (LEE) e, assim como a EPEC, a EHEC causa lesões do tipo A/E nas células hospedeiras e produz a citotoxina Shiga (*stx*), também conhecida como verotoxina e classificada como *stx1* e *stx2*. Esta última é comumente relacionada a enfermidades em humanos; causa enterocolite, em alguns casos sanguinolenta, podendo evoluir para síndrome urêmica hemolítica (SHU). Essa síndrome resulta da destruição das células vermelhas do sangue e envolve um conjunto de sintomas: anemia hemolítica, trombocitopenia e insuficiência renal, podendo ser fatal em alguns casos. (VIEIRA, 2009; FDA, 2012).

Os sintomas se iniciam geralmente após 3 a 4 dias (podendo variar de um a nove dias) da exposição ao patógeno. Os sintomas agudos são descritos como colite hemorrágica (CH) associada a cólicas abdominais severas e diarreia sanguinolenta, e podem evoluir para SHU ou a síndrome púrpura trombocitopênia trombótica (TTP). Em torno de 3% a 7% dos casos de colite hemorrágica evoluem para SHU ou TTP (FDA, 2012). Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2011a), 10% dos pacientes infectados com EHEC podem desenvolver SHU, principalmente crianças e idosos. A taxa de mortalidade varia entre 3 e 5%, e cerca de 50% dos sobreviventes apresentam sequelas renais e 25% complicações neurológicas.

Dentre os mais de 50 sorotipos de EHEC, a *E. coli* O157:H7 é o sorotipo mais associado a doenças em todo o mundo, em torno de 75% dos casos, e a melhor caracterizada, devido a facilidade de diferenciá-la bioquimicamente. Atualmente, os sorotipos denominados não-O157:H7 estão emergindo como causa de DVA, destacando-se O26, O103, O111 e O145 (NEWELL et al., 2010; FDA, 2012). A transmissão do sorotipo se dá principalmente através

do consumo de alimentos contaminados, como carne moída crua ou mal cozida, hambúrgueres, salame curado, leite cru, iogurte, queijo que já estiveram envolvidos em surtos com *E. coli* O157:H7 (WHO, 2011a).

Os surtos envolvendo *E. coli* são acompanhados pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC) e é possível verificar que a grande maioria dos registros envolvem EHEC (CDC, 2016). Em 2016, nos Estados Unidos, 11 pessoas foram infectadas com *E. coli* O157 após consumirem brotos de alfafa. Em 2015, sete estados da região oeste dos Estados Unidos foram envolvidos em surto com 19 pessoas infectadas, destas duas desenvolveram SHU, sem mortes. Segundo evidências epidemiológicas, uma salada de frango assado comercializada foi a provável causa da DVA, não sendo possível identificar, dentre os ingredientes, a fonte de contaminação. No mesmo ano e país, 55 pessoas foram infectadas com EHEC O026, resultando em 22 hospitalizações. Após as investigações, não foi possível identificar o alimento ou ingrediente ligado à doença, porém concluiu-se que se tratava de um alimento produzido por uma rede de restaurantes mexicanos. Em 2014, 12 indivíduos, com idade média de 25 anos, foram infectados por EHEC O157:H7 nos Estados Unidos, dentre eles, sete (58%) foram hospitalizados. A carne moída sob forma de hambúrguer foi apontada como provável causa do surto (CDC, 2016).

Nota-se que os surtos vem sendo notificados com uma certa frequência, assim, em 2006 foi relatado um surto de *E. coli* O157:H7 envolvendo o consumo de espinafre fresco e embalado, em 26 estados dos Estados Unidos da América e Canadá, o que resultou em 205 casos de infecção e três óbitos (NEWELL et al., 2010).

O tratamento da infecção por EHEC envolve principalmente hidratação para reposição de líquidos e eletrólitos perdidos. O uso de antimicrobianos não é indicado pelo risco de aumentar as chances de se desenvolver SHU (WHO, 2011a).

#### **1.1.4 *Escherichia coli* enteroinvasora**

Atualmente pouco se conhece sobre os reservatórios de *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC), com isso, considera-se, como fonte primária, o humano infectado. A dose infecciosa é de, pelo menos,  $10^6$  células para causar doenças em adultos saudáveis, que ocorre após o microorganismo invadir e destruir o tecido intestinal. Suas características

bioquímicas são diferentes das cepas de *E. coli* típicas, não são móveis, não descarboxilizam a lisina, não fermentam a lactose e são anaeróbias (FDA, 2011).

O mecanismo pelo qual EIEC adere às células hospedeiras ainda não é totalmente entendido, no entanto, sua patogenicidade se dá, principalmente pela habilidade de invadir e destruir o tecido intestinal (FDA, 2011). Por enquanto, sabe-se que a invasão do enterócito ocorre através de vacúolos de endocitose que, uma vez situado no interior da célula, sofre lise e a bactéria se multiplica, invade células vizinhas e produz enterotoxinas que causam a diarreia aquosa. A informação genética necessária para a patogenicidade do microrganismo é encontrada em plasmídeos (FDA, 2012).

A doença normalmente é auto-limitada, sem maiores complicações. Os sintomas aparecem dentro de 12 a 72 horas após a ingestão do alimento contaminado e são: diarreia, cólicas abdominais, vômitos, febre, calafrio e mal-estar generalizado, podendo haver sangue e muco nas fezes. Normalmente o quadro infeccioso finda dentro de cinco a sete dias (FDA, 2012).

## **1.2 *Escherichia coli* e a resistência a antimicrobianos**

Os agentes antimicrobianos são utilizados há mais de 60 anos na prevenção e controle de doenças bacterianas. Em contrapartida, o aparecimento de bactérias resistentes às drogas vem sendo relatado nas últimas décadas em todo o mundo. O desenvolvimento da resistência é um processo evolutivo normal para os microrganismos e também pode ser acelerado pela pressão seletiva exercida pelo uso generalizado dos antimicrobianos (NEWELL et al., 2010; SOUFI et al., 2011). A ocorrência de *E. coli* resistente atinge os diversos setores da cadeia alimentar (vegetais, animais e homem), prejudica os avanços da medicina e é encarada como um problema de saúde pública a nível mundial (WHO, 2004).

O uso dos antimicrobianos difundiu-se no mundo ao longo de décadas, nas medicinas humana e veterinária, e na agricultura. Conseqüentemente, houve a seleção e a propagação de bactérias resistentes, principalmente nas regiões onde não existe o controle efetivo das infecções (WHO, 2014). Na produção animal, o uso de antimicrobianos possui três finalidades: terapêutica, para o tratamento de animais com sintomas clínicos e os demais animais sadios de confinamento, profilática, para a prevenção de infecções, e promotor do crescimento, para o aumento da absorção dos nutrientes e, conseqüentemente, o ganho

ponderal do animal (WEGENER, 2003). Na agricultura, o uso é cada vez mais comum devido ao seu efeito no aumento da produtividade. Estima-se que metade dos antimicrobianos disponíveis no mundo é utilizada na agricultura e na criação de gado (STOHR, 2000). Segundo informações de Stohr (2000), para cada 1 Kg de carne produzido para o consumo humano na Europa, são utilizados 100 mg de antimicrobianos na pecuária.

Pesquisadores afirmam que o uso contínuo de drogas faz dos produtos cárneos reservatórios de bactérias resistentes aos antimicrobianos, podendo ser propagado a outros animais e ao homem através da ingestão e manipulação desses alimentos, ou por propagação ambiental, a exemplo do uso de água contaminada para consumo e irrigação. (NEWELL et al., 2010; WHO, 2011; RYU. et al., 2012;).

Estudos mostram que em países do continente europeu, como Dinamarca, onde foi suspenso o uso dos agentes antimicrobianos como promotores de crescimento, não ocorre interferência na produtividade e, sobretudo, leva à redução da prevalência das bactérias resistentes nos animais e alimentos (WEGENER, 2003). Diante desse panorama, é recomendado pela Organização Mundial de Saúde que o uso profilático dos antimicrobianos nunca substitua a boa gestão da saúde animal, ou seja, seu uso somente é justificado nos casos de presença confirmada ou suspeita de uma determinada doença detectada por um profissional habilitado (STOHR, 2000).

Na medicina humana, o uso inapropriado dos antimicrobianos pode resultar na proliferação de bactérias resistentes, trazendo repercussões potenciais. A auto-medicação, a prescrição inapropriada e o uso inadequado de drogas são os principais motivos para a prevalência dos microrganismos resistentes (WANNMACHER, 2004). As consequências da disseminação de microrganismos resistentes são bastante preocupantes principalmente quando patógenos como *E. coli* se tornam resistentes a antimicrobianos comumente utilizados na medicina humana, impactando negativamente no tratamento de enfermidades que acometem ao homem (WHO, 2004). Atualmente, não existe um único medicamento eficaz contra todas as bactérias patogênicas e a descoberta de novas classes de antimicrobianos de amplo espectro tem sido bastante lenta. O mais preocupante, por outro lado, é o crescente número de patógenos que adquiriram diversos mecanismos de defesa (FILUTOWICZ et al., 2008).

As bactérias desenvolvem resistência principalmente pela transferência horizontal de genes oriundos de outros microrganismos. Esse mecanismo é descrito como um rápido processo de adaptação de populações bacterianas sob forte pressão seletiva exercida pela presença de agentes antimicrobianos (CRUZ & DAVIES, 2000). Estudos comprovam a

habilidade da *E. coli* em trocar material genético com outras espécies bacterianas, inclusive transferir genes de resistência à patógenos presentes no trato gastrointestinal humano (ALEXANDER et al., 2010). A troca de material genético pode, inclusive, ocorrer entre patógenos e microrganismos comensais, conferindo a estes vantagem seletiva em relação ao hospedeiro e resistência a mais de uma classe de antimicrobiano. A facilidade e rapidez com que ocorre esse processo preocupa devido à gravidade (ANDREOTTI & NICODEMO, 2004; WHO, 2011; RYU et al., 2012).

