

PESQUISA DE GENES DE RESISTÊNCIA EM ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS DE HORTALIÇAS *in natura*

Max Sullivan Fontes¹, Mateus Rodrigues Alves², Mariana Fabri Lima¹, Juliana Alves Resende^{1, 2}, Mariana Drummond Costa Ignachiti¹.

¹Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, Departamento de Farmácia e Nutrição/CCENS, Av. Alto Universitário, s/n, Guararema - 29.500-000 – Alegre – ES, Brasil, max.s.fontes@gmail.com, mariana.fabri@outlook.com, marianadci@gmail.com.

²Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Centro de Ciências Agrárias e Engenharias (CCAIE), Alegre – ES, Brasil. mateusrodriguesalves002@gmail.com, juliana.resende@ufes.br.

Resumo

A pesquisa de genes de resistência em enterobactérias isoladas de hortaliças permite identificar os riscos associados ao consumo desses alimentos, uma vez que esses genes podem ser transferidos para a microbiota intestinal, dificultando o tratamento de infecções e propagando a resistência aos antimicrobianos. Diante disso, este trabalho objetivou identificar e caracterizar a presença de genes de resistência a antimicrobianos em enterobactérias sugestivas de *Escherichia coli* obtidas de amostras de hortaliças *in natura* comercializadas no município de Alegre/ES. Os genes de resistência (*tet(A)*, *ampC* e *blaTEM*) foram pesquisados por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando primers específicos. No total, 47 isolados bacterianos foram avaliados. Desses, 26 (55,32%) apresentaram pelo menos um dos genes de resistência. A detecção de bactérias resistentes em hortaliças destaca os riscos sanitários associados ao consumo desses alimentos e evidencia a importância de monitorar e controlar a disseminação desses genes no ambiente, além de promover discussões sobre a utilização racional de antimicrobianos.

Palavras-chave: Qualidade Microbiológica, Resistência antimicrobiana, PCR.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas.

Introdução

O consumo de hortaliças *in natura* cresceu consideravelmente no Brasil, impulsionado pela demanda por uma alimentação saudável. No entanto, a segurança microbiológica desses alimentos é uma preocupação crescente, visto que são consumidas cruas e, portanto, não passam por processos de cozimento que promovem a eliminação de microrganismos deterioradores e patogênicos (Sant'anna; de Melo Franco; Maffei, 2020; Furtado, 2021).

O aumento de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) causadas por microrganismos patogênicos, como *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* patogênica, tem sido relacionado ao consumo de alimentos frescos. A ocorrência desses microrganismos ressalta estes alimentos como fontes potenciais de bactérias patogênicas (Zhang *et al.*, 2020).

Os antimicrobianos são substâncias usadas para inibir o crescimento ou eliminar microrganismos, utilizados no tratamento e prevenção de infecções. Além disso, são amplamente empregados na agricultura e produção animal. Contudo, o uso irracional em práticas humanas, animais e agrícolas levou ao aumento da resistência aos antimicrobianos (RAM) e a disseminação de genes de resistência a antimicrobianos (GRA) (Silva *et al.*, 2023; Van Boeckel *et al.*, 2015).

A RAM é uma ameaça grave à saúde pública. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), essa resistência representa uma das maiores ameaças globais à saúde pública global. Em 2019, a RAM foi responsável por aproximadamente 1,27 milhões de mortes no mundo e pode resultar custos altos à saúde até 2050 (Kim *et al.*, 2021; Who, 2021).

A presença de GRA em alimentos consumidos frescos tem sido relatada, com variações significativas na prevalência entre países desenvolvidos e países em desenvolvimento. Em países como Bangladesh, Índia e Paquistão, a prevalência de *E. coli* em amostras de vegetais crus vendidos em mercados de varejo é alta, enquanto nos EUA e na Alemanha a prevalência é menor (Rahman *et al.*, 2022).

