



## EDIÇÃO 2023 – RESUMO EXPANDIDO

### PREVALÊNCIA DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM *Escherichia coli* ISOLADAS DE PACIENTES COM GASTROENTERITES

### PREVALENCE OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN *Escherichia coli* ISOLATED FROM PATIENTS WITH GASTROENTERITIS

Leandro Augusto Mariano Silva<sup>I</sup>  
Vitória Vaciloto e Gonçalves<sup>II</sup>  
Marita Vedovelli Cardozo<sup>III</sup>

#### RESUMO

O foco do estudo é evidenciar a prevalência dos fatores genotípicos e fenotípicos que provocam a resistência das bactérias isoladas em pacientes com gastroenterites, a partir da extração do DNA, detecção de genes de resistência e pelo Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos (TSA). Foram analisadas 40 amostras, das quais 7,5% apresentaram positividade para os genes CTX-M-1 e CTX-M-2. Em relação ao TSA, 100% das amostras foram resistentes à Tetraciclina, à Gentamicina e à Ciprofloxacina; 97,5% resistentes à Cefotaxima, 92,5% resistentes à Ampicilina e 75% resistentes à Amoxicilina com Ácido Clavulânico. Mesmo com a presença de um elevado índice de resistência, observou-se casos de sensibilidade de algumas amostras. Os resultados encontrados evidenciam o quadro alarmante de resistência aos antimicrobianos, sendo assim, a sociedade deve repensar seus hábitos frente ao consumo de fármacos, o que caracteriza uma alternativa viável para evitar o surgimento de novas bactérias multirresistentes.

**Palavras-chave:** Antimicrobianos. Genes. Trato Gastrointestinal.

#### ABSTRACT

The focus of this study is to highlight the prevalence of genotypic and phenotypic factors that cause resistance in isolated bacteria from gastroenteritis patients. This is achieved by extracting DNA, detecting resistance genes, and performing Antimicrobial Susceptibility Testing (AST). A total of 40 samples were analyzed, of which 7.5% tested positive for the CTX-M-1 and CTX-M-2 genes. Regarding AST, 100% of the samples were resistant to Tetracycline, Gentamicin, and Ciprofloxacin; 97.5% were resistant to Cefotaxime, 92.5% were resistant to Ampicillin, and 75% were resistant to Amoxicillin with Clavulanic Acid. Despite a high resistance index, cases of sensitivity in some samples were observed. The findings underscore the alarming state of antimicrobial resistance. Therefore, society should reconsider its habits regarding drug

<sup>I</sup> Mestrando em Microbiologia Agropecuária, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP, Brasil. E-mail: leandro.am.silva@unesp.br

<sup>II</sup> Graduada em Biomedicina, Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG), Unidade de Passos, Passos, MG, Brasil. E-mail: vitoriagoncalvesvg72@gmail.com

<sup>III</sup> Professora Dra., Laboratório de Fisiologia de Microrganismos, Departamento de Ciências Biomédicas e Saúde, Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG), Unidade de Passos, Passos, MG, Brasil. E-mail: marita.cardozo@uemg.br



## EDIÇÃO 2023 – RESUMO EXPANDIDO

consumption, which presents a viable alternative to prevent the emergence of new multi-resistant bacteria.

**Keywords:** Antimicrobials. Genes. Gastrointestinal tract.

**Área:** Ciências Ambientais, Biológicas e Agrárias

Data de submissão: 31/08/2023.

Data de aprovação: 03/10/2023.

DOI:

### 1 INTRODUÇÃO

A gastroenterite é uma doença com destaque no cenário mundial, devido ao seu elevado número de mortes anualmente, principalmente em crianças. Os patógenos responsáveis por ocasionar a doença são, na maioria das vezes, bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae (SATTAR; SINGH; 2023). O tratamento consiste em prevenir e corrigir a desidratação, além do uso de fármacos responsáveis por amenizar os sintomas, e em casos graves, o uso de antimicrobianos é recomendado (BRANDT; ANTUNES; DA SILVA; 2015).

Os antimicrobianos são fármacos utilizados há mais de dois mil anos. Porém, após o ápice na descoberta de diversos compostos, se instaurou uma fase de declínio, sem o surgimento de novas moléculas, o que favorece a bactéria a adquirir resistência aos fármacos existentes (HUTCHINGS et al., 2019).

