

BRUNA RIBEIRO ARRAIS

**SUBTIPOS E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS DE
Escherichia coli PRODUTORAS DE TOXINA SHIGA (STEC)
ISOLADAS DE FEZES DE BOVINOS E OVINOS**

Jataí-GO

2019



**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Bruna Ribeiro Arrais

Título do trabalho: Subtipos e Resistência aos Antimicrobianos de *Escherichia coli* Produtoras de Toxina Shiga (STEC) Isoladas de Fezes de Bovinos e Ovinos

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☐ SIM ☒ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Bruna Ribeiro Arrais
Assinatura da autora²

Ciente e de acordo:

Cecília Nunes Morei
Assinatura da orientadora²

Prof.^a Dr.^a Cecília Nunes Morei
MÉDICA VETERINÁRIA
CRMV-GO 2815 SIAPE: 1331¹

Data: 13 / 06 / 2019

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

BRUNA RIBEIRO ARRAIS

**SUBTIPOS E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS DE *Escherichia coli*
PRODUTORAS DE TOXINA SHIGA (STEC) ISOLADAS DE FEZES DE BOVINOS
E OVINOS**

Profa. Dra. Cecília Nunes Moreira
Orientadora

Profa. Dra. Elaine Cristina Castelhana
Co-Orientadora

Dissertação apresentada ao Programa de
Biociência Animal da Universidade Federal de
Goiás, Regional Jataí, como pré-requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre em
Biociência Animal.

JATAÍ-GO
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Ribeiro Arrais , Bruna

Subtipos e Resistência aos Antimicrobianos de *Escherichia coli*
Produtora de Toxina Shiga (STEC) Isoladas de Fezes de Bovinos e
Ovinos [manuscrito] / Bruna Ribeiro Arrais . - 2019.
XL, 40 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Cecília Nunes Moreira ; co-orientadora
Dra. Elaine Cristina Castelhana .

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Unidade
Acadêmica Especial de Ciências Agrárias, Programa de Pós
Graduação em Biociência Animal, Jataí, 2019.

Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, gráfico, tabelas.

1. Antibiograma. 2. PCR. 3. Resistência a múltiplas drogas . 4.
Subtipagem . I. Nunes Moreira , Cecília , orient. II. Título.

CDU 639.09



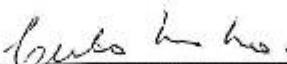
Universidade Federal de Goiás
Regional Jataí
Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal

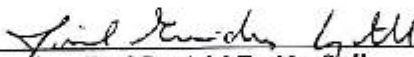
Ata de Defesa Pública de Dissertação de Mestrado

1. **Linha de Pesquisa:** Biotecnologia, Diagnóstico, Epidemiologia e Controle de Doenças nos Animais

Ano de Ingresso: 2017

Ao vigésimo sexto dia do mês de abril de 2019, às 13:30 horas, no Auditório do prédio da Pós-graduação da Regional Jataí da Universidade Federal de Goiás, iniciaram-se os trabalhos referentes à Defesa Pública de Dissertação de Mestrado da candidata **BRUNA RIBEIRO ARRAIS** com o trabalho intitulado **“SUBTIPOS E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS DE *Escherichia coli* PRODUTORAS DE TOXINA SHIGA (STEC) ISOLADAS DE FEZES DE BOVINOS E OVINOS”**. A Banca Examinadora, constituída pelos membros: Profa. Dra. Cecília Nunes Moreira (Presidente/Orientadora), Prof. Dr. Ariel Eurides Stella (Membro Interno) e Profa. Dra. Daise Aparecida Rossi (Membro Externo), considerou a candidata, Bruna Ribeiro Arrais: **APROVADA (X) REPROVADA ()**. Foi concedido um prazo de 30 dias, para a candidata efetuar as correções sugeridas pela Banca Examinadora e entregar o trabalho em sua redação definitiva. E, para constar, foi lavrada a presente ata, que vai assinada pelos membros da Banca.


Profa. Dra. Cecília Nunes Moreira
 Orientadora/Presidente


Prof. Dr. Ariel Eurides Stella
 Membro Interno
 UFG/Regional Jataí


Profa. Dra. Daise Aparecida Rossi
 Membro Externo
 FAMEV-UFU/Uberlândia-MG

Com muito amor, aos meus heróis: meus pais.

AGRADECIMENTOS

Chegar até aqui me mostrou o quanto sou forte, o quanto tenho pessoas especiais ao meu lado e o quanto tenho a agradecer. Por isso, agradeço:

A Meu Mestre e Meu Consolador: Deus, sem você nada sou!

Aos meus pais, que nunca mediram e não medem esforços para apoiar e realizar todos os meus desejos e sonhos. Que sempre estão ao meu lado, segurando a minha mão, ajudando-me em cada etapa da minha vida, não me deixando desistir. Vocês são minha inspiração! Obrigada por tudo. Obrigada por serem quem são, dá forma que são. Amo vocês!

À minha irmã, que mesmo sendo mais nova, me faz ver a vida de uma forma tão colorida e mais simples. Sophia, você é luz! Obrigada pela oportunidade de viver ao seu lado. Conte sempre comigo. Te amo!

A toda a minha família, que mesmo de longe me apoia e me fortalece. Em especial à minha avó “Cacai”, mulher guerreira, fonte de inspiração e exemplo. Ao meu avô Hélio, avó Alexandre e avó Maria, que “lá de cima” olham por mim (*in memoriam*).

À minha orientadora e amiga, Profa. Dra. Cecília Nunes Moreira, que me orienta desde a graduação, e me deu oportunidades ímpares de crescer como pessoa e profissional. “Cissa”, serei eternamente grata!

À minha querida co-orientadora, Profa. Dra. Elaine Cristina Castelhana, que desde o início não mediu esforços para ensinar-me e apoiar-me. Professora, você é maravilhosa! Um grande exemplo para mim. Obrigada por tudo!

A todos os alunos e bolsistas de iniciação científica do laboratório de Práticas Veterinária da UFG, especialmente: Laísa Prado de Freitas, Débora Quevedo, Débora Sampaio, Tainara Amanda, Aristélia Lázara e Mírian Resende, pela ajuda direta no experimento e pela amizade que ficará sempre guardada em meu coração.

À aluna bolsista de iniciação científica do laboratório de Genética da UFG e amiga, Ângela Vitalina, que me acompanhou e ajudou-me na maior parte do tempo. Seu apoio foi de extrema importância para o andamento e continuidade da pesquisa. Serei eternamente grata a você!

Aos técnicos e professores da UFG, Regional Jataí. Em especial à técnica do laboratório de Microbiologia Veterinária, Angélica Franco de Oliveira e ao Professor Dr. Ariel Eurides Stella, por toda a ajuda, apoio, ensinamentos e carinho durante essa jornada. Ao técnico do laboratório de Recursos Genéticos, Jefferson Fernando Naves

Pinto e ao Prof. Dr. Edésio Fialho dos Reis, pelos ensinamentos e parceria. Ao técnico do laboratório de Nutrição Animal, Darlan Marques da Silveira, pelas conversas, conselhos, apoio, cafés e tereré. Obrigada!

A todos os meus professores e colegas de mestrado, especialmente aos meus queridos amigos, “quarteto fantástico”, que o PPGBA me presenteou: Sarah Carvalho, Flávio Barbosa e Fernando Nascimento. Vocês são demais!

A todos os meus amigos que estiveram presentes e souberam entender esta fase da minha vida, me apoiando e me fortalecendo sempre. Em especial à minha amiga e comadre Fernanda Luz, Jordana Barbosa, Nayara Barbosa, Izabella Carvalho, Kyanne Santos, Yasmin Santos, Jaqueline Carvalho e Amanda Alexandre. Amo vocês!

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) por apoiar este estudo.

E todos aqueles que direta ou indiretamente me auxiliaram durante esta jornada.

Muitíssimo obrigada!

“... Senhor, fazei-me instrumento de vossa paz. Onde houver ódio, que eu leve o amor; Onde houver ofensa, que eu leve o perdão; Onde houver discórdia, que eu leve a união; **Onde houver dúvidas, que eu leve a fé...**”

São Francisco de Assis

RESUMO

Escherichia coli produtora de toxina Shiga (STEC) está dentre as principais *E. coli* patogênicas do grupo das diarreiogênicas. Existem 10 subtipos diferentes, cada um deles associado a um grau de patogenicidade para o ser humano. Os ruminantes são considerados os principais reservatórios desse microrganismo, eliminando-o, constantemente, pelas fezes. Devido a erros de tratamento e excesso de exposição a antibióticos, sabe-se que a resistência bacteriana encontrada nesses animais é grande. Objetivou-se realizar a subtipagem e determinar a susceptibilidade aos antimicrobianos em 106 cepas de *E. coli* previamente isolados de fezes de bovinos (59) e ovinos (47) e caracterizados como produtores de toxina Shiga (STEC), verificando a distribuição dos subtipos entre as cepas. A identificação dos subtipos dos genes *stx1* e *stx2* foi feita por PCR. Também, foram feitos testes de sensibilidade a antimicrobianos pelo método de disco-difusão, com dez antibióticos de cinco classes distintas. Das cepas bovinas, dois subtipos de *stx1* foram detectados: *stx1a* e *stx1c*; e quatro subtipos de *stx2*: *stx2a*, *stx2b*, *stx2c* e *stx2d*. Já nas ovinas, apenas os subtipos *stx1a* e *stx1c*, e quatro subtipos de *stx2*: *stx2a*, *stx2b*, *stx2c* e *stx2g*. Os resultados obtidos sugerem a presença de elevada variabilidade nos genes do tipo *stx1* e *stx2*. 96,6% (57/59) das cepas de fezes bovinas e 89,4% (42/47) de fezes ovinas apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico testado. Animais adultos possuíram oito vezes mais chances de apresentarem STEC de alta patogenicidade. Nas duas espécies de animais a maioria das cepas foram consideradas multirresistentes (MDR), 67,8% em bovinos e 59,6% em ovinos, não havendo diferença significativa entre as espécies. STEC de patogenicidade alta possuíram três vezes mais chances de serem MDR. A maior frequência de resistência foi para cefazolina, 86,4% (51/59) em bovinos e 74,5% (35/47) em ovinos, e menor para cefoxitina e ciprofloxacina, ambas 6,8% (4/59) em bovinos, e nenhuma cepa resistente para sulfazotrim em ovinos. STEC de patogenicidade alta possuíram três vezes mais chances de serem multirresistentes aos antimicrobianos testados, do que STEC de patogenicidade baixa. Os dados encontrados neste estudo sugerem cepas com alto potencial de patogenicidade, oferecendo risco de desencadear graves infecções à população.