Os mecanismos pelos quais ocorrem a transferência dos genes são transdução, transformação e conjugação. Esse último é considerado o principal processo de disseminação de genes de resistência entre os diferentes gêneros e espécies de bactérias, e é comumente associado à presença de plasmídeos designados ao transporte dos genes (CRUZ & DAVIES, 2000). A conjugação corresponde à junção de duas células bacterianas, uma doadora do material genético e outra receptora. A célula doadora possui um plasmídeo F (fator F), que carrega os genes das proteínas necessárias à conjugação, dentre elas, a pilina que forma o pilus sexual (tubo de conjugação). O acasalamento é iniciado quando o pilus se liga ao receptor da superfície da outra célula, que não contém o fator F (F<sup>-</sup>), em seguida, o DNA do fator F sofre uma clivagem enzimática, e uma fita é transferida à célula receptora através da ponte de conjugação. O processo é finalizado pela síntese da fita complementar, originando um plasmídeo de fita dupla com o fator F, dessa forma, a célula receptora se torna F<sup>+</sup>, capaz de transmitir o plasmídeo (WARREN, 2010).

A resistência de *E. coli* a antimicrobianos foi observada por Jiang et al. (2014) na China, com isolados obtidos de carnes prontas para o consumo. Os autores demonstraram que 90,7% das cepas isoladas apresentaram resistência a, pelo menos, um agente antimicrobiano testado, dentre eles, tetraciclina e trimetoprim com 56% e 41,3%, respectivamente. Abakpa et al. (2015) identificaram, entre amostras de vegetais crus e água utilizada para irrigação, 32 isolados de *E. coli* O157:H7, todos resistentes à cefalotina e 75% à tetraciclina. Nesse mesmo estudo, um total de 93,8% apresentaram multirresistência (resistência a dois ou mais antimicrobianos), sendo que 10% eram de amostras de vegetais, apresentando resistência a cinco antimicrobianos.

Ainda, estudos conduzidos por Ryu et al. (2012) identificaram que dentre amostras de peixe, moluscos e crustáceos, 30,7% dos isolados de *E. coli* foram resistentes à tetraciclina, 12,8% à estreptomicina, 11,7% à cefalotina, 6,7% à ampicilina, 6,7% à trimetoprim/sulfametoxazol, 5,6% ao ácido nalidíxico e 5,0% à canamicina. Soufi et al.

(2011) encontraram 90% dos isolados de *E. coli* obtidos de amostras de aves resistentes a, pelo menos, três agentes antimicrobianos de diferentes classes e porcentagens bastante elevadas (66 a 95%) para resistência a ampicilina, estreptomicina, ácido nalidíxico, sulfonamidas e tetraciclina.

A infecção por *E. coli* resistente a antimicrobianos requer tratamento médico mais complexo e prolongado, gerando maiores gastos, tempo de internação, sequelas e mortalidade. A vigilância da resistência antimicrobiana, realizada por diversos órgãos de saúde, incluindo a Organização Mundial de Saúde, é fundamental para alertar sobre os diversos mecanismos de resistência emergentes e orientar o tratamento. Diante dos constantes relatos do aparecimento de *E. coli* resistentes e multirresistentes aos antimicrobianos é necessário assegurar que os pacientes sejam informados sobre a necessidade de tomar a dose correta do antimicrobiano, com a devida intervenção de prescritores, farmacêuticos e distribuidores, indústria farmacêutica, o público e os doentes, bem como os decisores políticos (WHO, 2015)

### **1.3 *Escherichia coli* como agente causador de doenças veiculadas por alimentos e ações da vigilância sanitária e epidemiológica**

As doenças veiculadas por alimentos vem aumentando de modo significativo em todo o mundo. O crescente aumento das populações, a produção de alimentos em grande escala e a existência de grupos populacionais vulneráveis contribuem para esse aumento. Além disso, a maior procura por alimentos prontos para o consumo em restaurantes, lanchonetes, refeitórios e vias públicas, as mudanças ambientais e a globalização também são determinantes para uma maior incidência das DVA (BRASIL, 2010).

O tipo, a gravidade e os impactos dessas doenças vem mudando através dos tempos e se diversificando para cada região, país e comunidade (WHO, 2015). No Brasil, nos últimos 15 anos foram registrados 11.241 surtos, destes, 40,2% foram na região sudeste e 14,8% no nordeste, e um total de 158 óbitos. Nesse mesmo período, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* e *E. coli* foram os agentes etiológicos que se destacaram como responsáveis pelos casos, com incidência de 14,3%, 7,6% e 6,4%, respectivamente (BRASIL, 2016). Nos Estados Unidos, foram contabilizados, somente em 2011, 47,8 milhões casos de doenças veiculadas por alimentos, destas, apenas 20% tiveram o agente causador identificado (CDC, 2014).

A presença de *E. coli* em alimentos fornece informações sobre as condições higiênicas de preparo, armazenamento e distribuição/comercialização, e indicação da eventual presença de enteropatógenos. Em alimentos frescos (a base de vegetais), a ocorrência de *E. coli* pode ser proveniente de contaminação durante a irrigação, ausência ou falha da higienização do alimento, manipulação inadequada, enquanto que quando presente em alimentos de origem animal, pode indicar falhas na higiene e/ou armazenamento inadequado (FDA, 2011).

*E coli* nos alimentos também está relacionada à falhas no controle do binômio tempo-temperatura, por não resistir aos processos de cocção e, conseqüentemente, a sua sobrevivência indica falha no atendimento às Boas Práticas de Fabricação (BPF). A contaminação de alimentos prontos para o consumo por *E. coli* pode ter como origem o uso de matéria-prima contaminada ou condições insatisfatórias de higiene do ambiente de preparo dos alimentos. Além disso, durante o preparo pode ocorrer a contaminação cruzada, permitindo a proliferação bacteriana no alimento (JIANG et al., 2014). Nesse contexto, a adequada manipulação dos alimentos requer especial atenção e o atendimento dos requisitos mínimos das Boas Práticas, a fim de evitar e controlar a contaminação bacteriana (RYU et al., 2012; JIANG et al., 2014). As medidas preventivas para evitar a contaminação por *E. coli* são básicas para as doenças de origem alimentar: adoção das boas práticas de manipulação dos alimentos, principalmente durante a cocção e a higienização dos vegetais (WHO, 2011a).

Em resposta às doenças de origem alimentar, melhorias na segurança microbiológica dos alimentos tem sido, em grande parte, impulsionadas pelo setor público de diversos países. Essas melhorias foram implementadas com o auxílio de padrões e legislações nacionais e internacionais, e apresentaram um impacto sobre a incidência de doenças veiculadas por alimentos (NEWELL et al., 2010). No Brasil, o Ministério da Saúde, através da Vigilância Sanitária, atua na supervisão dos serviços de alimentação do país, buscando o atendimento das Resoluções RDC nº 216 de 15 de setembro de 2004, que traz o regulamento técnico de Boas Práticas de Fabricação para serviços de alimentação, e RDC nº 275 de 21 de outubro de 2002, que dispõe sobre o regulamento técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados e apresenta uma lista de verificação das Boas Práticas de Fabricação dos estabelecimentos produtores e industrializadores de alimentos (BRASIL, 2002; BRASIL, 2004).

A nível mundial, a Organização Mundial de Saúde (OMS) atua no compartilhamento de informações a respeito de surtos ocorridos no mundo e colabora com autoridades de saúde dos países prestando assistência técnica e fornecendo material de apoio para treinamentos

direcionados a diferentes públicos-alvo (WHO, 2011a). Em paralelo, o *Codex Alimentarius* estabelece normas alimentares juntamente com a *Food and Agriculture Organization (FAO)/OMS*, com o intuito de proteger a saúde dos consumidores e garantir práticas equitativas no comércio de alimentos entre os países (OPAS, 2006).

A coleta de dados pela vigilância sanitária epidemiológica é fundamental para observar as alterações dos níveis de doenças de origem alimentar. No entanto, poucos são os países no mundo que recolhem os dados sobre as doenças infecciosas de origem alimentar e menos ainda dispõem de dados consistentes e comparativos dos últimos 20 anos ou mais, apresentando as tendências (NEWELL et al., 2010). No Brasil, o Sistema de Informação Hospitalar Descentralizado (SIHD) armazena dados sobre as internações hospitalares ocorridas no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) e disponibiliza aos gestores estaduais e municipais. A partir das informações obtidas, é possível conhecer o perfil de morbimortalidade hospitalar, direcionar adequadamente as ações de prevenção e promoção da saúde para uma determinada população e avaliação da qualidade da atenção à saúde ofertada a uma população (BRASIL, 2016).

Apesar de todos os esforços de cientistas, governos e indústrias, o panorama atual indica que as doenças veiculadas por alimentos continuarão como um grande problema de saúde pública mundial, com enormes implicações tanto para o bem-estar social das populações como para as economias nacionais (NEWELL et al., 2010).



## REFERÊNCIAS

ABAKPA, G. O.; UMOH, V. J.; AMEH, J. B.; YAKUBU, S. E.; IBEKWE, A. M. Prevalence and antimicrobial susceptibility of pathogenic *Escherichia coli* O157 in fresh produce obtained from irrigated fields. **Environmental Technology & Innovation**, n. 4, p.1-7, 2015.

ALEXANDER, T. W.; INGLIS, G. D.; YANKE, L. J.; TOPP, E.; READ, R. R.; REUTER, T.; MCALLISTER, T. A. Farm-to-fork characterization of *Escherichia coli* associated with feedlot cattle with a known history of antimicrobial use. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, p. 40-48, 2010.

ANDREOTTI, R.; NICODEMO, M. L. F. **Uso de antimicrobianos na produção de bovinos e desenvolvimento de resistência**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2004. 50p.

