



PRIMEIRO ESTUDO DE *Staphylococcus* spp. E *Escherichia coli* EM PEIXE-BOI-DA-AMAZÔNIA

Isadora Maria Soares de Melo^{1*}, Thayanne Gabryelle Viana de Souza², Jordana Almeida Santana², Rafael Gariglio Clark Xavier², Victor Santos do Amarante², Guilherme Campos Tavares³ e Rodrigo Otávio Silveira Silva³.

¹Discente no Curso de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte/MG – Brasil – *Contato: isamel2740@gmail.com

²Discente no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte/MG – Brasil

³Docente do Curso de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte/MG – Brasil

INTRODUÇÃO

Os peixes-bois são mamíferos aquáticos herbívoros pertencentes ao gênero *Trichechus*. No Brasil, é possível encontrar duas espécies desse animal: o peixe-boi-marinho (*Trichechus manatus*) e o peixe-boi-da-amazônia (*Trichechus inunguis*). Esses mamíferos são considerados "vulnerável" pela *International Union for Conservation of Nature* (IUCN). Além disso, segundo a portaria nº 444/2014 do Ministério do Meio Ambiente (MMA) a espécie *Trichechus inunguis* é classificada como vulnerável, enquanto *Trichechus manatus* encontra-se na categoria 'em perigo'. Dessa forma, o estudo das doenças infecciosas nesses animais é de extrema importância para a sua conservação, porém, há poucos estudos na literatura sobre patógenos ou microrganismos comensais presentes nos peixes-bois-da-amazônia^{1,2,3}.

Escherichia coli é uma bactéria gram-negativa encontrada na microbiota de diversas espécies domésticas e silvestres⁴. É um microrganismo comensal, podendo ser uma bactéria oportunista e sua patogenicidade depende da presença de determinados fatores de virulência. As estirpes capazes de provocar infecções entéricas são chamadas de *E. coli* diarréio-gênicas. Duas delas destacam-se pelo comum envolvimento em quadros em humanos e animais: *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC) e *E. coli* enteropatogênicas (EPEC)^{5,6}. O gênero *Staphylococcus* é constituído por cocos gram-positivos comensais e oportunistas. Essas bactérias são capazes de ocasionar infecções em humanos e animais, como dermatite, infecções urinárias, pneumonia, entre outros^{7,8}.

Ambos microrganismos são encontrados em animais silvestres, que podem atuar como reservatórios e possibilitar a transferência horizontal de genes de resistência a antimicrobianos. Ademais, a pressão provocada pelo uso exacerbado desses medicamentos nos serviços de saúde, juntamente com ações antropogênicas, tem possibilitado a ocorrência de organismos cada vez mais resistentes. Diante disso, tem-se um grande problema para a saúde única^{8,9,10}. Apesar dessa importância, sabe-se pouco sobre o papel de diversos animais silvestres na epidemiologia desses patógenos.

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a frequência, distribuição e padrões de suscetibilidade antimicrobiana de *E. coli* e *Staphylococcus* sp. isolados de peixes-bois-da-amazônia (*Trichechus inunguis*) coletados pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) no estado da Amazônia.

METODOLOGIA

Neste estudo foram utilizados 44 peixes-bois-da-amazônia, divididos entre filhotes (21/44 – 47,7%), animais jovens (14/44 – 31,8%) e adultos (9/44 – 20,4%), sendo majoritariamente de fêmeas. Um total de 76 amostras de suabes nasais e retais foram coletadas. Para realizar a coleta das amostras, os peixes-bois foram contidos fisicamente e colocados sobre um colchão de espuma fora da água. Todos os animais estavam sob acompanhamento clínico e foram considerados saudáveis no momento da coleta de amostras. Os suabes nasais e retais foram coletados em meio Stuart (Olen®, China), refrigerados e encaminhados ao Laboratório de Bacterioses e Pesquisa da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG) para serem processados em até 96 horas.

Para o isolamento de *Staphylococcus* spp., os suabes foram semeados em ágar sal manitol (MSA; Difco, USA) e incubados a 37°C por 24 horas. As colônias suspeitas foram plaqueadas em ágar Mueller Hinton (MH; Difco, USA) e identificadas a partir da espectrometria de massas (MALDI-ToF MS; Bruker Daltonics, Alemanha), sendo aceitos apenas os valores de score >2, seguindo as recomendações do fabricante¹¹. Posteriormente, esses isolados foram submetidos ao sequenciamento do gene *rpoB*¹². Em seguida, foi realizado teste de suscetibilidade antimicrobiana, através do método de disco difusão em ágar, de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* M100-S30 e

VET01S^{13,14}. Os antimicrobianos testados foram: cefoxitina, penicilina G, tetraciclina, trimetoprima/sulfametoxazol, cloranfenicol, eritromicina, clindamicina, gentamicina, rifampicina e ciprofloxacina. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle.