Palavras-chave: antibiograma, PCR, resistência a múltiplas drogas, subtipagem.

ABSTRACT

Escherichia coli producing of toxin Shiga (STEC) is among the main ones *E. coli* pathogenic of the group of the diarrhealogenic. 10 different subtypes exist, each one of them associate the a pathogenic degree for the human being. The ruminant ones are considered the main reservoirs of that microorganism, eliminating him/it, constantly, for the feces. Due to treatment mistakes and exhibition excess to antibiotics, it is known that the bacterial resistance found in those animals is big. It was aimed at to accomplish the subtyping and to determine the susceptibility to the antimicrobials in 106 stumps of *E. coli* previously isolated of feces of bovine (59) and sheep (47) and characterized as producing of toxin Shiga (STEC), verifying the distribution of the subtypes among the stumps. The identification of the subtypes of the genes *stx1* and *stx2* was made by PCR. Also, they were made sensibility tests the antimicrobials for the disk-diffusion method, with ten antibiotics of five different classes. Of the bovine stumps, two *stx1* subtypes were detected: *stx1a* and *stx1c*; and four *stx2* subtypes: *stx2a*, *stx2b*, *stx2c* and *stx2d*. Already in the sheep feces, just the subtypes *stx1a* and *stx1c*, and four *stx2* subtypes: *stx2a*, *stx2b*, *stx2c* and *stx2g*. The obtained results suggest the presence high variability in the genes of the type *stx1* and *stx2*. 96,6% (57/59) of the stumps of bovine feces and 89,4% (42/47) of sheep feces presented resistance the at least a tested antibiotic. Adult animals possessed eight times more chances of they present STEC of high pathogenic. In the two species of animals most of the strains multiresistant (MDR) were considered, 67,8% in bovine and 59,6% in sheep, not having significant difference among the species. STEC of high pathogenic possessed three times more chances of they be MDR. The largest resistance frequency went to cefazolin, 86,4% (51/59) in bovine and 74,5% (35/47) in sheep, and smaller for ceftiofur and ciprofloxacin, both 6,8% (4/59) in bovine, and any resistant stump for sulfazotrim in sheep. STEC of high pathogenic possessed three times more chances of they be multiresistant to the tested antimicrobials, that STEC of low pathogenic. The data found in this study suggest stumps with high pathogenic potential, offering risk of unchaining serious infections to the population.

Key-words: antibiogram, PCR, resistance to multiple drugs, subtyping

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. SUBTIPOS E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS DE <i>Escherichia coli</i> PRODUTORAS DE TOXINA SHIGA (STEC) DE BOVINOS E OVINOS.....	5
Resumo.....	5
Abstract.....	5
Introdução.....	6
Material e Métodos.....	7
Resultados.....	11
Discussão.....	14
Conclusões.....	19
Referências.....	20
3. CONCLUSÕES GERAIS.....	23
ANEXO 1. Normas de elaboração de artigo do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.....	24

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	Graus Célsius
µL	Microlitro
µM	Micromolar
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>g</i>	<i>G-force (Relative Centrifugal Force)</i>
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
SHU	Síndrome hemolítica urêmica
STEC	<i>E. coli</i> produtora de toxina Shiga
Stx	Toxina Shiga
Stx1	Shiga toxina do grupo 1
Stx2	Shiga toxina do grupo 2
V	Volts
U	Unidade

1. INTRODUÇÃO GERAL

Escherichia coli produtora de toxina Shiga (STEC) é uma bactéria patogênica do grupo de *E.coli* diarreiogênica, capaz de causar doenças intestinais e extraintestinais, como infecções no trato geniturinário, meningites e septicemias. Dentre as diversas bactérias capazes de causar diarreias, a STEC merece destaque por ser associada a diversas doenças humanas, que variam desde de diarreias leves a severas diarreias sanguinolentas, podendo evoluir para complicações extraintestinais graves, gerando sequelas, como por exemplo, falência renal (Kaper *et al.*, 2004; Doregiraee *et al.*, 2016).

STEC são bactérias consideradas emergentes e de grande desafio para a saúde pública, por possuírem um alto grau de infectividade para os seres humanos e por estarem rotineiramente envolvidas em surtos de doenças veiculadas por alimentos de origem animal (Caldorin *et al.*, 2013). Constituem um amplo grupo que possui como característica principal a produção de um ou mais tipos de potentes citotoxinas, as toxinas Shiga 1 e Shiga 2 (Stx1 e Stx2). Existem três subtipos de Stx1 (*stx1a*, *stx1c* e *stx1d*) e sete de Stx2 (*stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f*, *stx2g*), sendo que cada um deles está relacionado a um grau de patogenicidade (Scheutz *et al.*, 2012; Jajarmi *et al.*, 2017).

STEC podem ser encontradas em diversos animais domésticos e selvagens, contudo, os ruminantes, em especial os bovinos de corte e de leite, ovinos e caprinos são considerados os principais reservatórios, que através de suas fezes as eliminam de maneira direta ou indireta, e atingem os seres humanos, podendo causar-lhes doenças (Coura *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2017). A eliminação das bactérias pelas fezes, pode contaminar as águas de superfícies ou as subterrâneas, as culturas de hortifrutigranjeiros, o solo e os produtos de origem animal, como produtos lácteos e a carne durante o abate, por exemplo. Além disso, pode ser transmitida pelo contato direto com animais infectados e pelo contato pessoa a pessoa, por transmissão fecal-oral e contaminação cruzada no preparo de alimentos (Rivas *et al.*, 2008).

O estado de Goiás possui o terceiro maior rebanho de bovinos do Brasil e é o maior em produção de leite da Região Centro-Oeste. De acordo com Caldorin *et al.* (2013), na região Centro-oeste do Brasil isolaram 78 cepas de STEC de diversos animais, incluindo bovinos leiteiros. Ferreira *et al.* (2014) e Freitas-filho *et al.* (2014) também encontraram STEC em bovinos nesta região. Outros autores, também detectaram a presença de STEC em bovinos e seus subprodutos nas demais regiões

do Brasil (Bastos *et al.*, 2006; Cardoso e Marin, 2017; Farah *et al.*, 2007; Gonzalez *et al.*, 2016; Loiko *et al.*, 2016; Sandrini *et al.*, 2007; Tristão *et al.*, 2007).

A nomenclatura consistente e as estratégias de subtipagem são essenciais para a vigilância e para a previsão dos riscos associados a determinadas infecções por STEC, pois a falta de especificidade ou consistência da nomenclatura de toxinas gera muita confusão na caracterização de cepas de STEC (Scheutz *et al.*, 2012).

Já foi descrito que algumas cepas de STEC apresentavam resistência a antibióticos (Beceiro *et al.* 2013; Pereira *et al.*, 2014; Cellelo *et al.*, 2015). Essa resistência é um fator de virulência, provando, que ela atua como um fator chave no desenvolvimento de infecções. A seleção de cepas multirresistentes contribui para o aumento de patógenos emergentes e facilita a propagação de elementos móveis de resistência para outras bactérias (Beceiro *et al.*, 2013).

A presente pesquisa teve como objetivo realizar a subtipagem dos genes *stx1* e *stx2* e determinar a susceptibilidade a antimicrobianos em 106 cepas de *Escherichia coli* previamente isolados de fezes de bovinos (59) e ovinos (47) e caracterizados como produtores de toxina Shiga (STEC), verificando a distribuição dos subtipos entre os isolados.

REFERÊNCIAS

BASTOS, F. C.; VAZ, T. M. I.; IRINO, K. *et al.* Phenotypic characteristics, virulence profile and genetic relatedness of O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated in Brazil and other Latin American countries. *FEMS Microbiology Letters*, v. 265, n. 1, p. 89-97, 2006.

BECEIRO, A.; TOMÁS, M.; BOU, G. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? *Clinical microbiology reviews*, v. 26, n. 2, p. 185-230, 2013.

CALDORIN, M.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; PERESI, J. T. M. *et al.* Ocorrência de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) no Brasil e sua importância em saúde pública. *Boletim Epidemiológico Paulista*, v. 10, n. 110, p. 4-20, 2013.

CARDOSO, P.; MARIN, J. M. Occurrence of non-O157 Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* in artisanal mozzarella cheese in Brazil: risk factor associated with food workers. *Food Science and Technology*, v. 37, n. 1, p. 41-44, 2017.

CELLELO, R.; ETCHEVERRÍA, A. I.; DI CONZA, J. A. *et al.* Antibiotic resistance and integrons in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 46, n. 1, p. 1-5, 2015.

COURA, F. M.; LAGE, A. P.; HEINEMANN, M. B. Patotipos de *Escherichia coli* causadores de diarreia em bezerros: uma atualização. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 34, n. 9, p. 811-818, 2014.

DOREGIRAE, F.; ALEBOUYEH, M.; FASAEI, B.N. *et al.* Isolation of atypical enteropathogenic and shiga toxin encoding *Escherichia coli* strains from poultry in Tehran, Iran. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. v. 9, n. 1, p. 53-57, 2016.

FARAH, S. M.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. *et al.* Phenotypic and genotypic traits of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from beef cattle from Paraná State, southern Brazil. *Letters in Applied Microbiology*, v. 44, n. 6, p. 607-612, 2007.

FERREIRA, M. R. A.; FREITAS-FILHO, E. G.; PINTO, J. F. N. *et al.* Isolation, prevalence, and risk factors for infection by shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in dairy cattle. *Tropical Animal Health and Production*, v. 46, n. 4, p. 635-639, 2014.

FREITAS-FILHO, E. G.; FERREIRA, M. R. A.; PINTO, J. F. N. *et al.* Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 from healthy dairy cattle in Mid-West Brazil: occurrence and molecular characterization. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 34, n. 1, p. 24-28, 2014.

GONZALEZ, A. G.; CERQUEIRA, A. M.; GUTH, B. E. *et al.* Serotypes, virulence markers and cell invasion ability of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from healthy dairy cattle. *Journal of Applied Microbiology*, v. 121, n. 4, p. 1130-1143, 2016.

JAJARMI, M.; FOOLADI, A. A. I.; BADOUEI, M. A. *et al.* Virulence genes, Shiga toxin subtypes, major O-serogroups, and phylogenetic background of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from cattle in Iran. *Microbial Pathogenesis*, v. 109, p. 274-279, 2017.

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

LOIKO, M. R.; DE PAULA, C. M. D.; LANGONE, A. C. J. *et al.* Genotypic and antimicrobial characterization of pathogenic bacteria at different stages of cattle slaughtering in southern Brazil. *Meat Science*, v. 116, p. 193-200, 2016.

PEREIRA, M. C. S.; RIGUEIRO, A. L. N.; ONO, R. K. *et al.* Evaluation of antimicrobial resistance patterns in *Escherichia coli* strains, carriers or not carriers of stx1, stx2 and eae genes. *Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais*, v. 12, n. 4, p. 270-276, 2014.

RIVAS, M.; SOSA-ESTANI, S.; RANGEL, J. *et al.* Risk factors for sporadic Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in children, Argentina. *Emerging Infectious Diseases*, v. 14, n. 5, p. 763-771, 2008.

SANDRINI, C. N. M.; PEREIRA, M. A.; BROD, C. S. *et al.* *Escherichia coli* verotoxigênica: isolamento e prevalência em 60 propriedades de bovinos de leite da região de Pelotas, RS, Brasil. *Ciência Rural*, v. 37, n. 1, p. 175-182, 2007.

SCHEUTZ, F.; TEEL, L. D.; BEUTIN, L. *et al.* Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga Toxins and standardizing stx nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 50, n. 9, p. 2951-2963, 2012.

TRISTÃO, L. C. S.; GONZALEZ, A. G. M.; COUTINHO, C. A. S. *et al.* Virulence markers and genetic relationships of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from serogroup O111 isolated from cattle. *Veterinary Microbiology*, v. 119, n. 2-4, p. 358-365, 2007.

YANG, R.; ABRAHAM, S.; GARDNER, G. E. *et al.* Prevalence and pathogen load of *Campylobacter* spp., *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157/O145 serogroup in sheep faeces collected at sale yards and in abattoir effluent in Western Australia. *Australian Veterinary Journal*, v. 95, n. 5, p. 143-148, 2017.

2. SUBTIPOS E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS DE *Escherichia coli* PRODUTORAS DE TOXINA SHIGA (STEC) ISOLADAS DE BOVINOS E OVINOS

SUBTYPES AND RESISTANCE TO ANTIMICROBIALS OF SHIGA TOXIN-PRODUCING *Escherichia coli* (STEC) ISOLATED FROM BOVINE AND SHEEP

Resumo: Objetivou-se realizar a subtipagem dos genes *stx1* e *stx2* e determinar a susceptibilidade a antimicrobianos em 106 cepas de *Escherichia coli* previamente isoladas de fezes de bovinos (59) e ovinos (47) e caracterizadas como produtores de toxina Shiga (STEC), verificando a distribuição dos subtipos entre as cepas. Para determinar os subtipos dos genes *stx1* e *stx2* foi feita por PCR. Também, foram feitos testes de sensibilidade a antimicrobianos pelo método de disco-difusão, com dez antibióticos de cinco classes distintas. Das cepas bovinas, dois subtipos de *stx1* foram detectados: *stx1a* e *stx1c*; e quatro subtipos de *stx2*: *stx2a*, *stx2b*, *stx2c* e *stx2d*. Já nas ovinas, apenas os subtipos *stx1a* e *stx1c*, e quatro subtipos de *stx2*: *stx2a*, *stx2b*, *stx2c* e *stx2g*. Os resultados obtidos sugerem a presença de elevada variabilidade nos genes do tipo *stx1* e *stx2*. 96,6% (57/59) das cepas de fezes bovinas e 89,4% (42/47) de fezes ovinas apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico testado. Animais adultos possuíram oito vezes mais chances de apresentarem STEC de alta patogenicidade. Nas duas espécies de animais a maioria das cepas foram consideradas multirresistentes (MDR), 67,8% em bovinos e 59,6% em ovinos, não havendo diferença significativa entre as espécies. STEC de patogenicidade alta possuíram três vezes mais chances de serem MDR. A maior frequência de resistência foi para cefazolina, 86,4% (51/59) em bovinos e 74,5% (35/47) em ovinos, e menor para cefoxitina e ciprofloxacina, ambas 6,8% (4/59) em bovinos, e nenhuma cepa resistente para sulfazotrim em ovinos. STEC de patogenicidade alta possuíram três vezes mais chances de serem multirresistentes aos antimicrobianos testados, do que STEC de patogenicidade baixa. Os dados encontrados neste estudo sugerem cepas com alto potencial de patogenicidade, oferecendo risco de desencadear graves infecções à população.

Palavras-chave: antibiograma, PCR, resistência a múltiplas drogas, subtipagem

Abstract: It was aimed at to accomplish the subtyping and to determine the susceptibility to the antimicrobials in 106 stumps of *E. coli* previously isolated of feces of bovine (59) and sheep (47) and characterized as producing of toxin Shiga (STEC), verifying the distribution of the subtypes among the stumps. The identification of the subtypes of the genes *stx1* and *stx2* was

made by PCR. Also, they were made sensibility tests the antimicrobials for the disk-diffusion method, with ten antibiotics of five different classes. Of the bovine stumps, two *stx1* subtypes were detected: *stx1a* and *stx1c*; and four *stx2* subtypes: *stx2a*, *stx2b*, *stx2c* and *stx2d*. Already in the sheep feces, just the subtypes *stx1a* and *stx1c*, and four *stx2* subtypes: *stx2a*, *stx2b*, *stx2c* and *stx2g*. The obtained results suggest the presence high variability in the genes of the type *stx1* and *stx2*. 96,6% (57/59) of the stumps of bovine feces and 89,4% (42/47) of sheep feces presented resistance the at least a tested antibiotic. Adult animals possessed eight times more chances of they present STEC of high pathogenic. In the two species of animals most of the strains multiresistant (MDR) were considered, 67,8% in bovine and 59,6% in sheep, not having significant difference among the species. STEC of high pathogenic possessed three times more chances of they be MDR. The largest resistance frequency went to cefazolin, 86,4% (51/59) in bovine and 74,5% (35/47) in sheep, and smaller for cefoxitin and ciprofloxacin, both 6,8% (4/59) in bovine, and any resistant stump for sulfazotrim in sheep. STEC of high pathogenic possessed three times more chances of they be multiresistant to the tested antimicrobials, that STEC of low pathogenic. The data found in this study suggest stumps with high pathogenic potential, offering risk of unchaining serious infections to the population.

Key-words: antibiogram, PCR, multidrug resistance, subtyping

Introdução

E. coli produtora de shiga toxina (STEC) é uma bactéria patogênica capaz de causar doenças intestinais e também extraintestinais, como infecções no trato geniturinário, síndrome hemolítica urêmica (SHU), colite hemorrágica, meningites e septicemias (Doregiraee *et al.*, 2016). Seu principal fator de virulência é a produção de um ou mais tipos de potentes citotoxinas, as toxinas Shiga (Stx), anteriormente chamadas de verotoxinas (VT) (Verstraete *et al.*, 2014). Duas classes de toxina Shiga antigenicamente distintas são identificadas: Shiga-like toxina 1 (Stx1) e Shiga-like toxina 2 (Stx2), codificadas pelos genes *stx1* e *stx2*, localizados no genoma de bactérias. Essa localização torna capaz a disseminação dos genes entre as diferentes cepas, além da presença das duas toxinas em uma mesma bactéria. É importante ressaltar que ambas as toxinas já foram isoladas em humanos e que a classe de STEC Stx1 é menos virulenta que a de Stx2 (Kaper *et al.*, 2004).

STEC podem ser encontradas em diversos animais domésticos e selvagens, contudo, os ruminantes, em especial os bovinos de corte e de leite, ovinos e caprinos, são considerados os principais reservatórios, que através de suas fezes eliminam essas bactérias, e de maneira direta

ou indireta atingem os seres humanos, podendo causar-lhes doenças (Coura *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2017).

De acordo com Farrokh *et al.* (2013) mais de 300 sorotipos de STEC já foram isolados de bovinos. Além disso, a maioria dos surtos de infecções humanas causadas por este microrganismo deve-se ao consumo de carne bovina malcozida, leite de vaca não pasteurizado e águas de abastecimento e de recreação contaminadas pelo conteúdo intestinal destes animais (Ekong *et al.*, 2015). Ainda, segundo Yang *et al.* (2017) o contato direto com fezes de ovinos tem sido causa de gastroenterites relacionadas à STEC em humanos. São descritos três subtipos de *stx1* (*stx1a*, *stx1c* e *stx1d*) e sete para *stx2* (*stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e*, *stx2f* e *stx2g*), sendo que cada um deles está relacionado a um grau de patogenicidade. A falta de especificidade ou consistência da nomenclatura de toxinas gera muita confusão na caracterização de cepas de STEC. Portanto, a nomenclatura consistente e as estratégias de subtipagem são essenciais para a vigilância e para a prevenção dos riscos associados a determinadas infecções por essa bactéria (Scheutz *et al.*, 2012).

Já foi descrito, que algumas cepas de STEC apresentavam resistência a antibióticos (Beceiro *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2014; e Collelo *et al.*, 2015. Mesmo que essa resistência não seja um fator de virulência, provou-se que a mesma atua como um fator chave no desenvolvimento de infecções. A seleção de cepas multirresistentes contribui para o aumento de patógenos emergentes e facilita a propagação de elementos móveis de resistência para outras bactérias (Beceiro *et al.*, 2013).

O objetivo deste trabalho foi realizar a subtipagem das cepas com base nas variantes do genes *stx1* e *stx2* e determinar a susceptibilidade aos antimicrobianos em 106 cepas de *Escherichia coli* previamente isolados de fezes de bovinos (59) e ovinos (47) e caracterizados como produtores de toxina Shiga (STEC), verificando a distribuição dos subtipos entre as cepas, de amostras de STEC provenientes de fezes bovinas e ovinas coletadas na região sudoeste do estado de Goiás.

Materiais e Métodos

O experimento foi conduzido na Universidade Federal de Goiás/Regional Jataí, no Laboratório de Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Jataí, Goiás, no período de abril de 2018 a março de 2019. As cepas utilizadas nesse estudo fazem parte da Bacterioteca do Laboratório de Práticas Veterinárias, e são oriundas de propriedades rurais da região sudoeste do estado de Goiás. Cento e seis amostras congeladas de STEC, coletadas previamente de fezes de bovinos Girolandos (N = 59) e de ovinos da raça Santa Inês (N = 47) (tab.1), foram

classificadas de acordo com seus subtipos e testadas frente a dez distintos antibióticos para verificar o perfil de resistência presente.

Para obtenção do lisado bacteriano, 100 µl das amostras congeladas foram transferidos para tubos de ensaio contendo 4 mL de caldo *Brain-Heart Infusion Broth* BHI (Acumedia®) e incubados a 37°C por 24 horas. Após essa etapa, as amostras foram semeadas por esgotamento em placas contendo ágar Eosina Azul de Metileno (EMBLEVINE) (KASVI®) e incubadas por mais 24 horas a 37°C. Posteriormente, uma colônia característica (verde brilhante) de cada placa foi selecionada, inoculada em 4 mL de caldo BHI (Acumedia®) e incubada por 12 horas a 37°C. Após esse período, foram transferidos 100 µl do caldo para microtubos tipo *Eppendorf* contendo 900 µl de água destilada estéril e levados para o aparelho de banho seco (VHD®) por 15 minutos a 100°C para lise térmica. Após ocorrer a lise pelo calor, os microtubos foram centrifugados a 18,000 *g* por 5 minutos. Por último, 200 µl do sobrenadante foram transferidos para outro microtubo e estocado em freezer a -18°C até o momento das análises.

Tabela 1 – Descrição das amostras de fezes de bovinos e ovinos analisadas.

	BOVINOS (59) ¹	OVINOS (47) ¹
Idade	16 adultos / 43 jovens	21 adultos / 26 jovens
Sexo	41 Fêmeas / 18 Machos	25 fêmeas / 22 machos
Stx1²	25	25
Stx2³	20	3
Stx1 e Stx2⁴	14	19

1. Número de cepas de STEC utilizadas de bovinos e ovinos. 2, 3 e 4. Número de amostras de STEC que possuem os genes *stx1*, *stx2* ou ambos, respectivamente.

Para o procedimento de amplificação e subtipagem com base nos genes *stx1* e *stx2* foi seguida a metodologia descrita por Scheutz *et al.* (2012), com adaptações. A PCR triplex para subtipagem de amostras de *stx1* foi realizada em volume final de 25 µL, contendo 5 µL do lisado bacteriano, 1x PCR buffer (Sinapse Biotecnologia®), 3 mM de MgCl₂ (Sinapse Biotecnologia®), 0,4 mM de dNTPs (Sinapse Biotecnologia®), 1U da Taq DNA polimerase (Sinapse Biotecnologia®), 0,2 µM de cada um dos pares de *primers stx1c* e *stx1d* (Sigma-Aldrich®) e 0,4 µM do par de *primers stx1a* (Sigma-Aldrich®). Já as reações para subtipagem de amostras de *stx2* foram realizadas em volume final de 20 µL, contendo 5 µL do lisado bacteriano, 1x PCR buffer (Sinapse Biotecnologia®), 3 mM de MgCl₂ (Sinapse Biotecnologia®), 0,4 mM de dNTP (Sinapse Biotecnologia®), 1U da Taq DNA polimerase (Sinapse Biotecnologia®), e 0,3 µM de cada um dos pares de *primers*. As sequências e tamanhos dos *amplicons*, ou seja, produto da reação de amplificação, estão indicados na tab. 2.

Todas as reações foram realizadas no termociclador (Veriti®) programado para desnaturação inicial a 95°C (15 minutos), seguida de 35 ciclos a 94°C (50 segundos), 64°C (40 segundos), 72°C (1 minuto) e extensão final a 72°C (3 minutos), exceto as que se utilizou os *primers* de *stx2d*, quando a temperatura de anelamento foi ajustada para 66°C.

Os produtos amplificados por PCR foram detectados por eletroforese em gel de agarose (BioAmerica Biotech®) a 2,0% utilizando como tampão o Tris/Borato/EDTA - TBE 1X (0,89 M Tris; 0,02M EDTA; 0,89 M ácido bórico). A separação eletroforética foi realizada a 80 V durante 2 horas e meia. Os géis foram corados em solução de brometo de etídio 0,5 mg/mL e visualizados em transiluminador ultravioleta. As imagens dos géis foram feitas com fotodocumentador.

Tabela 2 – *Primers* desenvolvidos por Scheutz et al. (2012) que foram utilizados para determinação dos subtipos de *stx1* e *stx2*.

<i>Primers</i> para subtipagem	Sequência	Posição	Tamanho, <i>amplicon</i> (bp)
<i>stx1a-F1</i>	CCTTTCAGGTACAACAGCGGTT	362–384	478
<i>stx1a-R2</i>	GGAAACTCATCAGATGCCATTCTGG	815–839	
<i>stx1c-F1</i>	CCTTTCCTGGTACAACAGCGGTT	362–384	252
<i>stx1c-R1</i>	CAAGTGTTGTACGAAATCCCCTCTGA	588–613	
<i>stx1d-F1</i>	CAGTTAATGCGATTGCTAAGGAGTTTACC	50–78	203
<i>stx1d-R2</i>	CTTTCCTCTGTTCTAACCCCATGATA	225–252	
<i>stx2a-F2</i>	GCGATACTGRGBACTGTGGCC	754–774	349
<i>stx2a-R3</i>	CCGKCAACCTTCACTGTAAATGTG	1,079–1,102	
<i>stx2a-R2</i>	GCCACCTTCACTGTGAATGTG	1,079–1,100	347
<i>stx2b-F1</i>	AAATATGAAGAAGATATTTGTAGCGGC	968–994	
<i>stx2b-R1</i>	CAGCAAATCCTGAACCTGACG	1,198–1,218	251
<i>stx2c-F1</i>	GAAAGTCACAGTTTTATATACAACGGGTA	926–955	
<i>stx2c-R2</i>	CCGGCCACYTTTACTGTGAATGTA	1,079–1,102	179
<i>stx2d-F1</i>	AAARTCACAGTCTTTATATACAACGGGTG	927–955	
<i>stx2d-R1</i>	TTYCCGGCCACTTTTACTGTG	1,085–1,105	235
<i>stx2d-O55-R</i>	TCAACCGAGCACTTTGCAGTAG	1,140–1,161	
<i>stx2d-R2</i>	GCCTGATGCACAGTACTGGAC	1,184–1,206	280
<i>stx2e-F1</i>	CGGAGTATCGGGGAGAGGC	695–713	
<i>stx2e-R2</i>	CTTCCTGACACCTTCACAGTAAAGGT	1,080–1,105	411
<i>stx2f-F1</i>	TGGGCGTCATTCTGTTG	451–475	
<i>stx2f-R1</i>	TAATGGCCGCCCTGTCTCC	856–874	424
<i>stx2g-F1</i>	CACCGGGTAGTTATATTTCTGTGGATATC	203–231	
<i>stx2g-R1</i>	GATGGCAATTCAGAATAACCGCT	771–793	573

Fonte: adaptada de Scheutz et al. (2012)

Os testes de sensibilidade a antibióticos foram realizados pelo método de disco-difusão de acordo com *The Clinical & Laboratory Standards Institute*, com algumas modificações (CLSI, 2018). Uma colônia de cada amostra foi retirada de placas de Eosina Azul de Metileno (EMBLEVINE) (KASVI®), incubada e inoculada durante 24 horas a 37° C. Após esse período, as colônias foram suspensas em 5 ml de caldo BHI (Acumedia®) e incubadas por 12 horas a 37° C. Em seguida, suabes estéreis foram embebidos nos tubos de caldo BHI e as colônias foram distribuídas por espalhamento sobre a superfície de placas de ágar Mueller Hinton (KASVI®).

As placas ficaram em temperatura ambiente por dez minutos para secagem, e os dez discos de antibióticos (Sensibiodisc - Cecon[®]) (tab. 03) foram colocados na superfície de cada uma. Posteriormente, as placas foram encubadas a 37° C por 24 horas, e os resultados registrados medindo a zona de inibição através do disco e interpretado de acordo com as tabelas de medição padrão. *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como cepa controle (CLSI, 2018). Cepas que possuíam resistência a dois grupos distintos ou mais de antibióticos foram consideradas multirresistentes de acordo com Shaheen *et al.* (2010).

Tabela 3 – Discos de antibióticos, abreviaturas, respectivos grupos, e quantidades contidas em cada disco utilizado nos testes de sensibilidade por disco-difusão

As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa Sigma Plot versão 11

Discos de antibióticos	Conteúdo
β-Lactâmicos	
Ampicilina (AMP)	10 µg
Cefazolina (CFZ)	30 µg
Cefoxitina (CFO)	30 µg
Cefotaxima (CTX)	30 µg
Cefepima (CPM)	30 µg
Imipenem (IMP)	10 µg
Aminoglicosídeo	
Estreptomicina (EST)	10 µg
Quinolona	
Ciprofloxacina (CIP)	25 µg
Sulfozamida/Complexo	
Sulfazotrim (STX)	25 µg
Derivados de nitrofurano	
Nitrofurantoina (NIT)	300 µg

(Systat Software Inc., USA). Os dados de proporção foram comparados pelo teste do qui-quadrado. A análise de regressão logística avaliou a influência da idade (jovem ou adulto), sexo (macho ou fêmea), espécie (bovina ou ovina) e resistência (não multirresistentes ou multirresistentes), como variáveis independentes, sobre o tipo de patogenicidade (variável dependente). Os dados foram apresentados na forma de porcentagem e considerados significativos quando $P < 0,05$. As prevalências encontradas foram apresentadas de forma descritiva.

Resultados

As reações de PCR para subtipagem das STEC (*stx1*) provenientes de fezes bovinas mostraram que a maioria das amostras tinha como subtipo mais comum o *stx1a* associado com

o *stx1c*. O subtipo *stx1c* e as associações dos subtipos *stx1a* e *stx1d*, *stx1c* e *stx1d* não foram observados. Na subtipagem das STEC (*stx2*) o subtipo *stx2c* foi o mais prevalente entre os sete analisados, e os subtipos *stx2e* e *stx2f* (tab. 4 e 5) não foram encontrados. Nas cepas provenientes de fezes ovinas, a associação dos subtipos *stx1a* e *stx1c* também foi a que mais prevaleceu. O subtipo *stx1d* e as associações dos subtipos *stx1a* e *stx1d*, *stx1c* e *stx1d* não foram observados. Entre os subtipos de *stx2*, a maioria das amostras tinha o *stx2b* como o mais comum, e os subtipos *stx2a*, *stx2c* e *stx2g* também foram encontrados. Os subtipos *stx1d*, *stx2e* e *stx2f* tiveram resultados inconclusivos em ambas espécies de animais testados, por não haver controle positivo para eles.

Tabela 4 – Subtipos de *stx1* e *stx2* presentes nas STEC isoladas de bovinos.

Gene ¹	Subtipos (s)	No. (%) de isolados (<i>stx1</i> = 38 / <i>stx2</i> = 33) ²
<i>Stx</i>	Stx1a	7,89% (3/38) ³
	Stx1a, Stx1c	13,15% (5/38) ³
	Stx2a e stx2c	42,42% (14/33) ³
	Stx2a, Stx2c e Stx2d	9,09% (3/33) ³
	Stx2b, stx2c e stx2d	3,03% (1/33) ³
	Stx2c e Stx2d	6,06% (2/33) ³
	Stx2c	9,09% (3/33) ³

¹ *stx*, gene da toxina Shiga.

² Número de amostras de STEC que apresentam os genes *stx1* e *stx2* submetidos a subtipagem.

³ Porcentagem de subtipos encontrados, em relação ao número total das amostras de STEC, que apresentam os subtipos dos genes *stx1* e *stx2* separados ou simultaneamente.

Tabela 5 – Subtipos *stx1* e *stx2* presentes nas STEC isoladas de ovinos.

Gene ¹	Subtipos (s)	No. (%) de isolados (<i>stx1</i> = 41 / <i>stx2</i> = 23) ²
<i>Stx</i>	Stx1a	12,19% (5/41) ³
	Stx1c	29,26% (12/41) ³
	Stx1a e Stx1c	56,09% (23/41) ³
	Stx2b	69,59% (16/23) ³
	Stx2a e Stx2c	4,34% (1/23) ³
	Stx2b e Stx2g	13,04% (3/23) ³

¹ *stx*, gene da toxina Shiga.

² Número de amostras de STEC que apresentam os genes *stx1* e *stx2* submetidos a subtipagem.

³ Porcentagem de subtipos encontrados, em relação ao número total das amostras de STEC, que apresentam os subtipos dos genes *stx1* e *stx2* separados ou simultaneamente.

Os cento e seis isolados de STEC, 59 de bovinos e 47 de ovinos, foram testados contra 10 antibióticos (representando 5 grupos diferentes). Apenas 3,4 % (2/59) das cepas de bovinos foram sensíveis a todos os antibióticos, enquanto 96,6% (57/59) apresentaram resistência a pelo menos um. Já em ovinos, 10,6% (5/47) foram sensíveis a todos, e 89,4% (42/47) foram

resistentes a pelo menos uma droga. Nos dois tipos de animais pesquisados, a maioria dos isolados eram multirresistentes (MDR), ou seja, mostraram resistência a dois ou mais antibióticos de dois grupos distintos (Shaheen *et al.*, 2010). Através da realização do teste qui-quadrado foi observado que não houve diferença significativa entre bovinos e ovinos em relação a ocorrência de bactérias multirresistentes encontradas ($P > 0,05$) (Fig 1, 2 e 3).

Com relação à prevalência de resistência a cada antibiótico, as fig. 2 e 3 mostram a porcentagem de cepas resistentes a cada antibiótico. Nitrofurantoina, seguido do cefotaxima e imipenem, foram os fármacos que as bactérias mais apresentaram resistência. Além disso, é importante ressaltar que os isolados de ambos os animais mostraram uma gama de resistência a diferentes antibióticos da família das cefalosporinas de 1^a, 2^a, 3^a e 4^a geração: cefazolina, cefoxitina, cefotaxima e cefepima, respectivamente (fig. 2 e 3).

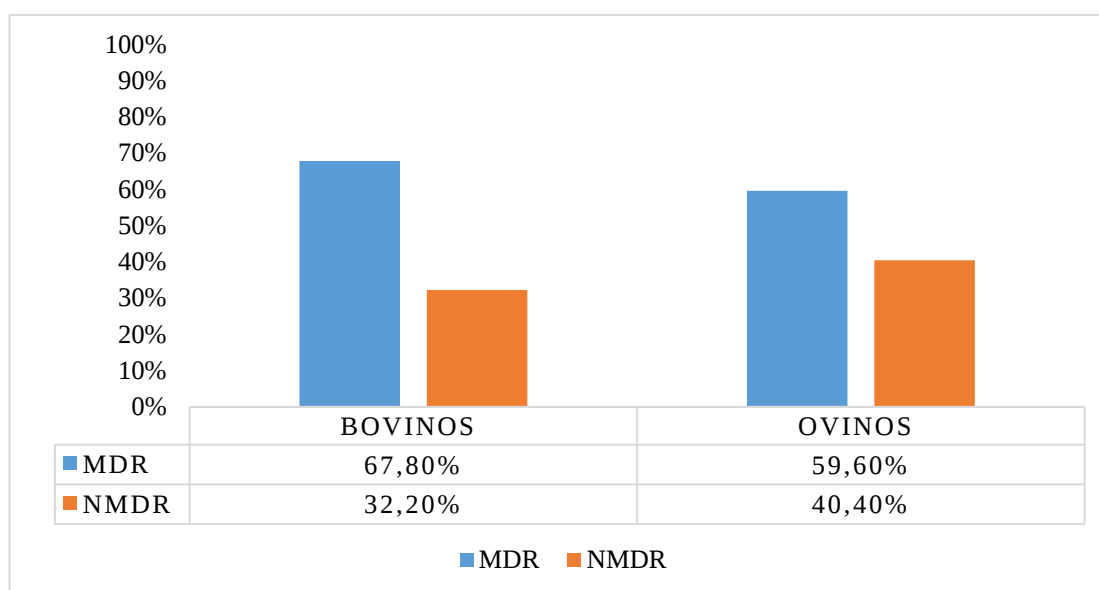


Figura 1 – Percentual de STEC resistentes a múltiplas drogas (MDR) e não resistente a múltiplas drogas (NMDR), isoladas de fezes de bovinos (esquerda) e ovinos (direita), respectivamente.

A idade e a resistência antimicrobiana foram fatores associados ($P < 0,05$) a patogenicidade (tab. 6). No presente trabalho, os animais adultos possuíam oito vezes mais chances de apresentar STEC de patogenicidade alta, ou seja, de possuírem subtipos *stx2* ou a simultaneidade entre eles e os três subtipos de *stx1* (Taghadosi *et al.*, 2018), em comparação com os animais jovens. Ainda, animais que possuíam cepas de STEC de patogenicidade alta obtiveram três vezes mais chances de também possuírem cepas multirresistentes aos antimicrobianos testados, em relação aos que possuíam cepas de patogenicidade baixa.

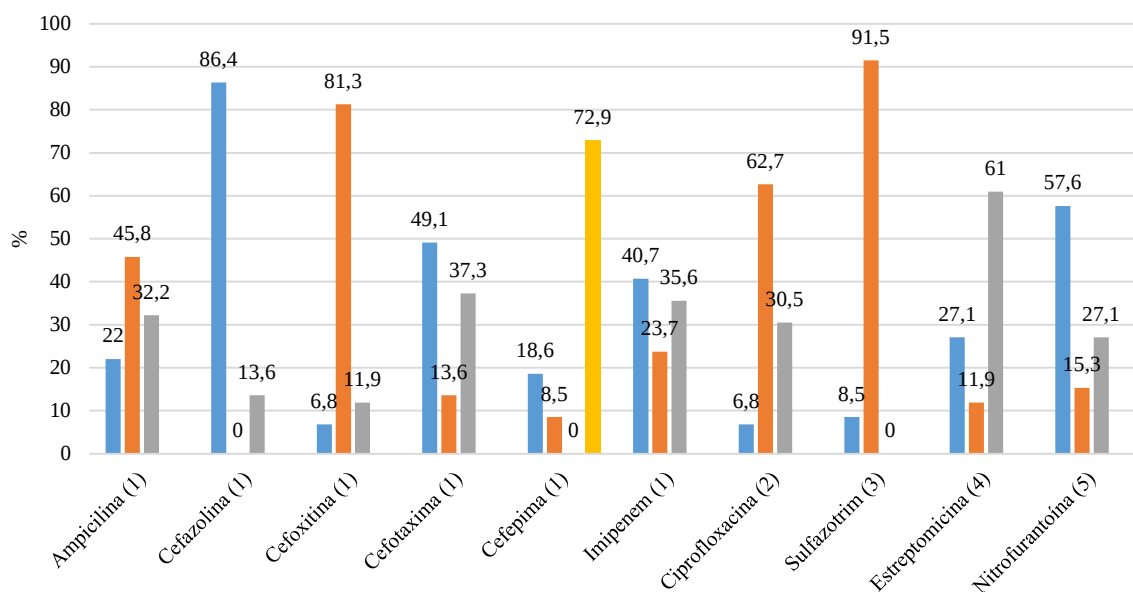


Figura 2 – Percentual de sensibilidade a 10 antibióticos para isolados de STEC proveniente de fezes bovinas. Barras azuis indicam resistência, barras laranjas indicam susceptibilidade, barras cinzas indicam sensibilidade intermediária, e barras amarelas, dependente de dose susceptível, de acordo com as definições do CLSI (2018). O eixo Y representa a porcentagem de isolados. O eixo X representa os grupos farmacológicos testados (1) β -lactâmicos, (2) Quinolona, (3) Complexo sulfonamida, (4) Aminoglicosídeo, e (5) Derivado de Nitrofurano.

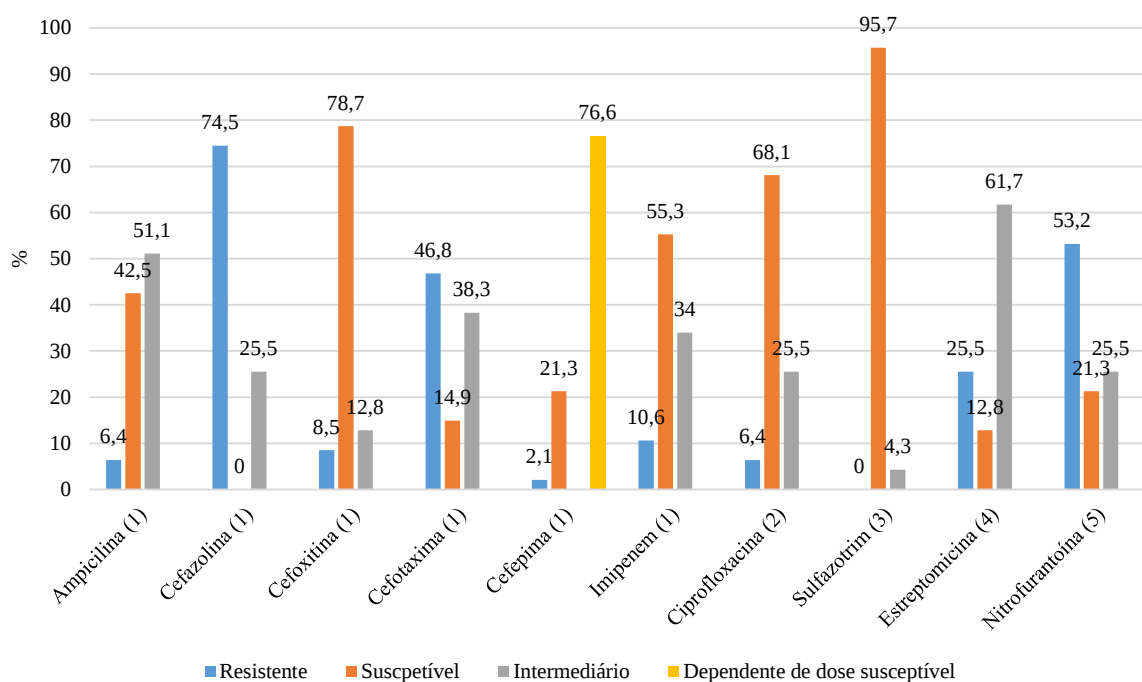


Figura 3 – Percentual de sensibilidade a 10 antibióticos para isolados de STEC proveniente de fezes ovinas. Barras azuis indicam resistência, barras laranjas indicam susceptibilidade, barras cinzas indicam sensibilidade intermediária, e barras amarelas, dependente de dose susceptível, de acordo com as definições do CLSI (2018). O eixo Y representa a porcentagem de isolados. O eixo X representa os grupos farmacológicos testados (1) β -lactâmicos, (2) Quinolona, (3) Complexo sulfonamida, (4) Aminoglicosídeo, e (5) Derivado de Nitrofurano.

Tabela 6 – Coeficientes de regressão logística e odds ratio para fatores associados com *patogenicidade em bovinos e ovinos.

Fatores	Coeficiente	Valor - P	Odds ratio (IC 95%)
Idade ¹	2,1139	0,0002	8,28 (2,72 - 25,17)
Sexo ²	0,3916	0,3982	1,47 (0,60 - 3,67)
Espécie ³	-0,7193	0,1247	0,48 (0,19 - 1,22)
Resistência ⁴	1,1585	0,0282	3,18 (1,13 a 8,96)
Intercepto	-1,3319		

* Variável dependente: patogenicidade (baixa = 0; alta = 1).

¹Idade: jovem = 0; adulto = 1.

²Sexo: macho = 0; fêmea = 1.

³Espécie: bovino = 0; ovino = 1.

⁴Resistência: NMDR = 0; MDR = 1.

Discussão

No presente trabalho o subtipo *stx1a* e o *stx1c* foram encontrados tanto nos isolados de amostras bovinas quanto de ovinas. Em células Vero o subtipo *stx1a* é cerca de 10 vezes mais citotóxico do que o *stx2a*, no entanto, o inverso é verificado em camundongos: *stx1a* é 100 a 400 vezes menos letal do que *stx2a*, embora as toxinas exibam atividades enzimáticas equivalentes (Melton-Celsa, 2014). O principal fator de virulência expresso por STEC é a toxina AB5, que possui duas formas antigenicamente distintas, Stx1a e Stx2a. Embora se liguem ao mesmo receptor, globotriaosilceramida (Gb3), o *stx2a* é mais potente em camundongos, enquanto que o *stx2b* é mais citotóxico em cultura celular (Russo *et al.*, 2014). De acordo com Scheutz *et al.*, (2012) os subtipos *stx1a* e *stx2a* são os mais frequentemente associados a doenças.

No nosso trabalho, apesar do subtipo *stx1a* ter sido detectado nas duas espécies de animais, a presença do mesmo com o subtipo *stx1c* teve maior predominância. Resultado esse, semelhante ao de Alonso *et al.* (2017), que também encontraram ambos separados, porém a combinação entre os mesmos foi maior nas cepas analisadas. É importante destacar que a simultaneidade de subtipos é frequentemente encontrada. Na pesquisa de Taghadosi *et al.* (2018), por exemplo, duas linhagens isoladas de bezerros apresentaram cinco subtipos simultaneamente (*stx1a*, *stx1c*, *stx2b*, *stx2c* e *stx2d*). Segundo esses autores, cepas que possuem

a combinação de subtipos *stx1* e ou *stx2* são mais tóxicas para células Vero do que outras cepas. No presente estudo, algumas das cepas de bovinos e ovinos mostraram subtipos *stx1* e *stx2* de forma simultânea, podendo serem consideradas altamente tóxicas e patogênicas.

No trabalho de Feng e Reddy (2013), feito nos Estados Unidos, a maioria dos isolados *stx1* foram portadores do subtipo *stx1a*, sendo mais comumente presente em combinação com outros subtipos. Trabalhos feitos com outros animais, também relatam a presença do subtipo *stx1a*, como na pesquisa de Baranzoni *et al.* (2016) com suínos, que teve esse subtipo como o segundo mais encontrado. Segundo eles os suínos, assim como os ruminantes, têm se mostrado importantes reservatórios de STEC e podem possuir perfis de virulência associados com doenças humanas. Em alimentos isso pode também ser confirmado, Popova *et al.* (2017) encontraram *stx1a* na maioria das amostras de carne de frango analisadas.

Os subtipos *stx1c* e *stx1d* são raramente encontrados em doenças humanas, e quando presentes em STEC estão associados a um curso de doença leve. Trabalhos relatam que os subtipos *stx1a*, *stx1c* e *stx1d* possuem insignificante associação com quadros de SHU, diferente das cepas de STEC produtoras de *stx2a*, *stx2c* e *stx2d*, que são frequentemente relacionadas à SHU e à colite hemorrágica em humanos (Melton-Celsa, 2014; Skinner *et al.*, 2014). Na nossa pesquisa, 9,09% (3/33) das STEC isoladas de fezes bovinas apresentavam esses três subtipos simultaneamente, fato esse preocupante.

Neste estudo, a prevalência do subtipo *stx1c* nas amostras de ovinos foi de 27,27% e 52,27% em simultaneidade com *stx1a*, ao contrário das amostras de bovinos, que apesar de 13,15% terem sido classificadas como *stx1a/stx1c*, nenhuma demonstrou apenas o *stx1c* como subtipo. De acordo com Feng e Reddy (2013) o subtipo *stx1c* é geralmente associado a diarreias leves e infecções assintomáticas, sendo o subtipo mais comum entre cepas de STEC isoladas de ovelhas, cervos selvagens e suas carnes, o que pode justificar a diferença de prevalência do mesmo nas cepas de bovinos e ovinos aqui pesquisadas.

Em outros trabalhos recentes com caprinos e bezerros, o subtipo *stx1c* também foi o mais predominante (Jajarmi *et al.*, 2018; Otero *et al.*, 2017; Taghadosi *et al.*, 2018). Aqui, o subtipo *stx1d* não foi encontrado em nenhuma das 106 cepas analisadas. Segundo Feng e Reddy (2013) pouco se sabe sobre o significado clínico desse subtipo. A baixa prevalência e até mesmo ausência dele é comumente observada em outras pesquisas (Feng e Reddy, 2013; Hofer *et al.*, 2012; Jajarmi *et al.*, 2017; Jajarmi *et al.*, 2018; Popova *et al.*, 2017).

A maioria das cepas de STEC de fezes bovinas e ovinas apresentaram simultaneidade entre os subtipos *stx1* e *stx2* (tab.4 e tab. 5). O subtipo *stx2a* em simultaneidade com o *stx2c* foi predominante nos bovinos, verificado em 42,42% (13/33) das cepas, já em ovinos, 4,34%

(1/23). Em ovinos, o subtipo *stx2b* esteve presente em 69,59% (16/23) das cepas, contudo, 13,04% (3/23) apresentaram simultaneidade com o subtipo *stx2g*. Essa simultaneidade dos subtipos das amostras de fezes que foram coletas poderia oferecer riscos de doenças graves para as pessoas que possuíam contato com esses animais. Conjuntos específicos de fatores de virulência foram associados a diferentes subtipos de *stx2* no trabalho de Franz *et al.* (2015). O *stx2a* foi positivamente associado a uma série de fatores de virulência adicionais, incluindo *eae*, ao contrário dos *stx2b*, *stx2d*, *stx2e* e *stx2g*, que mostraram pouquíssima associação para esses fatores. Segundo os mesmos autores, o subtipo *stx2f* geralmente está associado a doenças mais leves, devido ausência geral de *ehxA* e *terB*, genes que demonstram associação significativa com a SHU.

Dados epidemiológicos de doenças humanas indicam uma associação mais forte com doenças graves para cepas de STEC que produzem *stx2a* do que somente *stx1a*. Também, *stx2a* é considerado mais potente para o intestino, as células epiteliais e endoteliais alvejadas na SHU são mais sensíveis a esse subtipo. Além disso, foi descoberto que células endoteliais microvasculares renais obtidas de glomérulos humanos são cerca de mil vezes mais sensíveis a *stx2a* do que a *stx1a* (Melton-Celsa, 2014). Portanto, a grande porcentagem de cepas, principalmente das bovinas, apresentando o subtipo *stx2a* em nosso estudo, é um fator preocupante para a população da região local.

Está descrito no trabalho de Melton-Celsa (2014) que o subtipo *stx2d* está associado com graves manifestações de infecção por STEC. Apesar de o *stx2b* e *stx2d* apresentarem citotoxicidade reduzidas para células Vero, e a produção de toxina Stx2c ser mais ativa nessas células, o *stx2d* é tão tóxico quanto o *stx2a* quando injetável em animais. Do mesmo modo, cepas que produzem *stx2d* são altamente virulentas em um modelo de infecção de camundongos tratados com estreptomicina. Já o subtipo *stx2b* está associado a doenças leves, e *stx2e*, *stx2f* e *stx2g* estão intimamente associados à infecção por STEC em animais.

Entre os resultados encontrados no trabalho de Franz *et al.* (2015), os genes *stx2b* e *stx2d* apresentaram frequências mais altas que os outros genes estudados. Nosso resultado foi semelhante para os subtipos encontrados nas cepas isoladas a partir de fezes de ovinos. Apesar de nenhuma cepa apresentar o *stx2d*, 69,59% (16/23) apresentaram o gene *stx2b*. Martins *et al.*, (2015) também verificaram que o subtipo *stx2b* foi o mais comum entre os ovinos pesquisados. A criação de ovinos é uma atividade animal muito importante no setor produtivo no Brasil. Atualmente, nosso país possui o maior lote (aproximadamente 17 milhões de cabeças) e produção de carne de ovelha do continente. Consequentemente, o risco de exposição a patógenos zoonóticos, como STEC, é grande. Embora poucos estudos relatem a ocorrência de

STEC em populações de ovinos brasileiros, e os bovinos serem considerados o principal reservatório de STEC, maior prevalência dessa patógeno tem sido detectada em fezes e carnes de ovinos em comparação a amostras de origem bovina (Martins *et al.* 2015).

A resistência aos antibióticos é um problema crescente para cepas de *E. coli*. Em algumas regiões do mundo, sobretudo nos países desenvolvidos, estirpes que causam infecções sanguíneas são com muita frequência multirresistentes e, em muitos casos, pode não haver antibióticos eficazes para tratá-las, com exceção dos carbapenêmicos. Contudo, a resistência mediada por enzimas capazes de hidrolisar todos os β -lactâmicos, incluindo carbapenêmicos têm crescido em todo o mundo (Guardabassi *et al.*, 2010). Apesar do imipenem, antibiótico do subgrupo dos carbapenêmicos com maior espectro dentre os β -lactâmicos ser altamente resistentes às betalactamases, o que o tornaria, portanto, útil para infecções graves, na nossa pesquisa 40,7% das cepas de STEC de fezes bovinas foram resistentes a ele.

As cefalosporinas são uma importante classe de antibióticos e, mais utilizadas na medicina veterinária. Devido ao seu amplo espectro antibacteriano e forte capacidade bactericida, a produção, bem como o consumo clínico desses fármacos são enormes (Yu *et al.*, 2016). Entre nossos resultados, 49,1% e 18,6% das cepas de STEC isoladas de bovinos foram resistentes a cefotaxima e cefepima, cefalosporinas de terceira e quarta geração, respectivamente. Das de ovinos, a resistência a cefotaxima não foi muito diferente: 46,8%.

Provavelmente, o uso exacerbado de cefalosporinas de terceira e quarta gerações em animais esteja relacionado com a seleção de bactérias resistentes nos mesmos (Guardabassi *et al.*, 2010). Igualmente, quase 90% das cepas de bovinos, e mais de 70% das de ovinos, foram resistentes à cefazolina, cefalosporina de primeira geração. De acordo com Climeni *et al.* (2009), cefalosporinas de primeira geração são as mais indicadas em mastites subclínicas, mastite aguda, e no tratamento de vacas secas. Segundo Momtaz *et al.* (2012), o uso da nitrofurantoína é proibido. Infelizmente, muitos médicos veterinários, em diversos campos da veterinária, usam esse antibiótico como básico. Altos níveis (mais de 50%) de resistência antibiótica para ele em nosso estudo podem indicar usos irregulares e não autorizados dela em tratamentos veterinários.

A exposição ambiental de humanos a bactérias resistentes aos antibióticos de origem animal pode ocorrer em diversas circunstâncias, como por exemplo, pela propagação de estrume nas terras agrícolas e por poluição atmosférica. Também, há cada vez mais provas de que o contato direto com os animais pode, sob certa circunstância, desempenhar um papel importante na contaminação por bactérias resistentes (Guardabassi *et al.*, 2010), o que

representa risco ocupacional para trabalhadores que manipulam animais e ou seus produtos na região onde a presente pesquisa foi realizada.

O fato de a maioria de nossas cepas serem resistentes a pelo menos um antibiótico testado é preocupante. Mesmo que o uso de agentes antimicrobianos na produção animal e na medicina veterinária não seja responsável pela origem da resistência antimicrobiana, ele com certeza tem contribuído para a propagação de bactérias resistentes (Guardabassi *et al.*, 2010). Um relatório sobre resistência à colistina transferível em *E. coli* de animais de criação, e a presença de genes de resistência em isolados de carne e de pacientes, destacou a ameaça que os genes de resistência originários de bactérias em animais podem posteriormente serem transferidos para bactérias presentes em humanos (Liu *et al.*, 2016).

No nosso trabalho, animais adultos possuíram oito vezes mais chances de apresentarem STEC de patogenicidade alta do que os animais jovens. Provavelmente, esse resultado é justificado pelo tempo de exposição mais prolongado dos adultos a essas bactérias, e por um tempo maior de tratamento com distintos antibióticos. Esse resultado é preocupante, pois a exposição de seres humanos com animais adultos e seus subprodutos costuma ser maior do que com animais jovens, como durante a ordenha e abate, tendo como consequência não só contato direto com esses animais reservatórios, mas também subprodutos, como leite, queijos e carnes contaminados. Também, foi observado que STEC de patogenicidade alta possuíram três vezes mais chances de serem multirresistentes do que não multirresistentes, ou seja, além de serem cepas altamente virulentas para os seres humanos, podem ser consideradas de difícil tratamento e eliminação, devido sua ampla resistência aos antimicrobianos.

O perfil de resistência dos isolados pode refletir um acúmulo de genes de resistência e representa o antibiótico “*resistome*”, presente como um reservatório, elementos móveis e genes. Isso pode auxiliar na compreensão dos fatores ambientais que levam à retenção de um reservatório de genes de resistência na população de bactérias e, portanto, controlar sua disseminação (Ibrahim *et al.*, 2016). *E. coli* é um dos grupos de sete espécies que a OMS usa como organismo sentinela para desenvolvimento de resistência aos antibióticos. Sobretudo, tem sido grande a preocupação com a emergência e disseminação de *E. coli* produtora de ESBL associada a bovinos e outros animais de criação (Liebana *et al.*, 2013).

Neste estudo, determinamos o padrão de resistência a antibióticos de cepas de STEC, subgrupo de *E.coli*, isoladas de fezes de bovinos e ovinos de diversas propriedades rurais do sudoeste do estado de Goiás. Nessas fazendas, assim como em diversas outras do mundo inteiro, tipos diferentes de antibióticos estão sendo utilizados para tratar esses animais, principalmente bovinos. Segundo Ibrahim *et al.* (2016), isso contribui para a seleção de cepas que possuem

genes de resistência a antibióticos e transferência horizontal de genes entre diferentes espécies de bactérias. De acordo com os mesmos autores, comparar nosso estudo com outros, não nos daria necessariamente os mesmos padrões de resistência, pois cada região e propriedade tem um regime diferente de gestão em relação ao alojamento dos animais, o tipo de animal, nutrição e tratamentos veterinários, uso de outros antibióticos, descarte dos mesmos etc.

Conclusões

Os subtipos *stx1a* e *stx1c* foram encontrados tanto em fezes de bovinos quanto de ovinos. A combinação simultânea entre tais subtipos esteve presente na maioria das cepas das duas espécies de animais estudadas. Nas STEC de fezes bovinas o *stx2a* e *stx2c* foram os subtipos mais prevalentes, enquanto que na de ovinas, prevaleceram o *stx2b* e a simultaneidade do mesmo com o subtipo *stx2g*. Foi observada simultaneidade entre os subtipos *stx1* e *stx2* em algumas das cepas pesquisadas, fator esse que as tornam muito mais virulentas. Animais adultos possuíram oito vezes mais chances de apresentarem STEC de patogenicidade alta do que os animais jovens. Os resultados obtidos pelo antibiograma demonstram variações no perfil de resistência dos isolados, bem como a ocorrência de amostras com múltiplas resistências nos animais testados, mesmo não havendo diferença significativa entre as espécies de animais. Além disso, foi possível concluir que STEC de patogenicidade alta possuíram três vezes mais chances de serem multirresistentes aos antimicrobianos testados, do que STEC de patogenicidade baixa. Estes resultados apontam a necessidade de se monitorar periodicamente o perfil de susceptibilidade dos microrganismos contidos nas fezes desses animais, visando acompanhar a evolução dos índices de resistência, tendo em vista que estes são considerados fontes de infecção direta e indireta para os seres humanos. Diante disso, bovinos e ovinos pesquisados na região sudoeste do estado de Goiás podem oferecer risco à saúde da população local.

Agradecimentos: A autora agradece a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) e CNPQ por apoiar este estudo.

Referências

ALONSO, C. A.; MORA, A.; DÍAZ, D. *et al.* Occurrence and characterization of stx and/or eae-positive *Escherichia coli* isolated from wildlife, including a typical EPEC strain from a wild boar. *Veterinary Microbiology*, v. 207, p. 69-73, 2017.

BARANZONI, G. M.; FRATAMICO, P. M.; GANGIREDLA, J.; PATEL, I. *et al.* Characterization of Shiga Toxin subtypes and virulence genes in porcine Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, n. 574, p. 1-10, 2016.

BECEIRO, A.; TOMÁS, M.; BOU, G. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? *Clinical microbiology reviews*, v. 26, n. 2, p. 185-230, 2013.

CELLELO, R.; ETCHEVERRÍA, A. I.; DI CONZA, J. A. *et al.* Antibiotic resistance and integrons in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 46, n. 1, p. 1-5, 2015.

CLIMENI, B. S. O.; DELLALIBERA, F. L.; MONTEIRO, M. V.; BAZAN, C. T. PEREIRA, D. M. Cefalosporinas: sua origem, uso e função em animais de grande e pequeno porte. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*. v. 7, n. 12, p. 1-8, 2009.

CLSI. *Performance Standars for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 28 ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.

COURA, F. M.; LAGE, A. P.; HEINEMANN, M. B. Patotipos de *Escherichia coli* causadores de diarreia em bezerros: uma atualização. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 34, n. 9, p. 811-818, 2014.

DOREGIRAE, F.; ALEBOUYEH, M.; FASAEI, B.N. *et al.* Isolation of atypical enteropathogenic and shiga toxin encoding *Escherichia coli* strains from poultry in Tehran, Iran. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. v. 9, n. 1, p. 53-57, 2016.

EKONG, P. S.; SANDERSON, M. W.; CERNICCHIARO, N. Prevalence and concentration of *Escherichia coli* O157 in different seasons and cattle types processed in North America: A systematic review and meta-analysis of published research. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 121, n. 1-2, p. 74-85, 2015.

FARROKH, C.; JORDAN, K.; AUVRAY, F. *et al.* Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *Internacional Journal of food Microbiology*, v. 162, n. 2, p. 190-212, 2013.

FENG, P. C. H.; REDDY, S. Prevalences of Shiga Toxin subtypes and selected other virulence factors among Shiga-Toxigenic *Escherichia coli* strains isolated from fresh produce. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 79, n. 22, p. 6917-6923, 2013.

FRANZ, E.; VAN HOEK, A. H. A. M.; WUITE, M.; VAN DER WAL, F. J.; DE BOER, A. G.; BOUW, E.; AARTS, H. J. M. Molecular Hazard Identification of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC). *Plos one*, v. 10, n. 3, p. 1-21, 2015.

GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. *Guia de antimicrobianos em Veterinária*. Porto Alegre: Artmed, 2010. 267 p.

HOFER, E.; CERNELA, N.; STEPHAN, R. Shiga Toxin subtypes associated with Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* strains isolated from red deer, roe deer, chamois, and ibex. *Foodborne Pathogens And Disease*, v. 9, n. 9, p. 792-795, 2012.

IBRAHIM, D. R.; DODD, C. E. R.; STEKEL, D. J.; RAMSDEN, S. J.; HOBMAN, J. L. Multidrug resistant, extended spectrum β -lactamase (ESBL) - producing *Escherichia coli* isolated from a dairy farm. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 92, n. 4, p. 1-13, 2016.

