

CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

CARNE DE FRANGO: DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA À BETA-LACTÂMICOS DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBLs) EM ISOLADOS DE *ESCHERICHIA COLI*.

Angélica FRIGO*¹, Regiane Boaretto CRECENCIO¹, Luana RAMPAZZO¹, Maiara Cristiane BRISOLA¹, Gláucia Amorim FARIA², Dinael Simão BITNER¹, Gilneia da ROSA¹, Lenita Moura STEFANI³

*autor para correspondência: angelica_frigo@hotmail.com

¹Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Chapecó, SC, Brasil.

²Professora Dra, Universidade do Estado de São Paulo, Ilha Solteira, Brasil.

³Professora PhD, UDESC, Chapecó, SC, Brasil.

Abstract: The objective of the present study was to investigate the presence of resistance genes responsible for the production of Extended Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs) in *Escherichia coli* isolated from chicken meat. In order to do so, the disc diffusion test was performed using five different antimicrobials: Amoxicillin/Clavulanic Acid (20/10 µg), Azetreonam (30 µg), Cefotaxime (30 µg), Cefotaxime (30 µg) and Cefepime (30 µg). Those strains positives for ESBLs were subjected to DNA extraction and PCR (Polymerase Chain Reaction) to detect the genes responsible *bla*CMY-M2, *bla*CTX-M2 and *Amp*C. As results, we obtained 15 ESBL-producing *E. coli* isolates where only one isolate expressed the *bla*CMY-2 gene. The other two genes were not expressed. Since beta-lactams are widely used in human and veterinary medicine, these results indicate the zoonotic potential of man-resistant bacteria through chicken meat. It is extremely important to use antibiotics with caution and responsibility to avoid the spread of multiresistant enterobacteria through food and other vehicles in order to promote one health concept.

Palavras-chave: antimicrobiano, avicultura, enterobácteria, susceptibilidade

CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

Introdução

Os beta-lactâmicos são antimicrobianos caracterizados pela presença de um anel beta-lactâmico e devido ao uso amplo e indiscriminado na medicina humana e veterinária muitos microrganismos adquiriram mecanismos de defesa contra esses medicamentos. Um dos mecanismos de resistência consiste na produção de enzimas chamadas de beta-lactamases que são capazes de inativar o anel beta-lactâmico (Silva e Lincopan, 2017).

A produção dessas beta-lactamases é o principal mecanismo de resistência de bactérias gram-negativas a esses antimicrobianos. Esses genes podem ser transmitidos por elementos genéticos móveis como plasmídeos e transposons que são facilmente propagados para outras espécies bacterianas, pelo meio ambiente ou por produtos de origem animal como a carne de frango. Algumas bactérias conseguiram através de mutações, ampliar o sítio ativo dessas enzimas tornando-as capazes de inibir a ação de antibióticos beta-lactâmicos de amplo espectro como as cefalosporinas de terceira geração (Ceftazidima, Cefotaxima, Cefuroxima e Aztreonam) e foram denominadas de Beta-Lactamases de Espectro Estendido (ESBLs) (Botelho et al., 2015).

Devido ao aumento na disseminação global de resistência a esses antimicrobianos, as perdas econômicas e aos acometimentos à saúde única buscou-se com esse trabalho detectar os principais genes de resistência relacionados as ESBLs em isolados de *E. coli* provenientes de carne de frango comercializada em Chapecó, SC.

Material e Métodos

Para a realização da técnica de disco aproximação foram utilizadas 88 cepas de *E. coli* isoladas de carne de frango comercializadas no município de Chapecó-SC. As análises foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular, Imunologia e

Promoção e Realização:



Apoio Institucional:



Organização:



CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

Microbiologia (LABMIM) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), localizado em Chapecó.

Para detecção das enzimas Beta-lactamases de Espectro Estendido (ESBLs) foi utilizada a técnica de disco aproximação descrita no estudo de Lezameta; Gonzáles-Escalante e Tamariz (2010), adaptada a rotina do LABMIM. Os antimicrobianos utilizados foram: Amoxicilina/Ácido Clavulânico (20/10 µg), Azetreonam (30 µg), Cefotaxima (30 µg), Cefotaxima (30 µg) e Cefepime (30 µg). Após incubação em estufa bacteriológica a 37°C ±1 por 18 a 24 horas, realizou-se a leitura das placas, e a presença de ESBLs foi verificada pela presença de uma “zona fantasma”, representada pela inibição sinérgica entre os discos utilizados ao redor do disco central.

Os isolados positivos para ESBLs foram submetidos a extração de DNA genômico, para posterior detecção dos genes responsáveis pela resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos (*bla*CMY-M2, *bla*CTX-M2 e *AmpC*) através da metodologia da Reação em cadeia da Polimerase (PCR) convencional.

Resultados e Discussão

No teste de disco-aproximação, 15 isolados foram produtores de ESBLs. Já, em relação a detecção de genes codificadores de resistência as ESBLs, somente uma amostra das 15 produtoras dessas enzimas apresentou o gene *bla*CMY-2, e os outros dois genes não foram expressos nos demais isolados.

O fato de apenas uma *E. coli* apresentar o gene *bla*CMY-2 já é preocupante, visto que este gene pode ser transferido de uma bactéria para outra através de plasmídeos. Essa afirmação é comprovada através do estudo realizado por Winokur et al. (2001), que verificaram através de análise de *Southern blot* que fragmentos de plasmídeos contendo o gene *bla*CMY-2 estavam presentes no material genético de isolados de *Salmonella* spp e *E. coli* provenientes de animais de produção e humanos, isso fez com que o mesmo inferisse que houve uma transferência de

Promoção e Realização:

Apoio Institucional:

Organização:

CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

plasmídeos de uma bactéria para a outra, e que estes plasmídeos comuns carregavam o gene *bla*CMY-2 idêntico que foi identificado em humanos, o que pode ter ocorrido a partir de uma transferência de plasmídeos entre bactérias de animais e humanos.

Em outro trabalho, também foi possível verificar que os isolados de *E.coli* provenientes de animais de produção, animais domésticos e humanos apresentavam o gene *bla*CMY-2, porém a disseminação deste, de acordo com os métodos utilizados e os resultados obtidos não ocorreu a partir de clones individuais mas parece estar ligada a transferência de certos plasmídeos como Inc11 (Sallem et al., 2014).

O gene *bla*CTX-M2 não foi detectado embora tenha sido amplamente reportado em produtos de origem aviária nos diferentes estados brasileiros, inclusive Paraná e Santa Catarina que são os maiores produtores de carne de frango do país (Silva e Lincopan, 2012). A primeira vez que foi relatada a presença desse gene em carne de frango no varejo no Brasil foi em 2015 (Casella et al., 2015). No mesmo ano, Botelho et al. (2015), detectaram pela primeira vez a presença de uma variante deste gene, denominado de *bla*CTX-M15 em carne de animais de produção na América do Sul, o que indica disseminação com mutação rápida desses genes codificadores de resistência às ESBLs. Nesse mesmo estudo Botelho et al. (2015), identificou a presença do gene *AmpC* nas carcaças de quatro marcas testadas.

Conclusão

O aparecimento de novas variantes e a prevalência de ESBLs em isolados de alimentos de origem animal e em humanos são preocupantes, tanto pelas implicações na saúde pública como também na economia, haja vista que o Brasil é um país de destaque no setor avícola. Com isso é necessário a tomada de medidas

CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

que visem diminuir a disseminação de genes codificadores de resistência aos beta-lactâmicos a fim de amenizar os impactos na saúde pública.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC-Oeste), ao grupo de pesquisa LABMIM, a FAPESC, a CAPES e ao CNPq pelo auxílio na realização deste estudo.

Referências

- Botelho, L. A. B.; Kraychete, G. B.; Silva, J. L. C.; Regis, D. V. V.; Picão, R. C.; Morreira, B. M. and Bonelli, R. R. 2015. Widespread distribution of CTX-M and plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Escherichia coli* from Brazilian chicken meat. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 110:249-254.
- Casella, T.; Rodríguez, M. M.; Takahashi, J.T.; Ghiglione, B.; Dropa, M.; Assunção, E.; Nogueira, M.L.; Lincopan, N.; Gutkind, G. and Nogueira, M. C. L. 2015. Detection of blaCTX-M-type genes in complex class 1 integrons carried by *Enterobacteriaceae* isolated from retail chicken meat in Brazil. **International Journal of Food Microbiology** 197:88-91.
- Lezameta, L.; Gonzáles-Escalante, E. and Tamariz, J.H. 2010. Comparación de cuatro métodos fenotípicos para la detección de beta-lactamasas de espectro extendido. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica** 27:345–351.
- Sallem, R. B.; Slama K. B.; Bezares, B. R.; Osante, N. P.; Jouini, A.; Klibi, N.; Boudabous, A.; Sáenz, Y. and Torres, C. 2014. Incl1 Plasmids Carrying blaCTX-M-1 or blaCMY-2 Genes in *Escherichia coli* from Healthy Humans and Animals in Tunisia. **Microbial Drug Resistance** 20:1-6.
- Silva, K. C. and Lincopan, N. 2012. Epidemiologia das betalactamasas de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial** 48:91-99.
- Winokur, P. L.; Vonstein, D. L.; Hoffman, L. J.; Uhlenhopp, E. K. and Doern, G. V. 2001. Evidence for Transfer of CMY-2 AmpC-Lactamase Plasmids between *Escherichia coli* and *Salmonella* Isolates from Food Animals and Humans. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy** 45:2716-2722.