BARBOSA, L. J.; RIBEIRO, L. F.; LAVEZZO, L. F.; BARBOSA, M. M. C.; ROSSI, G. A. M.; AMARAL, L. A. Detection of pathogenic *Escherichia coli* and microbiological quality of chilled shrimp sold in street markets. **Letters in Applied Microbiology**, v. 62, p. 372-378, 2016.

BEAUCHAMP, C. S.; SOFOS, J. N. Diarrheagenic *Escherichia coli*. In: \_\_\_\_\_. **Pathogens and toxins in foods: challenges and interventions**. ASM Press: Washington, 2010. cap. 5.

BRASIL. **Doenças Transmitidas por Alimentos**, 2016. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/marco/10/Apresenta----o-dados-gerais-DTA-2016.pdf>>. Acesso em 17 mar. 2016.

BRASIL. **Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010. 158p.

BRASIL. Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 set. 2004.

BRASIL. Resolução RDC nº 275, de 21 de outubro de 2002. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 out. 2003. Seção 1, p. 126.

BRASIL. **Sistema de Informação Hospitalar Descentralizado**. Institucional, 2016. Disponível em: <<http://www2.datasus.gov.br/SIHD/institucional>>. Acesso em 10 mar. 2016.

CDC. **Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)**, 2014. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ecoli/etec.html>>. Acesso em 10 mar. 2016.

CDC. **Reports of Selected *E. coli* outbreak investigations**, 2016. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ecoli/outbreaks.html>>. Acesso em: 31 mar. 2016.

CERNA-CORTES, J. F.; GÓMEZ-ALDAPA, C. A.; RANGEL-VARGAS, E.; RAMÍREZ-CRUZ, E.; CASTRO-ROSAS, J. Presence of indicator bacteria, *Salmonella* and diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes on mung bean sprout from public markets in Pachuca, Mexico. **Food Control**, v. 31, p. 280-283, 2013.

CHEN, Y.; CHEN, X.; ZHENG, S.; YU, F.; KONG, H.; YANG, Q.; CUI, D.; CHEN, N.; LOU, B.; LI, X.; TIAN, L.; YANG, X.; XIE, G.; DONG, Y.; QIN, Z.; HAN, D.; WANG, Y.; ZHANG, W.; TANG, Y. W.; LI, L. Serotypes, genotypes and antimicrobial resistance patterns of human diarrheagenic *Escherichia coli* isolates circulating in southeastern China. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, p. 52-58, 2014.

CRUZ, F. L.; DAVIES, J. Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. **Trends in Microbiology**, v. 8, p. 128 - 133, mar., 2000.

DUTTA, S.; PAZHANI, G. P.; NATARO, J. P.; RAMAMURTHY, T. Heterogenic virulence in a diarrheagenic *Escherichia coli*: evidence for an EPEC expressing heat-labile toxin of ETEC. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 305, n. 1, p. 47-54, 2015.

FDA. **BAM: Diarrheagenic *Escherichia coli***, 2011. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070080.htm>> Acesso em: 20 fev. 2016.

FDA. **Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook**, 2012. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/CausesOfIllnessBadBugBook/>>. Acesso em: 10 mar. 2016.

FILUTOWICZ, M.; BURGESS, R.; GAMELLI, R. L.; HEINEMANN, J. A.; KURENBACH, B.; RAKOWSKI, S. A.; SHANKAR, R. Bacterial conjugation-based antimicrobial agents. **Plasmid**, v. 60, p. 38-44, 2008.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microrganismos patogênicos de importância em alimentos. In: FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996, p. 33-81.

GÓMEZ-ALDAPA, C. A.; RANGEL-VARGAS, E.; BAUTISTA-DE LEON, H.; CASTRO-ROSAS, J. Presence of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli*, enterotoxigenic *E. coli*, enteropathogenic *E. coli* and *Salmonella* in fresh beetroot (*Beta vulgaris L.*) juice from public markets in Mexico. **Journal of Science Food and Agriculture**. v. 94, p. 2705-2711, 2014.

GÓMEZ-ALDAPA, C. A.; TORRES-VITELA, M. R.; ACEVEDO-SANDOVAL, O. A.; RANGEL-VARGAS, E.; VILLARRUEL-LÓPEZ, A.; CASTRO-ROSAS, A. Presence of shiga toxin-producing *Escherichia coli*, enteroinvasive *E. coli*, enteropathogenic *E. coli*, and enterotoxigenic *E. coli* on tomatoes from public markets in Mexico. **Journal of Food Protection**. n. 9, p. 1621-1625, set. 2013.

HEALTH PROTECTION AGENCY. **Guidelines for assessing the microbiological safety of ready-to-eat foods**. Londres: Health Protection Agency, 2009. 33p.

HIRSH, D. C. *Escherichia*. In: HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. p.63-68.

JIANG, X.; YU, T.; WU, N.; MENG, H.; SHI, L. Detection of *qnr*, *aac* (6')-*Ib-cr* and *qepA* genes in *Escherichia coli* isolated from cooked meat products in Henan, China. **International Journal of Food Microbiology**, n. 187, p. 22-25, 2014.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature**, v. 2, p. 123-140, 2004.

LUCATELLI, A. ***Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga em carne moída comercializada na cidade de São Paulo, SP**. 2012. 56p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2012.

NEWELL, D. G.; KOOPMANS, M.; VERHOEF, L.; DUIZER, E.; AIDARA-KANE, A.; SPRONG, H.; OPSTEEGH, M.; LANGELAAR, M.; THREFALL, J.; SCHEUTZ, F.; VAN DER GIESSEN, J.; KRUSE, H. Food-borne diseases - The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology**, Addlestone, v. 139, p. S3-S15, 2010.

OPAS. **Higiene dos Alimentos - Textos básicos**. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, 2006.

PERESI, J. T. M.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; VAZ, T. M. I.; HERNANDES, R. T.; TEIXEIRA, I. S. C.; SILVA, S. I. L.; GRACIANO, R. A. S.; PINHEIRO, S. R.; SANTOS, L. F. Search for diarrheagenic *Escherichia coli* in raw kibbe samples reveals the presence of Shiga toxin-producing strains. **Food Control**, v. 63, p. 165-170, 2016.

RYU, S.; PARK, S.; CHOI, S.; HWANG, Y.; HAM, H.; KIM, S.; LEE, Y.; KIM, M.; PARK, G.; KIM, K.; CHAE, Y. Antimicrobial resistance and resistance genes in *Escherichia coli* strains isolated from commercial fish and seafood. **International Journal of Food Microbiology**, v. 152, p. 14-18, 2012.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4 ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010.

SOUFI, L.; SÁENZ, Y.; VINUÉ, L.; ABBASSI, M. S.; RUIZ, E.; ZARAZAGA, M.; HASSEN, A. B.; HAMMAMI, S.; TORRES, C. *Escherichia coli* of poultry food origin as reservoir of sulphonamide resistance genes and integrons. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, p. 497-502, 2011.

STOHR, K. Problemas del uso de antimicrobianos en la agricultura y la ganadería. In: WHO. **Boletín de medicamentos esenciales**. WHO: Ginebra, 2000.

TRUCHADO, P.; GIL, M. I.; KOSTIC, T.; ALLENDE, A. Optimization and validation of a PMA qPCR method for *Escherichia coli* quantification in primary production. **Food Control**, n. 62, p. 150-156, 2016.

VIEIRA, M. A. M. Ilhas de patogenicidade. **O Mundo da Saúde**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 406-414, 2009.

VON BAUM, H.; MARRE, R. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, p. 503-511, 2005.

WANNMACHER, L. **Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida?** Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde/ Organização Mundial da Saúde, 2003.

WARREN, L. Genética. In: WARREN, L. **Microbiologia médica e imunológica**. Porto Alegre: Artmed, 2010. 664p.

WEGENER, H. C.; Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 439-445, 2003.

WHO. **Antimicrobial resistance. Global report on surveillance**, 2014. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1)>. Acesso em: 22 fev. 2016.

WHO. **Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)**, 2011a. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/en/>>. Acesso em: 20 fev. 2016.

WHO. **Food safety**, 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/en/>>. Acesso em: 20 fev. 2016.

WHO. **Reduce use of antimicrobials in food-producing animals**, 2011. Disponível em: <[http://www.who.int/world-health-day/2011/presskit/whd2011\\_fs4d\\_subanimal.pdf?ua=1](http://www.who.int/world-health-day/2011/presskit/whd2011_fs4d_subanimal.pdf?ua=1)>. Acesso em: 20 fev. 2016.

WHO. **Second joint FAO/OIE/WHO expert workshop on non-human antimicrobial usage and antimicrobial resistance: management options**, 2004. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/68701/1/WHO\\_CDS\\_CPE\\_ZFK\\_2004.8.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/68701/1/WHO_CDS_CPE_ZFK_2004.8.pdf)>. Acesso em: 20 fev. 2016.

ZHANG, S.; WU, Q.; ZHANG, J.; ZHU, X. Occurrence and characterization of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in retail ready-to-eat foods in China. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 13, p.49-55, 2016.

## CAPÍTULO II

### ARTIGO

#### ***Escherichia coli* em alimentos prontos para o consumo e resistência dos isolados a antimicrobianos**

#### ***Escherichia coli* from ready-to-eat foods and antimicrobial profile of the isolates**

Cíntia Matos Lima<sup>a</sup>, Ingrid Evelyn Gomes Lima Souza<sup>a</sup>, Taila dos Santos Alves<sup>b</sup>, Clícia Capibaribe Leite<sup>a</sup>, Norma Suely Evangelista-Barreto<sup>c</sup>, Rogeria Comastri de Castro Almeida<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Pharmacy Faculty, Federal University of Bahia. Rua Barão de Geremoabo, s/n, Ondina, Cep: 40.170-290, Salvador, BA, Brazil.

<sup>b</sup>Genetic, Evolution and Bioagents Department, Biology Institute, Campinas University, Barão Geraldo, Cep: 13.083-862, Campinas, SP, Brazil.

<sup>c</sup>Center for Research on Fisheries and Aquaculture (NEPA), Federal University of Recôncavo Baiano, Cep: 44380-000, Cruz das Almas, BA, Brazil.