E. coli é uma bactéria Gram-negativa, pertencente à família Enterobacteriaceae e um microrganismo comensal, frequentemente liberado no ambiente por meio de fezes de animais de sangue quente ou efluentes. A *E. coli* tem sido amplamente estudada devido à sua relevância para saúde pública e nos últimos anos, devido à preocupação crescente com a resistência aos antimicrobianos, fazendo desta espécie bacteriana um importante foco de estudo (Silva *et al.*, 2023; Fingler; Dudley, 2016; Geurtse *et al.*, 2022).

Desta forma, este trabalho objetivou identificar e caracterizar a presença de GRA em isolados de enterobactérias sugestivas de *E. coli* em amostras de hortaliças *in natura* comercializadas no município de Alegre- ES.

Metodologia

Neste estudo, foram avaliadas 47 isolados bacterianos. Os isolados foram obtidos de amostras de alface (n=12) adquiridas comercialmente. As amostras de alface foram processadas para isolamento seletivo em Petrifilm™ (Petrifilm™ EC 6404, 3M™). Em seguida, os isolados bacterianos (n=47) foram bioquimicamente identificados.

Para a obtenção de DNA genômico, os isolados foram cultivados em ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) por 24h a 35°C. A seguir, uma colônia isolada foi coletada e diluída em 1 mL de solução salina e, posteriormente, utilizada para a extração de DNA genômico total, usando-se o Kit de extração comercial (QIAamp DNA Mini Kit), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA foi quantificado e diluído para a concentração de 10 µg/µL em água livre de RNAase, em volume final de 50 µL. A concentração, a integridade e a pureza do DNA foram determinadas antes das reações. O DNA foi estocado em freezer a -20°C, para posteriormente ser usado como DNA molde em reações em cadeia da polimerase (PCR).

As análises por PCR foram realizadas utilizando primers específicos para amplificação dos genes que codificam resistência às tetraciclinas - *tet(A)* (Ng *et al.*, 2001) e beta-lactâmicos - *blaTEM* (Jones *et al.*, 2009) e *ampC* (Odeh *et al.*, 2002). As reações foram realizadas em termociclador automatizado (Dlab, TC1000-G). As reações de PCR foram realizadas em volume final de 14µL, contendo 2µL de PCR Master Mix, 2µL de DNA, 8µL de água ultrapura, diluído juntamente com 1 µL de primer F, 1 µL Primer R (Tabela 1).

Tabela 1. Primers específicos utilizados para amplificação dos genes de resistência, sequências e tamanhos dos fragmentos esperados

Primers	Sequencia (5' – 3')	Amplicon (pb)
<i>tet(A)</i> F	5'- GCT ACA TCC TGGC TTG CCT TC	210
<i>tet(A)</i> R	5'- CAT AGA TCG CCG TGA AGA GG	
<i>ampC</i> F	5'-ATA ACC ACC CAG TCA CGC	630
<i>ampC</i> R	5'-CAG TAG CGA GAC TGC GCA	
<i>blaTEM</i> F	5'-GTG CGC GGA ACC CCT ATT	968
<i>blaTEM</i> R	5'-TTA CCA ATG CTT AAT CAG TGA GGC	

Fonte: Adaptado de Ng *et al.* (2001), Odeh *et al.* (2002), Jones *et al.* (2009).

Os amplicons foram visualizados em foto documentador (Gel Doc™ XR+, Bio-Rad), após eletroforese (80v, 500mA, 150W a 45min) em gel de agarose 1.5% e corados com corante não mutagênico SaferDye (Kasvi). Como marcador de peso molecular foi utilizado DNA ladder 100 pb (Kasvi). Para o controle negativo foram realizadas reações com água ultrapura. Como controle positivo foram utilizadas amostras da coleção do Grupo Aplicado à Microbiologia (GrAM) alocado no Laboratório de Análises Clínicas (LAC) da UFES – Campus Alegre.