JAJARMİ, M.; BODOUEI, M. A.; FOOLADI, A. A. I. *et al.* Pathogenic potential of Shiga toxin producing *Escherichia coli* strains of caprine origin: virulence genes, Shiga toxin subtypes, phylogenetic background and clonal relatedness. *BMC Veterinary Research*, v. 14, n. 97, p. 1-8, 2018.

JAJARMİ, M.; FOOLADI, A. A. I.; BADOUEI, M. A. *et al.* Virulence genes, Shiga toxin subtypes, major O-serogroups, and phylogenetic background of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from cattle in Iran. *Microbial Pathogenesis*, v. 109, p. 274-279, 2017.

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

LIEBANA, E.; CARATTOLI, A.; COQUE, T. M.; HASMAN, H.; MAGIORAKOS, A-P.; MEVIUS, D.; PEIXES, L.; POIREL, L.; SCHUEPBACH-REGULA, G.; TORNEKE, K.; TORREN-EDO, J.; TORRES, C.; THRELFALL, J. Public Health Risks of Enterobacterial Isolates Producing Extended-Spectrum β -Lactamases or AmpC β -Lactamases in Food and Food-Producing Animals: An EU Perspective of Epidemiology, Analytical Methods, Risk Factors, and Control Options. *Clinical Infectious Diseases*, v. 56, n. 7, p. 1030-1037, 2013.

LIU, Y-Y.; WANG, Y.; WALSH, T. R.; YI, L-X.; ZHANG, R.; SPENCER, J.; DOI, Y.; TIAN, G.; DONG, B.; HUANG, X.; YU, L-F.; GU, D.; REN, H.; CHEN, X.; LV, L.; HE, D.; ZHOU, H.; LIANG, Z.; LIU, J-H.; SHEN, J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 16, n. 2, p. 161-168, 2016.

MARTINS, F. H.; GUTH, B. E. C.; PIAZZA, R. M.; LEÃO, S. C.; LUDOVICO, A.; LUDOVICO, M. S.; DAHBI, G.; MARZOA, J.; MORA, A.; BLANCO, J.; PELAYO, J. S. Diversity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in sheep flocks of Parana' State, southern Brazil. *Veterinary Microbiology*, v. 175, n. 1, p. 150-156, 2015.

MELTON-CELSA, A. R. Shiga Toxin (Stx) classification, structure, and function. *Microbiol Spectrum*, v. 2, n. 3, p. 1-13, 2014.

MOMTAZ, H.; DEHKORDI, F. S.; TAKTAZ, T.; REZVANI, A.; YARALI, S. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated from Bovine Mastitic Milk: Serogroups, Virulence Factors, and Antibiotic Resistance Properties. *The ScientificWorld Journal*, v. 2012, n. 1, p. 1-9, 2012.

OTERO, V.; SÁNCHEZ, S.; HERRERA-LEÓN, S. *et al.* Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in bulk tank ewes milk and sheep farm environment. *Small Ruminant Research*, v. 154, p. 110-114, 2017.

PEREIRA, M. C. S.; RIGUEIRO, A. L. N.; ONO, R. K. *et al.* Evaluation of antimicrobial resistance patterns in *Escherichia coli* strains, carriers or not carriers of stx1, stx2 and eae genes. *Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais*, v. 12, n. 4, p. 270-276, 2014.

POPOVA, R.; SIRAKOV, I.; ALEXANDAR, I. *et al.* Subtyping of Stx and 16s rRNA gene analysis of some Bulgarian ShigaToxin Producing *Escherichia coli* Isolates. *Acta Microbiologica Bulgarica*, v. 33, n. 1, p. 17-23, 2017.

RUSSO, L. M.; MELTON-CELSA, A. R.; SMITH, M. J.; O'BRIEN, A. D. Comparisons of Native Shiga Toxins (Stxs) Type 1 and 2 with Chimeric Toxins Indicate that the Source of the Binding Subunit Dictates Degree of Toxicity. *Plos one*, v. 9, n. 3, p. e93463- e93463, 2014.

SCHEUTZ, F.; TEEL, L. D.; BEUTIN, L. *et al.* Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga Toxins and standardizing stx nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 50, n. 9, p. 2951-2963, 2012.

SHAHEEN, B.W.; BOOTHE, D. M.; OYARZABAL, O. A.; SMAHA, T. Antimicrobial Resistance Profiles and Clonal Relatedness of Canine and Feline *Escherichia coli* Pathogens Expressing Multidrug Resistance in the United States. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 24, n. 1, p. 323-330, 2010.

SKINNER, C.; PATFIELD, S.; STANKER, L. H. *et al.* New high-affinity monoclonal antibodies against Shiga Toxin 1 facilitate the detection of hybrid Stx1/Stx2 in vivo. *Plos one*, v. 9, n. 6, p. 1-10, 2014.

TAGHADOSI, R.; SHAKIBAIE, M. R.; ALIZADE, H. *et al.* Serogroups, subtypes and virulence factors of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from human, calves and goats in Kerman, Iran. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, v. 11, n. 1, p. 60-67, 2018.

VERSTRAETE, K.; COILLIE, E.V.; WERBROUCK, H. *et al.* A qPCR assay to detect and quantify Shiga Toxin-Producing *E. coli* (STEC) in cattle and on farms: a potential predictive tool for Stec culture-positive farms. *Toxins*, v. 6, n. 1, p. 1201-1221, 2014.

YANG, R.; ABRAHAM, S.; GARDNER, G. E. *et al.* Prevalence and pathogen load of *Campylobacter* spp., *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157/O145serogroup in sheep faeces collected at sale yards and in abattoir effluent in Western Australia. *Australian Veterinary Journal*, v. 95, n. 5, p. 143-148, 2017.

YU, X.; TANG, X.; ZUO, J.; ZHANG, M.; CHEN, L.; LI, Z. Distribution and persistence of cephalosporins in cephalosporin producing wastewater using SPE and UPLC–MS/MS method. *Science of the Total Environment*, v. 569-570, p. 23-30, 2016.

3. CONCLUSÕES GERAIS

Os subtipos *stx1a* e *stx1c* foram encontrados tanto em fezes de bovinos quanto de ovinos. A combinação simultânea entre tais subtipos esteve presente na maioria das cepas das duas espécies de animais estudadas. Nas STEC de fezes bovinas o *stx2a* e *stx2c* foram os subtipos mais prevalentes, enquanto que na de ovinas, prevaleceram o *stx2b* e a simultaneidade do mesmo com o subtipo *stx2g*. Foi observada simultaneidade entre os subtipos *stx1* e *stx2* em algumas das cepas pesquisadas, fator esse que as tornam muito mais virulentas. Animais adultos possuíram oito vezes mais chances de apresentarem STEC de patogenicidade alta do que os animais jovens. Os resultados obtidos pelo antibiograma demonstram variações no perfil de resistência dos isolados, bem como a ocorrência de amostras com múltiplas resistências nos animais testados, mesmo não havendo diferença significativa entre as espécies de animais. Além disso, foi possível concluir que STEC de patogenicidade alta possuíram três vezes mais chances de serem multirresistentes aos antimicrobianos testados, do que STEC de patogenicidade baixa. Estes resultados apontam a necessidade de se monitorar periodicamente o perfil de susceptibilidade dos microrganismos contidos nas fezes desses animais, visando acompanhar a evolução dos índices de resistência, tendo em vista que estes são considerados fontes de infecção direta e indireta para os seres humanos. Diante disso, bovinos e ovinos pesquisados na região sudoeste do estado de Goiás podem oferecer risco à saúde da população local.

ANEXO 1. NORMAS DE ELABORAÇÃO DE ARTIGO DO ARQUIVO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Tipos de artigos aceitos para publicação

Artigo científico

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na "Title Page" – Step 6), Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas, figuras e Referências.

O número de Referências não deve exceder a 30.

Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal.

Formatação do texto

- O texto **NÃO** deve conter subitens em nenhuma das seções do artigo, deve ser apresentado em arquivo Microsoft Word e anexado como "Main Document" (Step 6), no formato A4, com margem de 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), na fonte Times New Roman, no tamanho 12 e no espaçamento de entrelinhas 1,5, em todas as páginas e seções do artigo (do título às referências), **com linhas numeradas**.

Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

Seções de um artigo

Título: Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 50 palavras.

Autores e Filiação: Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a qual pertencem. O autor e o seu e-mail para correspondência devem ser indicados com asterisco somente no "Title Page" (Step 6), em arquivo Word.

Resumo e Abstract: Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título e não acrescentar revisão de

literatura. Incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação completa.

Palavras-chave e Keywords: No máximo cinco e no mínimo duas*. * na submissão usar somente o Keyword (Step 2) e no corpo do artigo constar tanto keyword (inglês) quanto palavra-chave (português), independente do idioma em que o artigo for submetido.

Introdução: Explicação concisa na qual os problemas serão estabelecidos, bem como a pertinência, a relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, o suficiente para balizá-la.

Material e Métodos: Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Nos trabalhos que envolvam animais e/ou organismos geneticamente modificados **deverão constar obrigatoriamente o número do Certificado de Aprovação do CEUA**. (verificar o Item Comitê de Ética).

Resultados: Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.

Tabela. Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. O título da tabela recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Tabela 1.). No texto, a tabela deve ser referida como Tab seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Tab. 1), mesmo quando referir-se a várias tabelas (ex.: Tab. 1, 2 e 3). Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (o menor tamanho aceito é oito). A legenda da Tabela deve conter apenas o indispensável para o seu entendimento. As tabelas devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação.

Figura. Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é citada no texto como Fig seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Fig.1), mesmo se citar mais de uma figura (ex.: Fig. 1, 2 e 3). Além de inseridas no corpo do texto, fotografias e desenhos devem também ser enviados no formato JPG com alta qualidade, em um arquivo zipado, anexado no campo próprio de submissão, na tela de registro do artigo. As figuras devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação.

Nota: Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.

Discussão: Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer uma das partes).

Conclusões: As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada e serem apresentadas de forma objetiva, **SEM** revisão de literatura, discussão, repetição de resultados e especulações.

Agradecimentos: Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.

Referências: As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, dando-se preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. Livros e teses devem ser referenciados o mínimo possível, portanto, somente quando indispensáveis. São adotadas as normas gerais da ABNT, **adaptadas** para o ABMVZ, conforme exemplos:

Como referenciar:

1. Citações no texto

A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

- autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88);
- dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974);
- mais de dois autores: (Ferguson *et al.*, 1979) ou Ferguson *et al.* (1979);
- mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson *et al.* (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson *et al.*, 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

Citação de citação. Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão **citado por** e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências deve-se incluir apenas a fonte consultada.

Comunicação pessoal. Não faz parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

2. Periódicos (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

3. Publicação avulsa (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

4. Documentos eletrônicos (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.