A resistência aos antimicrobianos (RAM) é um mecanismo cujo qual a bactéria adquire ao longo do tempo, e que permite, dentre alternativas, a modificação genética do microrganismo, sendo capaz de comprometer a resposta terapêutica do fármaco mediante as infecções. É notório que a RAM se encontra em estado emergente em todo o mundo, e por essa razão os patógenos têm se tornado alvo de estudos, e a característica mais encontrada pelos pesquisadores é a presença de enzimas  $\beta$ -lactamases de Espectro Estendido (ESBLs), codificadas a partir de genes presentes no material genético de bactérias Gram-negativas. (CHRISTAKI; MARCOU; TOFARIDES; 2019)

Visto que as doenças bacterianas são capazes de se propagar com facilidade e apresentam certa dificuldade em sua terapêutica, devido à resistência adquirida pelos patógenos ao longo do tempo, este estudo é relevante e teve o objetivo de evidenciar o perfil genotípico e fenotípico de resistência em isolados de pacientes que foram hospitalizados devido ao quadro de gastroenterite.

### 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

No quadro de gastroenterite bacteriana, os principais causadores são da família Enterobacteriaceae, que inclui: *Campylobacter*, *Salmonella* spp., *Shigella* e *Escherichia coli*. O mecanismo de ação dessas bactérias dentro do trato gastrointestinal consiste na aderência dos patógenos às mucosas - como é o caso das *Campylobacter jejuni* e *Salmonella* spp. - que invadem o revestimento dos intestinos grosso e delgado, e atuam na formação de biofilme e liberação de toxinas, respectivamente (ELLIOT, 2007).



## EDIÇÃO 2023 – RESUMO EXPANDIDO

A inserção dos antimicrobianos na rotina clínica contribuiu positivamente para o controle dos patógenos que acometem a população. O desenvolvimento de medicamentos sintéticos utilizados em doenças bacterianas se iniciou em 1910, com o Salvarsan. Houve um período de suma importância para a microbiologia, sendo conhecido como Idade de Ouro, que durou de 1940 a 1960, e foi marcado pelo desenvolvimento da maioria dos antimicrobianos que ainda são utilizados na clínica. Passados os anos, iniciou-se um período de declínio nas descobertas de novas classes de fármacos, o que contribuiu para o processo de resistência bacteriana, além do uso indiscriminado por parte da população, seja para consumo próprio ou para os animais, sendo utilizados como promotores de crescimento (TORRES; DREHER; SIMIONI; 2015).

### 3 METODOLOGIA DA PESQUISA

Foram utilizadas ao todo 40 amostras provenientes de culturas de pacientes com quadro de gastroenterite da cidade de Jaboticabal – SP, em que foram previamente identificados *Escherichia coli* em todas as amostras. O DNA microbiano foi extraído segundo a técnica proposta por KESKIMAKI et al. (2001) com pequenas modificações. Ao final do processo de extração, o DNA foi submetido à técnica de PCR, na qual foi utilizado o programa de acordo com a temperatura de anelamento de cada primer respectivo aos genes analisados (CTX-M-1, CTX-M-2, CMY-1, CMY-2, MCR-1 e MCR-2). Por fim, os produtos obtidos na amplificação foram visualizados por exposição do gel em luz UV e fotografados.

Para o teste fenotípico, foi realizado o método de disco difusão estabelecido por Bauer et al. (1966), no qual foram utilizados nas placas os discos contendo os princípios ativos de antimicrobianos selecionados, sendo eles: Amoxicilina + Ácido Clavulânico (30µg), Ampicilina (10µg), Cefotaxima (30µg), Ciprofloxacina (5µg), Gentamicina (10µg), Tetraciclina (30µg). As placas foram incubadas por 18 horas em estufa a 37°C, e em seguida, os halos de inibição formados foram medidos e as cepas foram classificadas como sensíveis, resistentes ou de sensibilidade intermediária para o respectivo princípio ativo, utilizando os parâmetros adotados pelo *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2023).

### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação à presença de genes de resistência, do total de amostras, três (7,5%) apresentaram positividade para dois dos genes relacionados à ESBLs, sendo eles CTX-M-1 e CTX-M-2, responsáveis por codificar as ESBLs, que atuam na hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico dos antimicrobianos da classe das Cefalosporinas, o que os torna ineficazes ao tratamento, pois as enzimas garantem resistência às bactérias. Sobre os demais genes analisados, CMY-1 e CMY-2 que garantem resistência à classe das penicilinas e ainda às cefalosporinas de terceira geração; MCR-1 e MCR-2 - genes de resistência à colistina, não foram detectados nas amostras analisadas, o que vai ao encontro da literatura, que destaca a baixa prevalência mundial de ambos os genes.