<sup>d</sup>Nutrition School, Federal University of Bahia. Av. Araújo Pinho, n° 32, Canela, Cep: 40.110-160, Salvador, BA, Brazil.

\*Author for correspondence: Rogeria C.C. Almeida (rogeriac@ufba.br).

Current address: Nutrition School, Federal University of Bahia, Salvador, BA - Brazil.

Phone/fax: +5571-32837700.

## RESUMO

O objetivo desse estudo foi determinar a ocorrência de *Escherichia coli* em alimentos prontos para o consumo, a patogenicidade dos isolados e a resistência a antimicrobianos. Um total de 486 amostras de alimentos oriundas de restaurantes comerciais, institucionais e da rede hoteleira de Salvador, BA, e municípios vizinhos, foram investigadas. Essas amostras foram agrupadas em cereais e leguminosas, preparações cárneas, saladas cozidas e cruas, guarnições, sopas, molhos, sobremesas e sucos. Para a detecção do microrganismo foi utilizada a metodologia do Número Mais Provável (NMP), e os resultados demonstraram que 3,1% das amostras estavam contaminadas. As saladas cruas apresentaram o maior percentual de detecção (n=7) 1,4%, seguida pelas saladas cozidas (n=4) 0,8%, preparações cárneas (n=2) 0,4%, cereais e leguminosas (n=2) 0,4%. Um total de 15 isolados foi obtido, sendo que desses cinco foram identificados como *E. coli* enteropatogênica, três enteroinvasiva e uma enterohemorrágica. A reação em cadeia da polimerase (PCR) demonstrou que nenhum dos isolados apresentou os genes de virulência, *cnf1*, *cnf2*, *eae*, *sta*, *lt1*, *stx1*, *stx2* e *cdtB*. Quanto à susceptibilidade/resistência dos isolados aos antimicrobianos, observou-se resistência a nove (60%) dos 15 agentes testados: sulfametoxazol/trimetoprim (n=2) 13,3%, tetraciclina (n=2) 13,3%, ampicilina (n=2) 13,3%, cefalotina (n=1) 6,7%, cefotaxima(n=1) 6,7%, cefoxitina (n=1) 6,7%, cloranfenicol (n=2) 13,3%, ácido nalidíxico (n=1) 6,7% e estreptomicina (n=1) 6,7%. Um isolado (33,3%) apresentou multi-resistência, mediada por plasmídeo, à tetraciclina, sulfametoxazol/trimetoprim, ampicilina e cloranfenicol. Os resultados sugerem que os alimentos prontos para o consumo, principalmente as saladas cruas, podem atuar como reservatórios de *E. coli* e facilitar a disseminação de genes de resistência a antimicrobianos para os seres humanos.

**Palavras-chave:** *Escherichia coli*, antimicrobianos, virulência, restaurantes.

## ABSTRACT

The aim of this study was to determine the occurrence of *E. coli* in ready-to-eat foods, the pathogenicity of isolates and resistance to antimicrobials. A total of 486 food samples obtained from commercial and institutional restaurants and hotel chain from Salvador, BA, and neighboring municipalities, were investigated. The samples were grouped in cereals and vegetables, meat-based preparations, cooked salads, raw salads, garnishes, soups and sauces, desserts and juices. For microorganism detection, the Most Probable Number (MPN) methodology was used, and the results showed that 3.1% of the samples were contaminated. Raw salads showed the highest detection rate (n = 7) 1.4%, followed by the cooked salad (n = 4) 0.8% meat-based preparations (n = 2) 0.4% and cereals and vegetables (n = 2) 0.4%. A total of 15 isolates were obtained and five of them were identified as *E. coli*, three enteroinvasive and one enterohemorrhagic. Polymerase chain reaction (PCR) assay showed that none of the isolates presented the virulence genes, *cnf1*, *cnf2*, *eae*, *sta*, *lt1*, *stx1*, *stx2* and *cdtB*. Regarding to susceptibility/resistance to antimicrobials, the isolates showed resistance to nine antimicrobials (60%) of the 15 tested: sulfamethoxazole/trimethoprim (n = 2) 13.3%, tetracycline (n = 2) 13.3%, ampicillin (n = 2) 13.3%, cephalothin (n = 1) 6.7%, cefotaxime (n = 1) 6.7%, cefoxitin (n = 1) 6.7% chloramphenicol (n = 2) 13.3%, nalidixic acid (n = 1), and 6.7% streptomycin (n = 1) 6.7 %. One isolate (33.3%) showed multi-resistance plasmid mediated to tetracycline, trimethoprim/sulfamethoxazole, ampicillin and chloramphenicol. These results suggest that ready to eat food, especially raw salads, can act as reservoirs of *E. coli* and facilitate the spread of antibiotic resistance genes to humans.

**Keywords:** *Escherichia coli*, antimicrobial, virulence, restaurants

## 1. Introdução

A ocorrência de doenças de origem alimentar e as suas consequências tem sido muitas vezes subestimadas devido à subnotificação e à dificuldade em se estabelecer relações causais entre a contaminação dos alimentos e a doença ou óbito (WHO, 2015a). A investigação da ocorrência de *Escherichia coli* em alimentos tem por finalidade respaldar os sistemas de vigilância sanitária e epidemiológica do país para que suas ações de prevenção e controle da propagação de patógenos de origem alimentar sejam eficazes.

*Escherichia coli* é um dos microrganismos causadores de Doenças Veiculadas por Alimentos que mais atrai a atenção dos órgãos de vigilância sanitária e epidemiológica e de microbiologistas, principalmente por ser uma das espécies bacterianas mais versáteis e mais estudadas mundialmente (Newell et al., 2010; Silva & Mendonça, 2012). Normalmente está presente no trato gastrointestinal de humanos e animais de sangue quente (Jiang, Yu, Wu, Meng, & Shi, 2014), no entanto, sabe-se que o microrganismo é capaz de se desenvolver em diversos nichos extra-intestinais, incluindo os ambientes de manipulação, e em alimentos prontos para o consumo (APHA, 2001).

A presença de *E. coli* em alimentos pode indicar contaminação fecal, uso de matéria-prima contaminada, condições insatisfatórias de higiene do ambiente de preparo dos alimentos e dos manipuladores e presença de outros patógenos de origem entérica (Jiang et al., 2014). Uma vez identificada a presença do microrganismo ou a ocorrência de surto, providências se fazem necessárias a fim de garantir a segurança do alimento e preservar a saúde do comensal.

Embora a maioria das cepas do microrganismo não seja patogênica, determinados subgrupos de *E. coli* apresentam fatores de virulência congênitos ou adquiridos que lhe conferem uma maior capacidade de adaptação a novos nichos e que os tornam capazes de causar um amplo espectro de doenças (Kaper, Nataro & Mobley, 2004). Em se tratando de alimentos prontos para o consumo, destaca-se o subgrupo das *E. coli* diarreiogênicas como os principais agentes causadores de doenças gastrointestinais (FDA, 2011).

A patogênese da infecção de *E. coli* está associada a fatores de virulência que viabilizam a colonização e o desencadeamento da doença no homem. Cada subgrupo de *E. coli* possui genes específicos responsáveis por codificar fatores de virulência que interferem na fisiologia do hospedeiro. Dentre os genes mais importantes, tem-se *STx* associado à *E. coli* produtora de toxina shiga, *ST* e *LT* à *E. coli* enterotoxigênica, *eae* à *E. coli* enteropatogênica, e *cdt* e *cnf* à outras *E. coli* diarreiogênicas (Chapman et al, 2006).



Com o objetivo de reduzir a morbi-mortalidade e o impacto econômico associados às infecções bacterianas, o uso de antimicrobianos vem sendo adotado por longas datas na medicina humana e na medicina veterinária. Entretanto, a *E. coli* vem demonstrando aumento da resistência a um ou mais antimicrobianos (Silva & Mendonça, 2012), fato que tem gerado preocupação para a saúde pública.

A elevada prevalência de cepas resistentes está relacionada ao uso indiscriminado e cada vez mais elevado de antimicrobianos com finalidade profilática, promotora de crescimento em animais e tratamento médico de humanos. O uso excessivo e indiscriminado da droga na alimentação de animais ou a subdosagem podem causar a seleção e a disseminação da resistência antimicrobiana para outras bactérias na cadeia alimentar, através de elementos genéticos móveis (plasmídeos), ou mutação bacteriana (Ryu et al., 2012; Silva & Mendonça, 2012; Soufi et al., 2011; WHO, 2015b).

O presente estudo teve como objetivo determinar a ocorrência de *E. coli* em alimentos prontos para o consumo, a patogenicidade e a susceptibilidade a antimicrobianos dos isolados.

## **2. Material e Métodos**

### ***2.1. Ocorrência de Escherichia coli em alimentos prontos para o consumo***

Com o objetivo de investigar a presença de *E. coli*, 486 amostras de alimentos prontos para o consumo, oriundas de restaurantes comerciais, institucionais e restaurantes pertencentes a rede hoteleira de Salvador, BA, e Mata de São João, foram analisadas no período de setembro de 2014 a fevereiro de 2015.

Aproximadamente 250 g de cada preparação foram colhidos, identificados e transportados, em recipiente isotérmico contendo gelo reciclável, ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal da Bahia para as análises, sem ultrapassar o período de duas horas.

#### ***2.1.1. Detecção de coliformes termotolerantes e Escherichia coli***

A detecção de *E. coli* foi realizada pela técnica dos Número Mais Provável (NMP), de acordo com a metodologia sugerida por Jeffrey, Gurtler & Stawick (2001). Foram utilizados uma sequência de três tubos por diluição da amostra e para identificação de *E. coli*,

pelo menos duas colônias características (centro preto e brilho metálico) foram selecionadas em cada placa de Ágar Eosina Azul de Metileno de Levine (L-EMB; Acumedia, São Paulo, SP, Brasil). Para a confirmação do microrganismo foram realizadas as provas bioquímicas da produção do indol, redução do vermelho de metila (VM), produção de acetoina (Voges Proskauer), e crescimento em meio com citrato como única fonte de carbono.

### **2.1.2. Identificação dos sorogrupos dos isolados**

Para a identificação dos sorogrupos de *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) foi utilizado o soro anti *E. coli* polivalente A (*E. coli* 028ac, 029, 0136, O144 e 0152) e polivalente B (*E. coli* 0112ac, 0124, 0143, 0164 e O167). A identificação de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) foi realizada com o soro anti *E. coli* O157 e *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) foi identificada com o soro anti *E. coli* enteropatogênica clássica polivalente A (*E. coli* 026, 055, 0111 e 0119), polivalente B (*E. coli* 0114, 0125, 0142 e 0158) e polivalente C (*E. coli* 086, 0126, 0127 e 0128). Para tal, uma suspensão foi preparada com 0,5 mL de solução salina estéril homogeneizada com a massa bacteriana obtida após a incubação de cada isolado a 37°C por 24 horas em Ágar Trypticase de Soja (TSA; Difco, Detroit, MI, USA). A identificação dos sorogrupos foi realizada pelo teste de aglutinação em lâmina, segundo recomendação do fabricante dos soros (PROBAC DO BRASIL®, São Paulo, SP, Brasil).

### **2.1.3. Detecção de genes de virulência dos isolados de *Escherichia coli***

Os oligonucleotídeos (primers) utilizados para identificação de genes de virulência dos isolados obtidos corresponderam aos genes *cnf1* e *cnf2* (fator citotóxico necrosante tipos 1 e 2); *eae* (intimina); *sta* (enterotoxina termoestável); *lt1* (enterotoxina termolábel tipo 1); *stx1* e *stx2* (verotoxina tipos 1 e 2) e; *cdtB* (toxina de distinção citoletal) (Tabela 1).

Para a extração do DNA dos isolados, utilizou-se uma alçada do crescimento bacteriano obtido após incubação a 37°C por 24 horas em TSA, suspensa em 100 µL de água ultra-pura estéril. A suspensão foi fervida por 10 minutos e centrifugada a 10.000 x g (Centrífuga Sorvall® MC12) por três minutos. O sobrenadante obtido foi utilizado nas reações de PCR (Siqueira et al., 2009).

A mistura da reação (30 µL) foi preparada utilizando 3 µL de tampão 10X para PCR, 2,5 µM de MgCl<sub>2</sub>, 400 µM de dNTP, 1,5U da enzima Taq DNA polimerase, água ultra-pura

estéril, 7  $\mu\text{L}$  de DNA e 1  $\mu\text{L}$  de cada primer (Siqueira et al., 2009). A concentração dos primers, a temperatura ( $T^{\circ}\text{C}$ ) de anelamento, tamanhos previstos (pb) dos produtos amplificados (amplicons) e cepas controle (determinantes) estão demonstrados na Tabela 2.

As amplificações foram realizadas em termociclador (Techne TC-312) conforme descrito a seguir: desnaturação inicial a  $94^{\circ}\text{C}$  por cinco minutos, 30 ciclos ( $94^{\circ}\text{C}$  por um minuto, temperatura de anelamento por um minuto,  $72^{\circ}\text{C}$  por dois minutos) e extensão final a  $72^{\circ}\text{C}$  por sete minutos. Os produtos da reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose e observados em transiluminador de luz U.V., após incubação em solução de brometo de etídio a 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por 10 minutos (Siqueira et al., 2009).

**Tabela 1**

Primers, tamanho dos amplicons, e condições de amplificação usados no ensaio da PCR para pesquisa de fatores de virulência dos isolados de *Escherichia coli*

| Gene alvo   | Sequência (5' - 3')  | Concentração (ng/μl) | Temperatura de anelamento (°C) | Tamanho do amplicon (pb) | Cepa controle                     | Referência                   |
|-------------|--|----------------------|--------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| <i>cnf1</i> | F = GAACTTATTAAGGATAG<br>R = CATTATTTATAACGCTG                 | 90                   | 43                             | 543                      | J96                               | Blanco et al. (1996)         |
| <i>cnf2</i> | F = AATCTAATTAAAGAGAAC<br>R = CATGCTTTGTATATCTA                | 90                   | 43                             | 543                      | UEC054 (B62)                      | Blanco et al. (1996)         |
| <i>Eae</i>  | F = GACCCGGCACAAGCATAAGG<br>R = CCACCTGCAGCAACAAGAGC           | 60                   | 63                             | 384                      | UEC017 (O157:H7)<br>H30 (O26:H11) | Yu and Kaper (1992)          |
| <i>Sta</i>  | F = TTAATAGCACCCGGTACAAGCAGG<br>R = CTTGACTCTTCAAAAGAGAAAATTAC | 60                   | 50                             | 176                      | UEC019 (FV811)                    | Olsvik and Strockbine (1993) |
| <i>lt1</i>  | F = GGCGACAGATTATACCGTGC<br>R = CCGAATTCTGTTATATATGTC          | 90                   | 55                             | 696                      | UEC021 (FV814)                    | Schultsz et al. (1994)       |

|             |  |    |    |     |                       |                        |
|-------------|--|----|----|-----|-----------------------|------------------------|
| <i>stx1</i> | F = AAGTTGCAGCTCTCTTTGAATA<br>R = TGCAAACAAATTATCCCCTGAG | 90 | 60 | 364 | H30                   | Ojeniyi et al. (1994)  |
| <i>stx2</i> | F = GGGCAGTTATTTTGCTGTGGA<br>R = GTATCTGCCTGAAGCGTAA     | 90 | 60 | 515 | UEC021 (FV814)<br>J29 | Ojeniyi et al. (1994)  |
| <i>cdtB</i> | F = GAGTTATTCCTTCCCCAGGC<br>R = CAAAGGCATCAACAGCAGAA     | 60 | 58 | 108 | CLDT (7)              | Silva and Leite (2002) |

---

## **2.2. Susceptibilidade dos isolados de *Escherichia coli* a antimicrobianos**

Os isolados foram submetidos ao teste de susceptibilidade a 15 agentes antimicrobianos, pelo método de disco-difusão (Bauer, Kirby, Sherris, & Turk, 1966). O controle de qualidade dos ensaios foi realizado utilizando-se a cepa *Escherichia coli* ATCC 25922. Os discos dos agentes antimicrobianos (Laborclin, São Paulo, SP) e suas concentrações foram: ampicilina (AMP) 10 µg, amoxicilina/ácido clavulânico (AMC) 20/10 µg, cefalotina (CF) 30 µg, cefotaxima (CTX) 30 µg, cefoxitina (CFX) 30 µg, ceftazidima (CAZ) 30 µg, gentamicina (GEN) 10 µg, amicacina (AMI) 30 µg, canamicina (KAN) 30 µg, estreptomicina (STR) 10 µg, tetraciclina (TET) 30 µg, ciprofloxacina (CIP) 5 µg, ácido nalidíxico (NAL) (30 µg), trimetoprim/sulfametoxazol (STX) 1,25/23,75 µg, e cloranfenicol (CL) 30 µg.

A leitura do diâmetro dos halos foi realizada com auxílio de uma régua milimetrada e, a partir dos valores obtidos, os isolados foram classificados em susceptível, intermediário ou resistente, conforme recomendação do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2013).

Para cada isolado de *E. coli*, o Índice de Múltipla Resistência Antimicrobiana (IMAR) foi calculado considerando o número de antimicrobianos que o isolado apresentou resistência dividido pelo número total de antimicrobianos testados para este isolado (Krumperman, 1983).

### **2.2.1. Detecção de resistência mediada por plasmídeos-R**

A presença ou ausência de plasmídeos-R foi testada para os isolados que apresentaram resistência a, pelo menos, um antimicrobiano testado. Como agente de cura foi utilizado o reagente alaranjado de acridina (LA, Sigma-Aldrich) nas concentrações 100 µg/mL e 200 µg/mL. Após incubação dos isolados em caldo nutriente (Himedia) a 37°C por 24 horas, alíquotas de 200 µL foram adicionadas aos tubos contendo caldo Luria Bertani (preparado em laboratório conforme recomendação do APHA, 2001) e alaranjado de acridina, seguida de nova incubação a 37°C por 24 horas. Posteriormente, os isolados foram submetidos uma nova vez ao teste de susceptibilidade aos antimicrobianos para verificar se houve alteração no perfil de resistência aos antimicrobianos previamente testados (Molina-Aja et al., 2002).

### 2.3. Análise estatística

Foi utilizado o teste Qui-Quadrado através do *software* R, versão 3.2.1 (pacote Rcmdr), para testar a existência de associação entre as variáveis qualitativas. Foi testada a hipótese ( $H_0$ ) de que não há associação entre as variáveis. Os resultados foram considerados significativos quando o valor de  $p$  foi menor que o nível de significância  $\alpha=0,05$ .

## 3. Resultados

### 3.1. Ocorrência de coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* em alimentos prontos para o consumo

Dentre as 486 amostras de alimentos prontos para o consumo investigadas para a ocorrência de coliformes termotolerantes e *E. coli*, 239 foram oriundas de restaurantes institucionais, 73 de restaurantes comerciais e 174 da rede hoteleira (Tabela 2). A procedência das amostras se mostrou independente do tipo de preparação encaminhada para análise ( $p$ -valor=0,1924).