Para o isolamento de *E. coli*, os suabes nasais e retais foram plaqueados em ágar MacConkey (MC, Difco, USA) e incubados durante 24 horas a 37 °C. Três colônias produtoras de lactose foram selecionadas e submetidas a reação em cadeia da polimerase (PCR) para a identificação bacteriana¹⁵, classificação em filogrupos (A, B1, B2, C, D, E, F ou clado I) e identificação de genes de virulência comumente associados a *E. coli* enterotoxigênica (ETEC: *sta*, *stb*, *lt*, *f5*, *f18*, *f41*, *f4* e 987p), *E. coli* enteropatogênica (EPEC: *eae*, *bfpA*, *iha*, *toxB* e *efa1*), toxina Shiga produzida por *E. coli* (STEC: *stx1*, *stx2*, *ehxA* e *saa*), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC: *eae*, *iha*, *toxB*, *efa1*, *stx1*, *stx2*, *ehxA* e *saa*), *E. coli* necrotóxigênica (NTEC: *cnf1*, *cnf2* e *fl7*), *E. coli* enteroagregativa (EAEC: *astA*, *aggR*, *aaf* e *pet*) e *E. coli* enteroinvasiva (EIEC: *ipaH*)¹⁶. Os isolados positivos para os genes de virulência foram submetidos aos testes de suscetibilidade antimicrobiana, utilizando trimetoprima/sulfametoxazol, enrofloxacin, gentamicina, neomicina, ceftiofur, amoxicilina/ácido clavulânico, ampicilina, florfenicol, doxiciclina, oxitetraciclina e ciprofloxacina e posteriormente classificados como sensíveis, intermediários ou resistentes^{13,14,17}. *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle. Os resultados foram analisados utilizando o teste exato de Fisher (GraphPad Software, USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Staphylococcus spp. foi isolado em suabes nasais de 32 animais (72,7%). Essa bactéria tem se tornado uma preocupação devido ao aumento da resistência antimicrobiana e da variedade de hospedeiros em que se encontra, incluindo animais silvestres^{6,10,18,19}. *S. sciuri* foi a espécie mais comumente encontrada (38,6%), sendo frequentemente descrita como um patógeno oportunista em animais e seres humanos (Tabela 1)^{8,10}. Entre os isolados, destaca-se a detecção de *S. haemolyticus*, espécie comumente relatada em casos de infecções em seres humanos, especialmente neonatos²⁰.

Tabela 1: Distribuição de *Staphylococcus* sp. isolados em peixes-bois-da-amazônia (Fonte Autoral).

Espécies	Total (%)
<i>S. sciuri</i>	17 (38,6)
<i>S. kloosii</i>	4 (9)
<i>S. haemolyticus</i>	3 (6,8)
<i>S. warneri</i>	2 (4,5)
<i>S. gallinarum</i>	2 (4,5)
<i>S. xylosus</i>	1 (2,3)
<i>s. pseudoxylosus</i>	1 (2,3)
<i>S. pasteurii</i>	1 (2,3)
<i>S. hominis</i>	1 (2,3)
Negativas	12 (27,3)
Total	44 (100)

A resistência a penicilina foi encontrada em 13 isolados (40,6%) de *Staphylococcus* spp., enquanto a tetraciclina foi observada em três (9,3%). Dois isolados (6,2%) apresentaram resistência a ambos antimicrobianos. Todos os isolados foram sensíveis a cefoxitina, rifampicina, cloranfenicol, ciprofloxacina e gentamicina. A resistência às penicilinas pode ter relação com seu uso amplo na medicina humana e veterinária^{8,10}. Pode-se hipotetizar ainda que a disseminação de

XI Colóquio Técnico Científico de Saúde Única, Ciências Agrárias e Meio Ambiente



mecanismos de resistência, nesse caso, possa ser indireta, já que os animais do presente estudo não receberam tais antimicrobianos^{7,20}.

No total, 25 animais (56,8%) foram positivos para *E. coli*, sendo obtidos 59 isolados (tabela 2). Desses, 39 (66,1%) foram classificados no filogrupos B1, que é associado à microbiota intestinal de animais^{4,16}.

Tabela 2: Classificação dos isolados *E. coli* em filogrupos (Fonte Autoral).

Filogrupo	Total (%)
B1	39 (66.1)
D	9 (15.2)
A	7 (11.8)
F	3 (5.1)
E	1 (1.7)
Total	59 (100)

Os filogrupos A e D foram encontrados em cerca de 27% dos isolados. Esses grupos são comumente associados a doenças em seres humanos^{4,5,9,16}.

Quatro isolados (6,8%) foram positivos para os fatores de virulência, sendo três deles classificados como ETEC (positivos para *lt* e *937p*) e um como EPEC (positivo para *eae*). Um isolado apresentou resistência a dois antimicrobianos (trimetoprima/sulfametoxazol; amoxicilina e ácido clavulânico), um foi resistente a trimetoprima/sulfametoxazol e outro foi resistente a ampicilina (tabela 3). Todos os isolados foram sensíveis a ceftiofur, enrofloxacin, ciprofloxacina, doxiciclina, oxitetraciclina, florfenicol, gentamicina e neomicina.