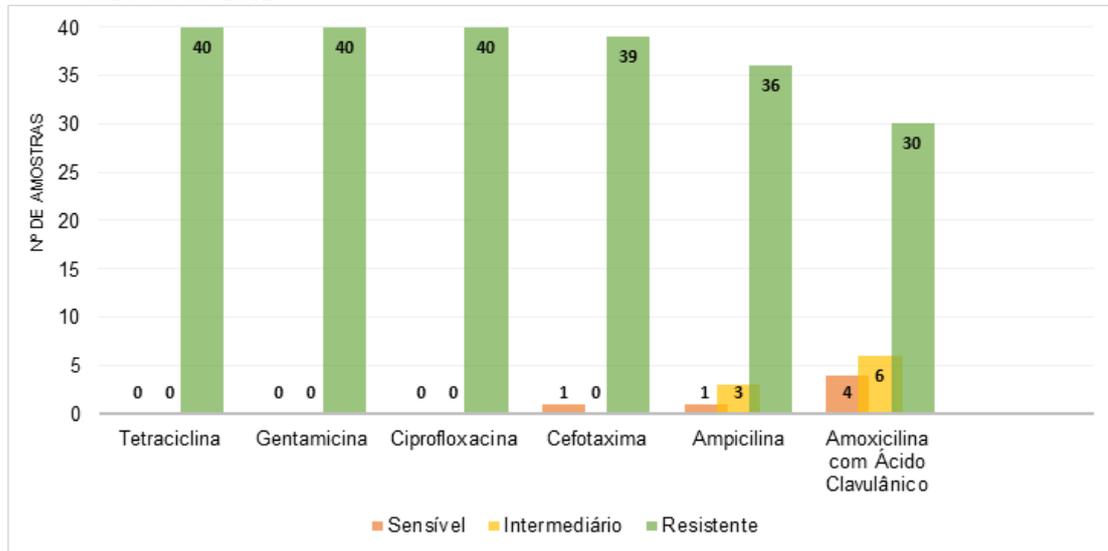
A respeito do TSA, das 40 amostras analisadas, 100% foram resistentes à Tetraciclina, à Gentamicina e à Ciprofloxacina, 39 (97,5%) resistentes à Cefotaxima, 36 (90%) resistentes à Ampicilina, 30 (75%) resistentes à Amoxicilina com Ácido Clavulânico. Ainda, 3 amostras (7,5%) apresentaram resultados intermediários à Ampicilina e 6 (15%) à Amoxicilina com



## EDIÇÃO 2023 – RESUMO EXPANDIDO

Ácido Clavulânico. Sobre as amostras sensíveis, observou-se que 1 (2,5%) foi sensível à Cefotaxima, 1 (2,5%) foi sensível à Ampicilina e 4 (10%) foram sensíveis à Amoxicilina com Ácido Clavulânico, conforme está detalhado no Gráfico 1.

**Gráfico 1 - Perfil fenotípico de resistência aos antimicrobianos das amostras de *Escherichia coli* realizado através do TSA**



Fonte: autoria própria, 2023.

Ainda sobre o atual estudo, é relevante destacar que houve 100% de resistência bacteriana aos seguintes antimicrobianos: Tetraciclina, Gentamicina e Ciprofloxacina, que atuam diretamente na inibição da síntese proteica bacteriana, alteração da permeabilidade da membrana celular e alteração da função e estrutura do DNA bacteriano, respectivamente (KLEIN, 2022). Tendo em vista o mecanismo de ação dos antimicrobianos, e correlacionando com os dados obtidos dos isolados analisados, é possível afirmar que os fármacos apresentaram falhas ao longo da sua atividade.

Em relação aos fármacos utilizados no TSA, se destaca o Ácido Clavulânico, um inibidor de  $\beta$ -lactamase (MARTINS, 2019). Como ele inativa as enzimas, quando associado a outros antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos no TSA, permite concluir se há a presença ou não da resistência bacteriana, além de indicar qual o mecanismo de resistência existente, sendo assim considerado um teste padrão do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (MACEDO *et al.*, 2005). Com isso, analisando o presente estudo, pode-se afirmar que das 40 amostras, 4 delas (10%) apresentam resistência bacteriana do tipo  $\beta$ -lactamase, uma vez que elas foram resistentes aos  $\beta$ -lactâmicos sem Ácido Clavulânico na composição e se apresentaram sensíveis à Amoxicilina com Ácido Clavulânico.

## 5 CONCLUSÃO

Evidenciou-se que a resistência bacteriana tem se tornado cada vez mais preocupante, visto que a sua incidência em todo o mundo está aumentando. Frente a isso, a sociedade deve se alertar aos hábitos frequentes relacionados ao uso indiscriminado de antimicrobianos, para



## EDIÇÃO 2023 – RESUMO EXPANDIDO

que possa ter o controle e redução da disseminação de resistência. Além disso, fica demonstrado a importância de se realizar o TSA, para que sejam identificados os patógenos corretos e com isso a escolha da terapêutica seja implementada de maneira eficaz. Com essas ações, o surgimento de novas bactérias multirresistentes podem ser evitado.

### REFERÊNCIAS

- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.
- BRANDT, K. G.; ANTUNES, M. M. C.; SILVA, G. A. P. Diarreia aguda: manejo baseado em evidências. **Journal of Pediatrics**, v. 91, n. 6, p. 36-43, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021755715001205?via%3Dihub>. Acesso em: 20 ago. 2023.
- CHRISTAKI, E.; MARCOU, M.; TOFARIDES, A. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. **Journal of Molecular Evolution**, v. 88, p. 26-40, 2019. Disponível em: <https://sci-hub.se/https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00239-019-09914-3>. Acesso em: 19 ago. 2023.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 33th ed. **CLSI Supplement M100**. 33rd ed. Pennsylvania: Wayne, 2023.
- ELLIOT, E. J. Acute gastroenteritis in children. **BJM**, v. 334, p.35-40, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1764079/>. Acesso em: 01 ago. 2023.
- HUTCHINGS, M.I., TRUMAN, A.W., WALKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. **Current Opinion in Microbiology**, v.51, p. 72-80, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527419300190?via%3Dihub#fig0005>. Acesso em: 13 nov. 2022.
- KESKIMAKI, M; EKLUND, M; PESONEN, H; HEISKANEN, T; SIITONEN, A; EPEC, EAEC and STEC in stool specimens: prevalence and molecular epidemiology of isolates. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 40, n. 4, p. 151-156, 2001.
- KLEIN, T. C. R. **Bactérias Multirresistentes em um hospital do Sul do Brasil: estudo transversal analítico de 2012 a 2019**. 2022. Tese (Doutorado em Enfermagem) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Florianópolis, 2022. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/231238/PNFR1231-T.pdf?sequence=-1&isAllowed=y>. Acesso em: 13 jan. 2023.



### EDIÇÃO 2023 – RESUMO EXPANDIDO

MACEDO, M.L.A.P., CARTAXO, R.S., ALMEIDA, T. C. C., *et al.* **Mecanismos de resistência e detecção das beta-lactamases.** Unopar Científica, Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina, vol.7, n.1, p. 59-63, 2005.

MARTINS, A. S. **Teste rápido de susceptibilidade aos antimicrobianos pelo método de disco difusão direto do frasco de hemocultura, usando os pontos de corte estabelecidos pelo EUCAST.** 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019. Disponível em: [https://bdigital.ufrgs.br/bitstream/10284/4412/1/PPG\\_21378.pdf](https://bdigital.ufrgs.br/bitstream/10284/4412/1/PPG_21378.pdf). Acesso em: 14 jan. 2023.

SATTAR, S. B. A.; SINGH, S. Bacterial Gastroenteritis. **StatPearls [Internet]**, Treasure Island (FL), 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513295/>. Acesso em: 02 nov. 2022.

TORRES, R. N. S., DREHER, A., SIMIONI, T. A. Uso de antibióticos como promotor de crescimento e seus possíveis substitutos ao seu uso em frangos de corte: aditivos, alternativas, crescimento. **Nutritime Revista Eletrônica**, v. 12, n. 6, 2015. Disponível em: <https://www.nutritime.com.br/site/wp-content/uploads/2020/02/Artigo-336.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2022.