Os resultados demonstraram que 136 (27,9%) amostras apresentaram coliformes termotolerantes, encontrando-se o maior índice de detecção nas saladas cruas, 14,6% ( $n=71$ ), seguida das saladas cozidas, 5,1% ( $n=25$ ), e preparações cárneas, 4,3% ( $n=21$ ) (Tabela 3). O Número Mais Provável (NMP) de coliformes termotolerantes nas preparações cárneas, cereais e leguminosas, sopas e molhos, e sobremesas variou de 4,0 NMP/g a  $>1,1 \times 10^3$  NMP/g; saladas cozidas de 3,0 NMP/g a  $>1,1 \times 10^3$  NMP/g; saladas cruas de 4,0 NMP/g a  $1,1 \times 10^4$  NMP/g; sucos de 2,0 NMP/mL a  $1,6 \times 10$  NMP/mL; e guarnições 4,0 NMP/g (apenas uma amostra positiva). Comparando o NMP de coliformes termotolerantes (45°C) ao padrão microbiológico brasileiro (Brasil 2001), verificou-se que 25,5% ( $n=1$ ) das saladas cruas, 22,2% ( $n=10$ ) das saladas cozidas, 21,4% ( $n=3$ ) dos sucos, 5% ( $n=1$ ) das sopas e molhos, 4,9% ( $n=8$ ) das preparações cárneas, 4,0% ( $n=1$ ) das sobremesas e 3,9% ( $n=4$ ) das preparações a base de cereais e leguminosas, encontravam-se com os limites de coliformes termotolerantes superiores ao padrões, apesar da presença de *E. coli* não ter sido detectada nessas amostras.

Considerando as amostras positivas para coliformes termotolerantes, verificou-se que 15 (3,0%) estavam contaminadas por *E. coli*. O grupo das saladas cruas apresentou o maior

índice de amostras contaminadas pelo microrganismo, 1,4% (n=7), seguido pelas cozidas, 0,8% (n=4), preparações cárneas, 0,4% (n=2) e cereais e leguminosas, 0,4% (n=2).

**Tabela 2**

Alimentos prontos para o consumo analisados, de acordo com a procedência.

| <b>Preparação</b>     | <b>Restaurante de hotéis<br/>n (%)</b> | <b>Restaurante comercial<br/>n (%)</b> | <b>Restaurante institucional<br/>n (%)</b> |
|-----------------------|--|--|--|
| Cereais e leguminosas | 29 (6,0)                               | 17 (3,5)                               | 55 (11,3)                                  |
| Cárnea                | 55 (11,3)                              | 26 (5,4)                               | 80 (16,5)                                  |
| Guarnição             | 14 (2,9)                               | 3 (0,6)                                | 13 (2,7)                                   |
| Salada cozida         | 19 (3,9)                               | 6 (1,2)                                | 20 (4,1)                                   |
| Salada crua           | 26 (5,3)                               | 15 (3,1)                               | 49 (10,1)                                  |
| Sobremesas            | 16 (3,3)                               | 3 (0,6)                                | 6 (1,2)                                    |
| Sopas e molhos        | 10 (2,1)                               | 1 (0,2)                                | 9 (1,9)                                    |
| Sucos                 | 5 (1,0)                                | 2 (0,4)                                | 7 (1,4)                                    |
| <b>Total</b>          | <b>174 (35,8)</b>                      | <b>73 (15,0)</b>                       | <b>239 (49,2)</b>                          |

Os grupos de alimentos compreendendo as guarnições, sobremesas, sopas e molhos e sucos não apresentaram contaminação (Tabela 3). Com o  $p$ -valor=0,01897, rejeitou-se a hipótese nula ( $H_0$ ), ou seja, existiu associação entre o tipo de preparação e a presença de *E. coli*.

### **3.2. Identificação sorológica dos isolados de *Escherichia coli* e detecção de genes de virulência**

Dos 15 isolados submetidos aos testes sorológicos, cinco foram identificados como *E. coli* enteropatogênica (EPEC), três como enteroinvasiva (EIEC) e um como enterohemorrágica (EHEC). Dentre os sorotipos enteropatogênicos isolados, dois foram provenientes da salada cozida, dois da salada crua e um de uma preparação à base de cereais e leguminosas. Quanto aos isolados identificados como *E. coli* enteroinvasiva, dois foram



oriundos das preparações cárneas e um da salada cozida; enquanto o único isolado enterohemorrágico foi recuperado de uma salada crua (Tabela 4).

A análise de PCR revelou que nenhum dos isolados de *E.coli* apresentou os genes de virulência investigados, *cnf1*, *cnf2*, *eae*, *sta*, *lt1*, *stx1*, *stx2* e *cdtB*.

**Tabela 3**

Ocorrência de coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* em alimentos prontos para o consumo distribuídos em restaurantes comerciais, restaurantes institucionais e restaurantes da rede hoteleira de Salvador, BA, e municípios circunvizinhos.

| Preparações                     | Amostras<br>n (%)  | Amostras positivas                     |                         |
|---------------------------------|--------------------|--|-------------------------|
|                                 |                    | Coliformes<br>termotolerantes<br>n (%) | <i>E. coli</i><br>n (%) |
| A base de cereais e leguminosas | 101 (20,8)         | 10 (2,1)                               | 2 (0,4)                 |
| Preparações cárneas             | 161 (33,1)         | 21 (4,3)                               | 2 (0,4)                 |
| Guarnição                       | 30 (6,2)           | 1 (0,2)                                | 0 (0,0)                 |
| Salada cozida                   | 45 (9,3)           | 25 (5,1)                               | 4 (0,8)                 |
| Salada crua                     | 90 (18,5)          | 71 (14,6)                              | 7 (1,4)                 |
| Sobremesas                      | 25 (5,1)           | 3 (0,6)                                | 0 (0,0)                 |
| Sopas e molhos                  | 20 (4,1)           | 2 (0,4)                                | 0 (0,0)                 |
| Sucos                           | 14 (2,9)           | 3 (0,6)                                | 0 (0,0)                 |
| <b>Total</b>                    | <b>486 (100,0)</b> | <b>136 (27,9)</b>                      | <b>15 (3,0)</b>         |

### 3.3. Perfil de sensibilidade/resistência dos isolados de *Escherichia coli* aos antimicrobianos e detecção de resistência mediada por plasmídeos-R

O perfil de sensibilidade dos 15 isolados de *E. coli* aos 15 agentes antimicrobianos testados está demonstrado na Tabela 5.

Os isolados apresentaram resistência a nove (60%) antimicrobianos, ou seja, 13,3% (n=2) ao grupo das sulfonamidas (sulfametoxazol/trimetoprim), tetraciclina, 13,3% (n=2) ao grupo dos beta-lactâmicos (ampicilina, n=2; cefalotina, n=1; cefotaxima, n=1; e ceftioxina n=1), 13,3% (n=2) ao cloranfenicol, 6,7% (n=1) ao grupo das quinolonas (ácido nalidíxico, n=1), e 6,7% a aminoglicosídeo (estreptomicina, n=1).

**Tabela 4**

Frequência dos sorotipos EIEC, EHEC e EPEC isolados de alimentos prontos para o consumo distribuídos em restaurantes comerciais, institucionais e na rede hoteleira de Salvador, BA, e municípios circunvizinhos.

| Tipo de Preparação    | Isolados<br><i>n</i> | Sorotipos |          |          | Negativo |
|-----------------------|----------------------|-----------|----------|----------|----------|
|                       |                      | EIEC      | EHEC     | EPEC     |          |
| Cereais e leguminosas | 2                    | 0         | 0        | 1        | 1        |
| Preparações cárneas   | 2                    | 2         | 0        | 0        | 0        |
| Salada cozida         | 4                    | 1         | 0        | 2        | 1        |
| Salada crua           | 7                    | 0         | 1        | 2        | 4        |
| <b>Total</b>          | <b>15</b>            | <b>3</b>  | <b>1</b> | <b>5</b> | <b>6</b> |

*n* = número de isolados

EIEC = *E. coli* enteroinvasiva

EHEC = *E. coli* enterohemorrágica

EPEC = *E. coli* enteropatogênica

Ainda, em relação à resistência, destacaram-se os antimicrobianos cujo mecanismo de ação é a inibição do metabolismo do ácido fólico, com 13,3 (n=2) dos isolados resistentes. Por outro lado, mais de 75,0% dos isolados se mostraram sensíveis aos antimicrobianos com ação na síntese da parede celular, síntese dos ácidos nucléicos, síntese proteica e no metabolismo do ácido fólico.

Dentre os isolados, dois (13,3%) demonstraram resistência à pelo menos quatro agentes antimicrobianos. Para esses, o Índice de Múltipla Resistência Antimicrobiana (IMAR) foi calculado. O isolado proveniente de preparação a base de cereais e leguminosas apresentou IMAR igual a 0,53 (resistência a oito antimicrobianos); o isolado obtido de salada cozida apresentou IMAR igual a 0,27 (resistência a quatro antimicrobianos).

Os isolados multi-resistentes apresentaram resistência a antimicrobianos de diferentes classes e mecanismos de ação, ou seja, o isolado com IMAR = 0,53 mostrou-se resistente aos agentes beta-lactâmicos (cefotaxima, ampicilina, cefalotina); tetraciclina, sulfonamida (sulfametoxazol/trimetoprim), quinolona (ácido nalidíxico), aminoglicosídeo (estreptomicina) e cloranfenicol, e o isolado com IMAR = 0,27, à tetraciclina, sulfonamida (sulfametoxazol/trimetoprim), beta-lactâmico (ampicilina) e cloranfenicol.

**Tabela 5**Susceptibilidade dos isolados de *Escherichia coli* aos agentes antimicrobianos.

| Antimicrobiano | Diâmetro do halo (mm) |               |          | Isolados <i>n</i> (%) |               |            |
|----------------|-----------------------|---------------|----------|-----------------------|---------------|------------|
|                | Resistente            | Intermediário | Sensível | Resistente            | Intermediário | Sensível   |
| AMP            | ≤ 6                   | -             | ≥ 19,5   | 2 (13,3)              | ND            | 13 (86,7)  |
| AMC            | -                     | 16            | ≥ 19,5   | ND                    | 1 (6,7)       | 14 (93,3)  |
| CF             | ≤ 6                   | 17            | ≥ 21,5   | 1 (6,7)               | 1 (6,7)       | 13 (86,6)  |
| CTX            | ≤ 7,5                 | -             | ≥ 31,5   | 1 (6,7)               | ND            | 14 (93,3)  |
| CFX            | ≤ 6                   | -             | ≥ 20     | 1 (6,7)               | ND            | 14 (93,3)  |
| CAZ            | -                     | -             | ≥ 27,5   | ND                    | ND            | 15 (100,0) |
| GEN            | -                     | -             | ≥ 20     | ND                    | ND            | 15 (100,0) |
| AMI            | -                     | -             | ≥ 19,5   | ND                    | ND            | 15 (100,0) |
| KAN            | -                     | -             | ≥ 21,5   | ND                    | ND            | 15 (100,0) |
| STR            | ≤ 6                   | 14,5          | ≥ 15     | 1 (6,7)               | 3 (20,0)      | 11 (73,3)  |
| TET            | ≤ 10,5                | -             | ≥ 25     | 2 (13,3)              | ND            | 13 (86,7)  |
| CIP            | -                     | -             | ≥ 23,5   | ND                    | ND            | 15 (100,0) |
| NAL            | ≤ 6                   | 16,5          | ≥ 26,5   | 1 (6,7)               | 1 (6,7)       | 13 (86,6)  |
| SXT            | ≤ 6                   | -             | ≥ 30,5   | 2 (13,3)              | ND            | 13 (86,7)  |
| CL             | ≤ 8                   | -             | ≥ 23,5   | 2 (13,3)              | ND            | 13 (86,7)  |

#### 4. Discussão

A identificação de *E. coli* em alimentos é mais significativa do que coliformes termotolerantes como indicador de contaminação fecal, pois sua presença melhor se correlaciona com o potencial de contaminação por outros patógenos também de origem entérica (Oliveira, Souza, Bergamini, & Martinis, 2011). A presença do microrganismo pode estar relacionada à qualidade inadequada da matéria-prima, ao tempo de cocção insuficiente, contaminação cruzada e higienização deficiente dos alimentos, mãos, utensílios e equipamentos utilizados nos serviços de alimentação (Health Protection Agency, 2009).

Nesse estudo investigou-se a presença de *E. coli* em alimentos prontos para o consumo oriundos de diversos restaurantes. Apesar do baixo nível de detecção do patógeno nos alimentos, observou-se que dois isolados identificados sorologicamente com *E. coli* EPEC apresentaram perfil de multirresistência.

Ainda, os resultados indicaram que as saladas cruas, saladas cozidas e sucos foram os alimentos que apresentaram o maior número de amostras impróprias para o consumo humano, segundo a norma brasileira RDC nº 12/2001 (Brasil, 2001), pois apresentaram contagens de coliformes termotolerantes acima do valor preconizado.

Estudos similares ao presente estudo, desenvolvidos por vários pesquisadores relatam índices de isolamento de *E. coli* entre 1,0% e 3,0% em alimentos prontos para o consumo (Canizalez-Roman, Gonzalez-Nuñez, Vidal, Flores-Villaseñor, & León-Sicairos, 2013; Rodriguez et al., 2011; Ryu et al., 2012; Yang et al., 2016), corroborando com os resultados aqui encontrados.

Em se tratando de Brasil, no período de 2000 a 2015, a *E. coli* foi identificada como agente etiológico de surtos de origem alimentar em 719 (6,4%) dos casos de doenças veiculadas por alimentos. Foi o terceiro microrganismo com o maior número de surtos, precedido da *Salmonella* spp. (14,3%) e do *Staphylococcus aureus* (7,6%) (Brasil, 2016).

Ainda, dados do *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) estimam que no período de 2000 a 2008, nos Estados Unidos, a *E. coli* esteve envolvida em 203 mil casos de doenças de origem alimentar, com registro de 21 óbitos (CDC, 2012). Esses dados indicam a falta de controle nas etapas de processamento dos alimentos ou o não atendimentos às Boas Práticas de Fabricação, o que é preocupante quando se trata de alimentos prontos para o consumo.

Em se tratando de vegetais crus, alimento com maior índice de contaminação por *E. coli* nesse estudo, observa-se que o número de surtos de gastroenterite relacionado ao consumo

de vegetais folhosos crus é significativo e aumenta a cada ano (Olaimat & Holley, 2012; Taban & Halkman, 2011). Assim, no Brasil, 1,2% dos surtos alimentares notificados foram relacionados ao consumo de hortaliças, no período de 2000 a 2015 (Brasil, 2016). Nesse contexto, trabalho desenvolvido com vegetais minimamente processados por Oliveira et al. (2011) relata a ocorrência de 53,1% das amostras contaminadas por *E. coli*, índice bem superior ao encontrado no presente estudo.

Elevadas taxas de coliformes em saladas podem estar relacionadas à exposição dos vegetais a contaminantes durante a irrigação, colheita, transporte, processamento e venda; o preparo sem prévia higienização ou adoção de práticas incorretas de lavagem e desinfecção; ausência/falha do controle do binômio tempo/temperatura durante a distribuição; e vulnerabilidade à possíveis contaminantes externos durante a exposição (Gómez-Aldapa, Rangel-Vargas & Castro-Rosas, 2013).

Nos alimentos prontos para o consumo, que sofrem tratamento térmico, geralmente o controle do binômio tempo/temperatura é suficiente para eliminar os agentes biológicos que comprometem a inocuidade dos alimentos. Dessa forma, as preparações a base de vegetais cozidos, se contaminadas por *E. coli*, como encontrado nesse estudo, é indicativo de cozimento inadequado, ou uso de utensílios não devidamente higienizados, mãos de manipuladores e/ou contaminação cruzada (Bautista-De León, Gómez-Aldapa, Rangel-Vargas, Vázquez-Barrios & Castro-Rosas, 2013; Sospedra, Rubert, Soriano, & Mañes, 2013).

Em serviços de alimentação, o não atendimento às boas práticas constitui a principal causa de doenças de origem alimentar transmitidas pelo consumo de alimentos infectados por EHEC, EPEC e EIEC. Cepas de *E. coli* EPEC e STEC são descritas como potenciais patógenos associados a surtos de origem alimentar (Newell et al., 2010). Portanto, o isolamento de cepas EPEC de saladas cruas e cozidas, e cereais e leguminosas; EIEC de preparações cárneas e saladas cozidas; e EHEC de saladas cruas, alimentos investigados nesse estudo, é um dado preocupante.

Em adição, trabalho conduzido por Dourou et al. (2011) demonstra que a *E. coli* O157:H7 possui a capacidade de aderência e formação de biofilmes em utensílios e equipamentos utilizados na manipulação de carnes, chamando a atenção para importantes fontes de contaminação cruzada. Considerando os resultados da análise de virulência dos isolados de *E. coli*, a ausência dos genes para as principais toxinas conhecidas, *cnf1*, *cnf2*, *eae*, *sta*, *lt1*, *stx1*, *stx2* e *cdtB*, reduz a possibilidade de ocorrência de uma intoxicação, entretanto não se pode descartar o risco de infecção. Ainda, a não detecção dos genes *cnf2*, *sta*, *lt1*, *stx1* e *stx2* pode estar relacionada à perda do material genético inserido em elementos

genéticos móveis (plasmídeos e bacteriófago) (Kaper et al., 2004). Os fatores de virulência situados em elementos móveis genéticos constituem-se em preocupação epidemiológica, uma vez que podem facilitar a propagação da virulência entre bactérias (Silva & Mendonça, 2012).

Quanto à resistência aos 15 antimicrobianos testados, observou-se nesse estudo a ocorrência de multi-resistência em alguns isolados. Essa resistência representa uma grande ameaça à saúde pública, cujas consequências incluem o aumento da frequência de falhas terapêuticas e da gravidade da doença que, por consequência, prolongam a duração da infecção, permitindo a progressão para infecções sistêmicas, e o aumento da morbimortalidade (Newell et al., 2010). Há de se considerar que as cepas de *E. coli* são altamente capazes de adquirir e transferir genes de resistência e, nos últimos anos, tem-se observado um número crescente de registros sobre a aquisição da resistência antimicrobiana pelo microrganismo (Silva & Mendonça, 2012).

Em estudos envolvendo alimentos prontos para o consumo, Canizalez-Roman et al. (2013) identificaram isolados de *E. coli* resistentes a tetraciclina (34%), cefotaxima (30%) e ampicilina (29%). Além disso, os autores destacam que 60% das cepas de EPEC eram resistentes a cefotaxima (34%) e tetraciclina (23%). Em estudo conduzido por Campos et al. (2013), os isolados do patógeno apresentaram resistência a tetraciclina, estreptomicina, sulfametoxazol/trimetoprim, resultados estes similares aos do presente estudo.

Assim como o presente estudo, Barros et al. (2012) encontraram 94% dos isolados de *E. coli* de amostras de frango multi-resistente a antibióticos. Os mesmos autores demonstraram a presença de plasmídeos em 80% das cepas multi-resistentes. Os isolados que não apresentaram plasmídeos também se mostraram resistentes, comprovando a presença de resistência antimicrobiana em nível cromossômico.

De modo geral, a identificação de cepas de *E. coli* patogênica e multi-resistente em alimentos prontos para o consumo é preocupante devido ao risco de infecção no homem. Em adição, a presença de plasmídeos nos isolados resistentes aos antimicrobianos testados indica a possibilidade de propagação dos genes para outros microrganismos patogênicos e comensais residentes no trato gastrointestinal humano.

## 5. Conclusão

Os resultados apresentados nesse estudo indicam que os alimentos prontos para o consumo, principalmente as saladas cruas processadas em restaurantes comerciais e institucionais e restaurantes de hotéis de Salvador e cidades vizinhas, podem representar risco

à saúde de comensais devido a contaminação por *E. coli* patogênica e multi-resistente. Esse risco é compreendido como a possibilidade dos isolados do patógeno transferirem genes de multi-resistência a outros microrganismos patogênicos e/ou comensais residentes do intestino humano, levando à dificuldades na escolha do uso de terapêutico adequado ao tratamento. O controle da adoção das Boas Práticas de manipulação de alimentos, principalmente à base de vegetais é necessário nos serviços de alimentação investigados. Em adição, é importante o monitoramento da resistência de *E. coli* aos antimicrobianos e de sua evolução, por meio de programas de vigilância.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem à equipe de técnicos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal da Bahia, à Fundação de Amparo à Pesquisa da Bahia (FAPESB) pelo Auxílio Dissertação, e aos Professores Dra. Aláise Gil Guimarães da Universidade Federal da Bahia e Dr. Tomomasa Yano da Universidade Estadual de Campinas pelo apoio prestado durante a pesquisa.

### **Conflito de interesse**

Todos os autores declaram que não existe conflito de interesse, incluindo suporte financeiro, ou outros relacionamentos com outras pessoas ou organizações, no período de três anos a partir do início dessa submissão, que possa influenciar inapropriadamente ou apresentar influência sobre esse trabalho.

### **Declaração de submissão e verificação**

Declaramos que esse trabalho não foi publicado anteriormente (exceto na forma de abstract, ou como parte de uma palestra, ou como dissertação) e nem se encontra em consideração em outro local. Esse manuscrito foi aprovado por todos os autores, e, se aceito, não será publicado em nenhum outro local, em Inglês ou em qualquer outra língua, incluindo eletronicamente, sem o consentimento do editor de direitos autorais.

### **Referências**

APHA. (2001). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4<sup>a</sup> ed..American Public Health Association, Washington, DC.



- Barros, M. R., Silveira, W. D., Araújo, J. M., Costa, E. P., Oliveira, A. A. F., Santos, A. P. S. F., Silva, V. A. S., Mota, R. A. (2012). Resistência antimicrobiana e perfil plasmidial de *Escherichia coli* isolada de frangos de corte e poedeiras comerciais no Estado de Pernambuco. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 32, 405-410.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *The American Journal of Clinical Pathology*, 45, 493-496.
- Bautista-De León, H., Gómez-Aldapa, C. A., Rangel-Vargas, E., Vázquez-Barrios, E., & Castro-Rosas, J. (2013). Frequency of indicator bacteria, *Salmonella* and diarrhoeagenic *Escherichia coli* pathotypes on ready-to-eat cooked vegetable salads from Mexican restaurants. *Letters in Applied Microbiology*, 56, 414-420.
- Blanco, M., Blanco, J. E., Blanco, J., Alonso, M. P., Balsalobre, C., Mouriño, M., et al. (1996). Polymerase chain reaction for detection of *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factor type 1 and type 2 (CNF1 and CNF2). *Journal of Microbiology Methods*, 26, 95-101.
- Brasil (2001). Ministério da Saúde. *Resolução RDC no 12, de 02 de janeiro de 2001*. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC\\_12\\_2001.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES) Acessado em 26.02.16.
- Brasil (2016). Ministério da Saúde. *Doenças transmitidas por alimentos*. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/marco/10/Apresenta----o-dados-gerais-DTA-2016.pdf> Acessado em 15.03.16.
- Campos, J., Mourão, J., Pestana, N., Peixe, L., Novais, C., & Antunes, P. (2013). Microbiological quality of ready-to-eat salads: an underestimated vehicle of bacteria and clinically relevant antibiotic resistance genes. *International Journal of Food Microbiology*, 166, 464-470.
- Canizalez-Roman, A., Gonzalez-Nuñez, E., Vidal, J. E., Flores-Villaseñor, H., & León-Sicairens, N. (2013). Prevalence and antibiotic resistance profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from food items in northwestern Mexico. *International Journal of Food Microbiology*, 164, 36-45.
- CDC. (2012). *Pathogens causing US foodborne illnesses, hospitalizations, and deaths, 2000-2008*. Disponível em: <http://www.cdc.gov/foodborneburden/pdfs/pathogens-complete-list-04-12.pdf> Acessado em 18.01.16.

- Chapman, T. A., Wu, X., Barchia, I., Bettelheim, K. A., Driesen, S., Trott, D., et al. (2006). Comparation of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*, 4782-4795.
- CLSI. (2013). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-third informational supplement*. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Dourou, D., Beauchamp, C. S., Yoon, Y., Geornaras, I., Belk, K. E., Smith, G. C., et al. (2011). Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 at different temperatures, on various food-contact surfaces encountered in beef processing. *International Journal of Food Microbiology*, *149*, 262-268.
- FDA. (2011). Diarrheogenic *Escherichia coli*. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070080.htm>  
Acessado em: 01.03.16
- Gómez-Aldapa, C. A., Rangel-Vargas, E. & Castro-Rosas, J. (2013). Frequency and correlation of some enteric indicator bacteria and *Salmonella* in ready-to-eat raw vegetable salads from Mexican Restaurants. *Journal of Food Science*, *78*, M1201-M1207.
- Health Protection Agency. (2009). Guidelines for assessing the microbiological safety of ready-to-eat foods placed on the market. Disponível em: [https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/363146/Guidelines\\_for\\_assessing\\_the\\_microbiological\\_safety\\_of\\_ready-to-eat\\_foods\\_on\\_the\\_market.pdf](https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/363146/Guidelines_for_assessing_the_microbiological_safety_of_ready-to-eat_foods_on_the_market.pdf) Acessado 14.01.16.
- Jeffrey, L., Gurtler, J.B., Stawick, B.A. (2001). *Enterobacteriaceae, coliforms, and Escherichia coli as quality and safety indicators*. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.
- Jiang, X., Yu, T., Wu, N., Meng, H., & Shi, L. (2014). Detection of *qnr*, *aac* (6')-Ib-cr and *qepA* genes in *Escherichia coli* isolated from cooked meat products in Henan, China. *International Journal of Food Microbiology*, *187*, 22-25.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews*, *2*, 123-140.
- Krumperman, P. H. (1983). Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Applied and Environmental Microbiology*, *46*, 165-170.
- Molina-Aja, A., Garcia-Gasca, A., Abreu-Grobois, A., Bolán-Mejía, C., Roque, A., Gomez-Gil, B. (2002). Plasmid profiling and antibiotic resistance of *Vibrio* strains isolated from cultured penaeid shrimp. *FEMS Microbiology Letters*, *213*, 7-12.

- Newell, D. G., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sprong, H., et al. (2010). Food-borne diseases - The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology*, 139, S3-S15.
- Ojeniyi, B., Ahrens, P., & Meyling, A. (1994) Detection of fimbrial and toxin genes in *Escherichia coli* and their prevalence with piglets with diarrhea: the application of colony hybridization assay polymerase chain reaction and phenotype assays. *Journal of Veterinary Medicine*, 41, 49-59.
- Olaimat, A. N., & Holley, R. A. (2012). Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review. *Food Microbiology*, 32, 1-19.
- Oliveira, M. A., Souza, V. M., Bergamini, A. M. M. & Martinis, E. C. P. (2011). Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables consumed in Brazil. *Food Control*, 22, 1400-1403.
- Olsvik, O., & Strockbine, N. A. (1993). PCR detection of heat-stable, and Shiga-like toxin genes in *Escherichia coli*. In: *Diag. Molec. Microbiol.* 271-276. In D. H. Persing, T. F. Smith, F. C. Tenover, and T. J. White (ed.), *Diagnostic molecular microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Rodriguez, M., Valero, A., Carrasco, E., Pérez-Rodríguez, F., Posada, G. D., & Zurera, G. (2011). Hygienic conditions and microbiological status of chilled ready-to-eat products served in Southern Spanish hospitals. *Food Control*, 22, 874-882.
- Ryu, S., Lee, J., Park, S., Song, M., Park, S., Jung, H., et al. (2012). Antimicrobial resistance profiles among *Escherichia coli* strains isolated from commercial and cooked foods. *International Journal of Food Microbiology*, 159, 263-266.
- Schultsz, C., Pool, G. J., Ketel, R., Wevwr, B., Speelman, P., & Dankert, J. (1994). Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using nonradioactively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 2393-2397.
- Silva, A. S., & Leite, D.S. (2002). Investigation of putative CDT gene in *Escherichia coli* isolates from pigs with diarrhea. *Veterinary Microbiology*, 89, 195-199.
- Silva, G. J., & Mendonça, N. (2012). Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*. *Virulence*, 3, 18-28.
- Siqueira, A. K., Ribeiro, M. G., Leite, D. S., Tiba, M. R., Moura, C., Lopes, M. D., et al. (2009). Virulence factors in *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infection and pyometra cases and from feces of healthy dogs. *Research in Veterinary Science*, 86, 206-210.

- Soufi, L., Sáenz, Y., Vinué, L., Abbassi, M. S., Ruiz, E., Zarazaga, M., et al. (2011). *Escherichia coli* of poultry food origin as reservoir of sulphonamide resistance genes and integrons. *International Journal of Food Microbiology*, *144*, 497-502.
- Sospedra, I., Rubert, J., Soriano, J. M., & Mañes, J. (2013). Survey of microbial quality of plant-based foods served in restaurants. *Food Control*, *30*, 418-422.
- Taban, B. M., & Halkman, A. K. (2011). Do leafy green vegetables and their ready-to-eat (RTE) salads carry a risk of foodborne pathogens? *Anaerobe*, *17*, 286-287.
- WHO. (2015a). *Food Safety*. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/en/> Acessado em 01.03.16.
- WHO. (2015b). *10 facts on antimicrobial resistance*. Disponível em: [http://www.who.int/features/factfiles/antimicrobial\\_resistance/en/](http://www.who.int/features/factfiles/antimicrobial_resistance/en/) Acessado em 01.03.16
- Yang, S., Pei, X. Wang, G., Yan, L., Hu, J., Li, Y., et al. (2016). Prevalence of food-borne pathogens in ready-to-eat meat products in seven different Chinese regions. *Food Control*, *65*, 92-98.
- Yu, J., & Kaper, J. B. (1992). Cloning and characterization of the *eae* gene of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Molecular Microbiology*, *6*, 411-417.