Resultados

Dos 47 isolados bacterianos avaliados 26 (55,32%) apresentaram algum dos marcadores de resistência investigados. O gene *tet(A)* não foi detectado em nenhum dos isolados avaliados, 25 (53,19%) foram positivas para o gene *ampC*, e 1 (2,13%) apresentou o marcador de resistência

blaTEM. Esses resultados revelam a presença de gene de resistência para β -lactâmicos nos isolados bacterianos obtidos de amostras de hortaliças (Tabela 2).

Tabela 2- Frequência de detecção dos genes de resistência a drogas antimicrobianas em isolados sugestivos de *Escherichia coli* em amostras de alface

Gene	Frequência de detecção (%)	Total (n=47)
<i>ampC</i>	53,19	25
<i>blaTEM</i>	2,13	1

Genes: *ampC* e *blaTEM* – resistência aos beta-lactâmicos
Fonte: Autores (2024).

Discussão

Neste estudo, foram avaliadas 47 isolados de enterobactérias sugestivas de *E. coli* provenientes de hortaliças *in natura* comercializadas no município de Alegre- ES. O gene *blaTEM* foi detectado em 2,13% (1/47) e *ampC* em 53,19% dos isolados (25/47), sendo o mais prevalente. Em contraste, o gene *tet(A)* não foi detectado nos isolados avaliados.

A ocorrência relevante do gene *ampC* (53,19%) corrobora com a literatura que sugere uma ampla disseminação de genes de beta-lactamases em *E. coli* provenientes de vegetais crus (Rahman *et al.*, 2022). Richter *et al.* (2019) identificaram genes que codificam beta-lactamases em 75,3% das amostras de vegetais contaminados com Enterobacteriaceae, principalmente em *E. coli*. Estudos conduzidos por Cerqueira *et al.* (2019) também relataram a presença de genes de beta-lactamases, como *ampC* e *blaTEM*, frequentemente associada à resistência a múltiplas classes de antimicrobianos, incluindo cefalosporinas e outros beta-lactâmicos. Pleva, *et al* (2021) observou que 13,9% (15/108) dos isolados de *E. coli* em amostras de vegetais crus foram positivos para um ou vários GRA, incluindo *tet(A)* e *blaTEM*.

A presença de genes como *ampC* e *blaTEM* em *E. coli* vegetais crus consumidos pela população tem implicações sérias para a saúde pública. Esses genes, que conferem resistência a antimicrobianos amplamente utilizados, podem ser transferidos para a microbiota intestinal humana e animal através do consumo de alimentos contaminados. Essa transferência pode dificultar o tratamento de infecções bacterianas subsequentes, uma vez que os patógenos portadores desses GRA podem não responder adequadamente aos tratamentos com beta-lactâmicos e outros antimicrobianos (Cerqueira *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2023).

Conclusão

Os resultados indicam a ocorrência significativa dos genes *blaTEM* e *ampC* em isolados sugestivos de *E. coli* em amostras de alface, evidenciando a necessidade de monitoração e controle na disseminação de GRA. A prevalência significativa de GRA reforça a urgência de práticas adequadas de controle na produção e manipulação de alimentos *in natura* e práticas agrícolas, bem como uma utilização racional de antimicrobianos na medicina humana e animal.

Referências

- CERQUEIRA, F. *et al.* Antibiotic resistance gene distribution in agricultural fields and crops. A soil-to-food analysis. **Environmental Research**, v. 177, p. 1-9, 2019.
- FINGLER, H. M; DUDLEY, E. G. The interplay of *Escherichia coli* O157:H7 and commensal *E. coli*: the importance of strain-level identification. **Expert Review of Gastroenterology Hepatol**, v. 10, n. 4, p. 415-417. 2016.
- FURTADO, A. A. L. **Tratamento Térmico**. 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/tematicas/tecnologia-de-alimentos/processos/tipos-de-processos/tratamento->