Os resultados permitem hipotetizar, ainda, que as estirpes de *E. coli* isoladas possivelmente são provenientes de contaminação do ambiente aquático que os peixes-bois vivem ou de uma contaminação dos seus alimentos, uma vez que essas bactérias são comumente relatadas em seres humanos e animais de produção. Porém, não podemos excluir a possibilidade de que tais isolados façam parte da microbiota desses mamíferos, já que não existem outros estudos prévios que permitam comparações^{5,9,16}.

Tabela 3: Caracterização dos patótipos de *E. coli* encontrados (Fonte Autoral).

Patótipo	Identificação do animal	Categoria	Filogrupo	Resistência antimicrobiana
ETEC (<i>K88</i> e <i>LT</i>)	233	Jovem	A	-
EPEC (<i>eae</i>)	242	Jovem	B1	SUT
ETEC (<i>937p</i>)	278	Filhote	B1	AMP
ETEC (<i>K99</i>)	281	Filhote	A	AMC; SUT

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este foi o primeiro estudo sobre *Staphylococcus* spp. e *E. coli* em peixes-bois. Os resultados sugerem que os peixes-bois-da-amazônia criados em cativeiro são comumente colonizados por *Staphylococcus* spp. e podem apresentar *E. coli* diarreogênicas, algo relevante do ponto de vista da saúde pública. Além disso, esses animais são possíveis reservatórios de mecanismos e fatores de resistência, o que pode ser proveniente da contaminação do habitat ou da alimentação dos peixes-bois. Futuros estudos avaliando outros aspectos da microbiota de animais do gênero *Trichechus* são necessários e podem favorecer a conservação desses animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- MARONTEL, M.; KENDALL, S.; SOUZA, D. DE. IUCN Red List of Threatened Species: *Trichechus inunguis*. IUCN Red List of Threatened Species, 2016.
- EWBANK, A. C. et al. Herpesvirus and adenovirus surveillance in threatened wild West Indian (*Trichechus manatus*) and Amazonian manatees (*Trichechus inunguis*), Brazil. *Acta Tropica*, 237, 2023.

- ARÉVALO-SANDI, A. R. CASTELBLANCO-MARTÍNEZ, D. N. Interactions between calves of Amazonian Manatees in Peru: a study case. *Acta Biológica Colombiana*, 21(2), 355-364, 2016.
- SMATI, M. et al. Quantitative analysis of comensal *Escherichia coli* populations reveals host-specific enterotypes at the intra-species level. *MicrobiologyOpen*, 4(4), 533-697, 2015.
- LOPES, E. S. et al. Molecular diagnosis of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from Psittaciformes of illegal wildlife trade. *Pesquisa Veterinária do Brasil*, 38(4), 762-766, 2018.
- RAMOS, C. P. et al. Identification and Characterization of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, and *C. difficile* Isolates from Reptiles in Brazil. *BioMed Research International*, v. 2019, 9530732, 2019.
- AL-TALIB, N. A. ABDULJALA, M. H. HAMODAT, Z. M. A. A Review on *Staphylococcus* sp. and its pathogens. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 11(2), 755-759, 2020.
- SANTANA, J. A. Isolation and antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci recovered from healthy tortoises in Minas Gerais, Brazil. *Ciência Rural*, 52(7), 2022.
- LAGERSTROM, K. M. HADLY, E. A. The under-investigated wild side of *Escherichia coli*: genetic diversity, pathogenicity and antimicrobial resistance in wild animals. *Proc Bio Sci*, 288(1948), 2021.
- ABDULLAHI, I. N. et al. Wild Animals Are Reservoirs and Sentinels of *Staphylococcus aureus* and MRSA Clones: A Problem with "One Health" Concern. *Antibiotics*, 10(12), 1556, 2021.
- ASSIS, G. B. N. et al. Use of MALDI-TOF Mass spectrometry for the fast identification of Gram-Positive fish pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 8 (1492), 2017.
- MELLMANN, A. et al. Sequencing and Staphylococci identification. *Emerging Infectious Diseases*, 12(2), 333-336, 2006.
- LEWIS, J. S. et al. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (M100). CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI), 30, 2020.
- LUBBERS, B. V. et al. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals (VET01S). CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI), 5, 2020.
- MCDANIELS, A. E. et al. Confirmational identification of *Escherichia coli*, a comparison of genotypic and phenotypic assays for glutamate decarboxylase and beta-D-glucuronidase. *Applied and environmental microbiology*, 62 (9), 3350-3354, 1996.
- CLERMONT, O. et al. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports*, 5 (1), 58-65, 2013.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Basel*, 12, 2022.
- DOS SANTOS, A. C. M. et al. Complete Genome Sequences of the Potential Zoonotic Pathogens *Staphylococcus felis* and *Staphylococcus kloosii*. *Genome Announcement*, 6 (20), e00404-18, 2018.
- FOUNTAIN, K. et al. Diversity of Staphylococcal species cultured from captive livingstone's fruit bats (*Pteropus livingstonii*) and their environment. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 50(1), 266-269, 2019.
- ELTWISY, H. O. et al. Clinical infections, antibiotic resistance, and pathogenesis of *Staphylococcus haemolyticus*. *Microorganisms*, 10 (6), 1130, 2022.

APOIO:

