

KETRIN CRISTINA DA SILVA

Caracterização molecular de plasmídeos carreadores de genes codificadores de beta-lactamases de espectro estendido em *Enterobacteriaceas* isoladas de suínos



São Paulo
2016

KETRIN CRISTINA DA SILVA

Caracterização molecular de plasmídeos carreadores de genes codificadores de beta-lactamases de espectro estendido em *Enterobacteriaceas* isoladas de suínos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutora em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientadora:

Profa. Dra. Andrea Micke Moreno

São Paulo
2016

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3286
FMVZ

Silva, Ketrin Cristina da
Caracterização molecular de plasmídeos carreadores de genes codificadores de beta-lactamases de espectro estendido em *Enterobactereaceas* isoladas de suínos / Ketrin Cristina da Silva. -- 2016. 64 f. il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde animal, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Andrea Micke Moreno.

1. ESBL. 2. Suínos. 3. IncF. 4. Plasmídeo. 5. MLST. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Comparação entre os perfis plasmidiais de cepas de *Escherichia coli* isoladas do ciclo de produção suína carregando genes de resistência a cefalosporinas e quinolonas", protocolado sob o nº 2572/2012, utilizando 100 (cem) suínos, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Andrea Micke Moreno, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 15/2/2012.

We certify that the Research "Plasmidial profile comparison in *Escherichia coli* strains isolated from commercial swine sources harboring resistance genes to cephalosporins and quinolones", protocol number 2572/2012, utilizing 100 (one hundred) pigs, under the responsibility Profa. Dra. Andrea Micke Moreno, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 2/15/2012.

São Paulo, 16 de fevereiro de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SILVA, Ketrin Cristina da

Título: Caracterização molecular de plasmídeos carreadores de genes codificadores de beta-lactamases de espectro estendido em *Enterobacteriaceas* isoladas de suínos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutora em Ciências

Data: ___/___/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Sem mais palavras, dedico esse estudo aquele que foi
herói, meu pai, *in memoriam*.
E àquela que continua sendo fonte de inspiração e
orgulho, minha mãe.

AGRADECIMENTOS

Sou grata aos meus pais, José Braz da Silva e Mourilda da Silva, pelo auxílio imensurável, força, incentivo, apoio e liberdade. Pela formação que inicou-se no ventre de minha mãe e prossegue até os dias de hoje.

Sou grata as minhas irmã e sobrinha, Keila e Marya Eduarda, pelo amor, conforto, compartilhamento e alegrias.

Sou grata a minha orientadora Andrea Micke Moreno pelo exemplo de profissional, mãe e esposa, mostrando que é possível obter sucesso em todas as áreas da vida. Agradeço pelas portas abertas, pela compreensão, autonomia concedida e todo apoio para realização desse projeto.

Sou grata ao meu orientador de mestrado Nilton Lincopan por continuar me guiando, ensinando, repreendendo e estimulando. Agradeço pelas correções, sugestões e todo conhecimento repassado.

Agradeço à Prof. Terezinha Knöbl pela colaboração, cessão de amostras, incentivo e apoio. Agradeço a todos os meus colegas de laboratório pela convivência, amizade, compreensão e paciência. Agradeço aos colegas do laboratório do Prof. Nilton por emprestarem o orientador deles, espaço e material sempre que necessário.

Agradeço à Fapesp, pela concessão da Bolsa de Doutorado, possibilitando minha estadia em São Paulo.

Agradeço à Capes, pelos auxílios para apresentação de trabalhos. Agradeço ao CNPQ.

Agradeço aos secretários do departamento e da pós-graduação, sempre solícitos e respeitosos, atendendo nossos pedidos com rapidez e eficiência.

Agradeço ao Coseas por me conceder refeições diárias ao valor de R\$1,90, poupando-me tempo, dinheiro e energia.

Agradeço à FMVZ por abrigar uma bióloga.

Agradeço à Universidade de São Paulo pelo espaço democrático.

Agradeço à rede Fleury, em especial ao Prof. Jorge Sampaio, pela colaboração.

Agradeço à bioinformata Louise Cerdeira pela montagem dos *contigs* e apoio.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização do sonho diário e perpétuo de fazer pesquisa.

Onde você quer chegar?

(Recomeçar - Carlos Drummond de Andrade)

Alguien me preguntó:

¿Y si yo no quiero ser feliz?

¿Qué hay si quiero ser desdichado?

Yo le contesté: Sé desdichado, ¡si eso te hace feliz!

(Andrew Matthews)

RESUMO

SILVA, K. C da. **Caracterização molecular de plasmídeos carreadores de genes codificadores de beta-lactamases de espectro estendido em *Enterobactereaceas* isoladas de suínos.** [Molecular characterization of plasmids carrying extended-spectrum beta-lactamases coding genes from *Enterobactereaceas* isolated from swine]. 2016. 64 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) tornou-se um desafio em saúde pública por restringir as opções terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por bactérias gram-negativas. O objetivo desse estudo foi avaliar a ocorrência de estirpes produtoras de ESBL nas granjas de suínos brasileiras, bem como caracterizar os plasmídeos carreadores dos genes *bla*_{ESBL} quanto ao grupo de incompatibilidade, tamanho e presença de genes de resistência adicionais. As estirpes foram isoladas em meio MacConkey e identificadas por MALDI-TOF. Posteriormente, os valores de concentração inibitória mínima foram determinados por microdiluição e/ou ágar diluição para aminoglicosídeos, carbapenems, cefalosporinas, fluoroquinolonas, tetraciclinas, sulfas e cefalosporinas associadas a inibidores competitivos. Os genes codificadores de beta-lactamases foram identificados por PCR assim como o grupo de incompatibilidade dos respectivos plasmídeos carreadores e o grupo filogenético das estirpes de *E. coli*. A análise de clonalidade foi realizada por ERIC-PCR e MLST. Finalmente, o ambiente genético do gene *bla*_{CTX-M-15} foi determinado por PCR e/ou sequenciamento, sendo que os plasmídeos carreando genes *bla*_{ESBL} foram transferidos às estirpes receptoras *E. coli* TOP10 e C600 por transformação e conjugação, respectivamente, e parcialmente sequenciados. As estirpes de *Escherichia coli* produtoras de CTX-M-2 foram as mais prevalentes, sendo endêmicas no estado de Minas Gerais. Além disso, é relatada a presença da enzima CTX-M-15 em estirpes de *E. coli* (ST224, ST410, ST1284), *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* e *Pseudomonas aeruginosa* (ST3201). O gene *bla*_{CTX-M-15} esteve associado a plasmídeos IncF e foi transferido com sucesso para a estirpe receptora *E. coli* TOP10, plasmídeos IncF também foram associados a presença do gene *bla*_{CTX-M-2}. O gene *bla*_{CTX-M-8} foi detectado em quatro novos STs de *E. coli* (ST5845, ST5847, ST5848 e ST5350) e não foi adquirido pelas estirpes receptoras. Estes dados indicam que a vigilância de fenótipos resistentes na produção suína deve de ser considerada uma prioridade, assim como a preferência ao uso de antimicrobianos de espectro estrito a fim de evitar a disseminação desses fenótipos nas granjas e sua possível transmissão para população humana.

Palavras-chave: ESBL. Suínos. IncF. Plasmídeo. MLST.

ABSTRACT

SILVA, K. C da. **Molecular characterization of plasmids carrying extended-spectrum beta-lactamases coding genes from *Enterobactereaceas* isolated from swine.** [Caracterização molecular de plasmídeos carreadores de genes codificadores de beta-lactamases de espectro estendido em *Enterobactereaceas* isoladas de suínos]. 2016. 64 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Extended-spectrum beta-lactamase production (ESBL) became a great challenge regarding public health because limit the therapeutic options to treat infections by gram-negative bacteria. The aim of this study were evaluate the occurrence of ESBL producers in Brazilian swine farms and characterize *bla*_{ESBL}-carrying plasmids by sizing and incompatibility group and presence of additional resistance genes. Strains were isolated in MacConkey agar and identified by Maldi-Tof. Next, the minimal inhibitory concentration values were determined by microdilution and/or agar dilution to aminoglycosides, carbapenems, cephalosporins, fluoroquinolones, tetracyclines, sulfas and cephalosporin/inhibitors association. Beta-lactamase encoding genes, plasmid incompatibility group and *Escherichia coli* phylogenetic group were determined by PCR. Clonal relatedness was evaluated by ERIC-PCR and MLST. Finally, the *bla*_{CTX-M-15} genetic environment was determined by PCR and/or sequencing and *bla*_{ESBL}-carrying plasmids transferred to *E. coli* TOP10 and C600 receptor strains by transformation and conjugation, respectively, and partially sequenced. CTX-M-2-producing *E. coli* were the most prevalent phenotype, which were endemic in Minas Gerais State. Moreover, the CTX-M-15 enzyme emerged among *E. coli* (ST224, ST410, ST1284), *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* e *Pseudomonas aeruginosa* (ST3201) strains. The *bla*_{CTX-M-15} was associated with IncF plasmids, which were successfully transferred to *E. coli* TOP10, similarly, IncF plasmids were found harboring the *bla*_{CTX-M-2}. The *bla*_{CTX-M-8}, detected in four novel *E. coli* sequence types (ST5845, ST5847, ST5848 e ST5350), was not acquired by receptor strains. Thus, the surveillance of resistant phenotypes in swine production must be established as a priority as well as narrow spectrum antimicrobials prescription antimicrobial instead broad spectrum to prevent the dissemination of these phenotypes in farms and their transmission to human population.

Keywords: ESBL. Swine IncF plasmid. MLST.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	REVISÃO DE LITERATURA	13
1.1.2	Uso de antimicrobianos na produção animal	13
1.1.3	Mecanismos de resistência	15
1.4	PLASMÍDEOS: MOBILIDADE HORIZONTAL DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1	ISOLAMENTO E SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS UTILIZADOS	19
3.2	DETECÇÃO DE BETA-LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBL) E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....	19
3.4	DETERMINAÇÃO DO GRUPO FILOGENÉTICO DE <i>E. coli</i> PRODUTORA DE CTX-M-15	20
3.5	TRANSFERÊNCIA DE PLASMÍDEOS POR TRANSFORMAÇÃO E CONJUGAÇÃO.....	21
3.6	DETECÇÃO DO GRUPO DE INCOMPATIBILIDADE (INC) DOS PLASMÍDEOS CARREADORES DE GENES BLA_{ESBL} E DO AMBIENTE GENÉTICO DO GENE $BLA_{CTX-M-15}$	21
3.7	MLST DE PLASMÍDEOS INCF.....	22
3.8	SEQUENCIAMENTO PARCIAL DE PLASMÍDEOS CARREGANDO O GENE $BLA_{CTX-M-15}$	22
4	RESULTADOS	24
5	DISCUSSÃO	41
5.1	PRODUÇÃO DE CTX-M-2 E pAmpC POR ESTIRPES DE <i>Escherichia coli</i> ISOLADAS DE SUABES RETAIS DE SUÍNOS	41
5.2	<i>Escherichia coli</i> PRODUTORA DE CTX-M-15	43
5.3	<i>ESCHERICHIA COLI</i> PRODUTORA DE CTX-M-8	46
5.4	<i>Klebsiella pneumoniae</i> PRODUTORA DE ESBL.....	46
5.5	PRODUÇÃO DE CTX-M-2 E CMY-2 POR <i>Salmonella enterica</i> ISOLADAS DE SUABES RETAIS DE SUÍNOS	48
5.6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> : PRODUTORA DE ESBL.....	50

5.7	PRODUÇÃO DE CTX-M- <i>LIKE</i> POR ENTEROBACTÉRIAS LACTOSE-NEGATIVAS ISOLADAS DE FEZES DE SUÍNOS COMERCIAIS.....	50
6	CONCLUSÕES	53
	REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos líderes mundiais na produção de alimentos de origem animal, sendo o quarto maior exportador de carne suína (FNP, 2006), com mercados importadores em ascensão. Entre os anos de 1998 e 2007 a produção de carne de bovinos, suínos e frango aumentou 22%, 73% e 118%, enquanto as exportações dessas mesmas carnes aumentou 537%, 519% e 362%, respectivamente (REGITANO; LEAL, 2010). A introdução de sistemas intensivos de produção animal tornou necessário o uso de antimicrobianos, os quais são administrados de forma terapêutica, metafilática, profilática e como promotores de crescimento. Nos Estados Unidos, são comercializados cerca de 11 milhões de kg de agentes antimicrobianos para a produção animal (UCS, 2001). Já no Brasil, não há registros do volume de antimicrobianos comercializados para essa finalidade, porém o uso de fluoroquinolonas, macrolídeos, tetraciclina, sulfonamidas e beta-lactâmicos é prática comum na produção agropecuária (REGITANO; LEAL, 2010), de modo que as taxas de resistência a esses antibióticos em enterobactérias isoladas do ciclo de produção animal tem aumentado. Este dado é alarmante devido a possibilidade de resistência cruzada com antibióticos de uso humano e ou transferência de genes de resistência entre animais de produção e seres humanos (FERNANDES, 2009; VAZ et al., 2011).

Neste contexto, a aquisição de plasmídeos carreadores de genes de resistência tem sido considerada o principal fator para o aumento da prevalência de fenótipos resistentes, sendo necessária a caracterização desses elementos genéticos móveis quanto aos genes de resistência inseridos e grupo de incompatibilidade. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo isolar e caracterizar estirpes com suscetibilidade reduzida ao ceftiofur, bem como avaliar a possibilidade de transferência dos plasmídeos carreadores de determinantes genéticos de beta-lactamases de espectro estendido e caracterizá-los.

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

“Antibióticos são vendidos como doces” (GILBERT, 2012). Desde que Fleming descobriu a ação antibiótica da penicilina, revolucionando o tratamento das doenças infecciosas, agentes antimicrobianos tem sido largamente administrados a nível mundial, sendo que mais de cem países carecem de legislação quanto ao controle do uso de antimicrobianos (GILBERT, 2012). No Brasil, antibióticos de uso humano eram vendidos sem a necessidade de prescrição médica até o ano 2010, quando a ANVISA restringiu a venda nessas condições (BRASIL, 2010).

Infelizmente, o aumento na prevalência de patógenos com fenótipo resistente tem aumentado em proporções bem maiores que a aprovação de novos compostos. Sob esse ponto de vista, a emergência e disseminação dos mecanismos de resistência tem sido um dos principais desafios em saúde pública, especialmente em ambientes hospitalares. Recentemente, uma vez que os volumes de antibióticos consumidos em medicina veterinária ultrapassam o que é administrado a humanos, tem-se discutido o papel do uso desses compostos na produção animal como fator seletivo e de persistência de estirpes resistentes (PHILLIPS et al., 2004; AARESTRUP, 2012). Neste contexto, doenças transmitidas por alimentos (DTAs) e infecções do trato urinário merecem atenção especial pelo risco de transmissão pelo consumo e/ou manipulação de alimentos de origem animal (NORDSTROM; LIU; PRICE, 2013). Logo, a vigilância de estirpes resistentes na produção animal Brasileira é extremamente importante, uma vez que o Brasil é um dos maiores produtores e exportadores mundiais de alimentos de origem animal.

1.1.2 Uso de antimicrobianos na produção animal

Nos sistemas de produção intensivos, a administração de antibióticos individualmente é pouco utilizada devido ao número de animais alojados, sendo mais comum o tratamento realizado em grupos, o que justifica as grandes quantidades de antibióticos usadas em medicina veterinária. Este uso pode ser terapêutico, profilático, metafilático e como promotores de crescimento (MARSHALL; LEVY, 2011).

O uso de terapêutico configura-se na administração de antibióticos a um animal ou a um grupo de animais que apresentam sinais clínicos de doença enquanto o uso metafilático configura-se na administração de medicamento quando um animal do grupo apresenta sintomas e foi diagnosticado com doença configurando o risco de todos os animais serem infectados. Logo, os demais são tratados antes de manifestarem a doença para reduzir o número de animais afetados. Por outro lado, a prevenção/profilaxia é a administração de antibiótico sem que haja sinais clínicos da doença, mas quando existe o risco da infecção no grupo avaliado, mesmo quando o agente causador ainda não foi isolado (SILVA; KNÖBL; MORENO, 2013). Já o uso como promotor de crescimento configura a adição de antibióticos em doses inferiores as doses terapêuticas via ração objetivando o aumento de ganho de peso dos animais, ou seja, um melhor desempenho fisiológico. A inibição de infecções, a redução de metabólitos microbianos que prejudicam o crescimento, a redução do uso de nutrientes pelos micro-organismos da microbiota e o aumento da captação e absorção de nutrientes pelo intestino tem sido descritos como mecanismos de ação dos promotores de crescimento (PHILLIPS et al., 2004).

Apesar dos antibióticos licenciados para uso veterinário não serem exatamente os mesmos princípios indicados para uso humano, as semelhanças em suas estruturas químicas faz com que um mesmo mecanismo de resistência seja eficiente contra antimicrobianos de uso humano e veterinário, num fenômeno chamado resistência cruzada, de forma que o intestino de animais de produção tem sido descrito como reservatório de genes de resistência de importância clínica em ambos setores (MARSHALL; LEVY, 2011). O exemplo mais notório é a disseminação de estirpes resistentes ao ceftiofur, cefalosporina licenciada exclusivamente para uso veterinário, devido à presença de enzimas da família CTX-M, as quais também conferem resistência a cefotaxima e ceftriaxona, cefalosporinas largamente utilizadas em medicina humana (SILVA; KNÖBL; MORENO, 2013).

Essas bactérias presentes no intestino dos animais podem ser veiculadas pelos mesmos causando infecções de ordem ocupacional em trabalhadores de granjas e abatedouros, incluindo veterinários (GARCIA-ALVAREZ et al., 2012), os quais tornam-se uma via de entrada desses patógenos na comunidade humana, hospitais e ambiente. Além disso, a contaminação do produto final (carne, leite e ovos) por bactérias com fenótipos resistentes torna-se um risco para a aquisição de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs). Deve-se considerar ainda o risco de transferência dos genes de resistência a bactérias mais virulentas

que as colonizadoras dos intestinos animais, uma vez que as bactérias podem adquirir DNA exógeno de várias formas (PHILLIPS et al., 2004; MARSHALL; LEVY, 2011).

1.1.3 Mecanismos de resistência

As bactérias podem evadir da ação de antimicrobianos por diversos mecanismos, os quais podem ser intrínsecos ou adquiridos. Resistência intrínseca é inerente à espécie, por exemplo, estirpes de *Morganella morganii* são naturalmente resistentes a polimixinas por possuírem a estrutura do LPS modificada pela presença de L-Ara₄N (OLAITAN; MORAND; ROILAN, 2014). Por outro lado, a resistência adquirida envolve uma mudança na composição genética do organismo através de mutação no DNA cromossomal ou aquisição de DNA exógeno. Mutações são invariavelmente aleatórias e ocorrem em baixa frequência, porém, algumas vezes, podem resultar em características que conferem vantagem competitiva. Por exemplo, o acúmulo de mutações na região codificadora da enzima DNA girase (sítio de ação das quinolonas) constituem o principal mecanismo de ação contra essa classe de antibióticos (JACOBY, 2005). Apesar da capacidade bacteriana em adquirir DNA exógeno por transformação ou infecção por vírus bacteriófagos, a mobilização de plasmídeos pelo contato direto célula a célula, chamada conjugação, é o mecanismo mais comum de transferência de genes de resistência (SILVA; KNÖBL; MORENO, 2013).

A esse respeito, enzimas que modificam ou degradam as moléculas de antibióticos, tornando-os inativos, tem sido descritas como o principal mecanismo de resistência disseminado em bactérias Gram-negativas. Dentro dessas enzimas, destacam-se as beta-lactamases, uma vez que os antimicrobianos beta-lactâmicos são descritos como criticamente importantes para o tratamento de infecção tanto pela Organização Mundial de Saúde quanto pela Organização Mundial de Saúde Animal, autoridades em questão de saúde humana e animal, respectivamente (WHO, 2007; OIE, 2012). Os antibióticos beta-lactâmicos são subdivididos em penicilinas, monobactâmicos, cefalosporinas, que inclui ainda o grupo das cefamicinas; e carbapenens. De maneira análoga, as enzimas capazes de hidrolisar essas classes de antimicrobianos são denominadas penicilinases, monobactamase, cefalosporinases e carbapenemases.

Diante dessa multiplicidade e diversidade de beta-lactamases, surgiram dois esquemas de classificação. O esquema proposto por Ambler reúne as beta-lactamases nas classes A, B, C e D, de acordo com as regiões conservadas e sequência de aminoácidos (AMBLER, 1980). Assim, enzimas com sítio ativo de serina pertencem à classe A de Ambler, enquanto as carbapenemases que requerem um íon de metal bivalente para sua atividade, chamadas de metalo-beta-lactamases, são incluídas na classe B. Posteriormente, as enzimas do tipo AmpC, as quais degradam cefamicinas, e as enzimas do tipo OXA foram classificadas no grupo C e D, respectivamente (BUSH; JACOBY; 2010). Contrariamente, o esquema proposto por Bush-Jacoby-Medeiros, classifica as beta-lactamases de acordo com suas características funcionais, ou seja, baseia-se nos seus substratos e inibidores. O *Lahey Clinic* mantém um *website*, sob curadoria da pesquisadora Karen Bush, com a classificação, sequência de aminoácidos e ponto isoelétrico das enzimas pertencentes às famílias TEM, SHV e OXA e outras enzimas de importância clínica (BUSH; JACOBY, 2015). O banco de dados reúne um grande número de enzimas, em sua maioria, codificadas por plasmídeos.

Na produção animal, as beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs), pertencentes à classe A de Ambler, são as mais prevalentes. Essas enzimas hidrolisam cefalosporinas de terceira e quarta gerações e são inibidas por inibidores competitivos, como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam. Menos frequentes, as enzimas do tipo AmpC hidrolisam cefamicinas, como a cefoxitina, permanecem ativas na presença de inibidores e são colocadas na classe C de acordo com Ambler (BARIE, 2012).

1.4 PLASMÍDEOS: MOBILIDADE HORIZONTAL DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

Plasmídeos são elementos genéticos extracromossomais capazes de aumentar a diversidade genética bacteriana, adquirindo e perdendo genes, e podem ser horizontalmente transferidos para populações bacterianas da mesma espécie ou espécies diferentes, por conjugação ou mobilização (FRANCIA et al., 2004). O esquema formal para classificação de plasmídeos é baseado nos grupos de incompatibilidade (Inc), segundo o qual plasmídeos com mesmo controle de replicação são incompatíveis, ou seja, apenas plasmídeos de diferentes grupos de incompatibilidade se mantêm estáveis na célula bacteriana (NOVICK, 1987;

CARATTOLI, 2005). Em *Enterobacteriaceae* já foram descritos 27 grupos de incompatibilidade reconhecidos pelo *National Collection of Type Cultures* (London, United Kingdom). Genes de resistência localizados em plasmídeos conferem vantagem seletiva frente à exposição a antimicrobianos (CARATTOLI, 2009). Por sua vez, plasmídeos também podem carrear genes codificadores de fatores de virulência, como bacteriocinas, citotoxinas, sideróforos e adesinas (da SILVA; MENDONÇA, 2012). A co-existência de determinantes de virulência e resistência em um mesmo plasmídeo muitas vezes favorece a disseminação desses plasmídeos dentre bactérias de diferentes fontes e origens geográficas (CARATTOLI, 2011).

Indubitavelmente, a mobilização dos genes de resistência por meio de elementos genéticos móveis, isto é, plasmídeos, transposons e integrons, está intimamente relacionada a ampla disseminação das beta-lactamases (WELDHAGEN, 2004). A grande similaridade genética entre genes cromossômicos do gênero *Kluyvera* com genes de enzimas plasmidiais do tipo CTX-M sugere que essas enzimas derivaram dos genes cromossômicos deste gênero bacteriano e demonstra a interação entre diferentes microorganismos nos ecossistemas (HUMENIUK, 2002; POIREL et al., 2002). Esta interação facilita a troca de elementos genéticos entre as diversas espécies bacterianas, que posteriormente podem colonizar diferentes hospedeiros e ecossistemas e se disseminar por diferentes vias. A esse respeito, a mobilização de plasmídeos tem sido relacionada a ampla disseminação das beta-lactamases, especialmente das ESBL (BARANIAK, 2002).

Na Polônia, um mesmo plasmídeo pertencente à família IncL/M carregando o gene *bla*_{CTX-M-3} foi identificado em oito espécies bacterianas em 15 diferentes hospitais (BARANIAK, 2002; MARCADÉ, 2009). O gene *bla*_{CTX-M-15} tem sido localizado em plasmídeos do grupo IncF (PARTRIDGE; ZONG; IREDELL, 2011; DAHMEN et al., 2013). A disseminação do gene *bla*_{CTX-M-9} em isolados clínicos de *E. coli* e *Salmonella enterica* na Europatem sido associada a mobilização de plasmídeos do tipo IncHI2 (NOVAIS et al., 2007). Além de estirpes de origem clínica, plasmídeos carregando genes do tipo *bla*_{ESBL} também tem sido reportados em estirpes de origem animal, havendo relatos de plasmídeos pertencentes ao mesmo grupo de incompatibilidade e carregando os mesmos genes *bla*_{ESBL} em estirpes de origem humana e animal (ANDRYSIK et al., 2008; MARCADÉ et al., 2009).

2 OBJETIVOS

Isolar, identificar e caracterizar fenotípica e genotipicamente estirpes de enterobactérias produtoras de beta-lactamases de amplo espectro (ESBL) a partir de fezes de suínos provenientes de granjas comerciais.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar estirpes de enterobactérias produtoras de ESBL isoladas de fezes de suínos de granjas comerciais;
- Avaliar o perfil de suscetibilidade antimicrobiana de enterobactérias produtoras de ESBL;
- Identificar e caracterizar os genes codificadores das ESBL;
- Avaliar a transferência horizontal dos genes codificadores de ESBL;
- Caracterizar as estirpes resistentes pela tipagem por sequenciamento de multilocus (MLST);
- Caracterizar plasmídeos carregando genes codificadores de ESBL quanto ao grupo de incompatibilidade e peso molecular;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ISOLAMENTO E SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS UTILIZADOS

Foram coletados e processados 400 suabes retais de suínos, machos e fêmeas, com idade variando entre 40 e 90 dias, provenientes de 39 granjas de seis estados brasileiros (Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Mato Grosso, Paraná), além do Distrito Federal. Para cada animal foi coletado um único suabe retal, que permaneceu acondicionado em meio de transporte de Stuart e mantido a 10°C até o momento do processamento. O suabe foi incubado em caldo Luria Bertani (Difco-BBL) por 18 horas a 37°C. A partir dessa cultura realizou-se antibiograma pelo método de Kirby-Bauer para triagem das estirpes resistentes, seguindo as normas padronizadas pelo CLSI (2009, 2011), utilizando os seguintes antibióticos: amoxicilina/ácido clavulânico (30 µg), ceftiofur (30 µg), cefoxitina (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftazidima (30 µg), amicacina (30 µg), enrofloxacina (5 µg), ciprofloxacina (5 µg) e cloranfenicol (30 µg). As colônias resistentes a alguma cefalosporina foram repicadas e isoladas em Ágar MacConkey, identificadas por provas bioquímicas (produção de gás, produção de H₂S, oxidase, citrato, motilidade, lisina, indol, ureia, LTD) e pela tecnologia do MALDI-TOF (Chen et al., 2016), e armazenadas em glicerol a -80°C para a realização os experimentos seguintes. A estirpe *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle de qualidade em todos os testes de suscetibilidade antimicrobiana.

3.2 DETECÇÃO DE BETA-LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBL) E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A detecção de ESBL e AmpC nas estirpes selecionadas no antibiograma de triagem foi realizada através do teste de dupla difusão do disco (DDST) utilizando discos de cefotaxima, ceftazidima, cefoxitina e ceftiofur, como substratos, e amoxicilina/ácido clavulânico como inibidor (RAWAT et al., 2010). A CIM para as estirpes resistentes foi determinada por microdiluição em caldo utilizando a placa Sensititre -ESBL Confirmatory MIC plate (TREK Diagnostic Systems- Thermo Fisher), seguindo as instruções do fabricante.

Os resultados foram interpretados segundo o CLSI (2014). A determinação da CIM para ceftiofur, amicacina, tetraciclina, sulfas, enrofloxacina e norfloxacina foi realizada por diluição em ágar. A estirpe *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle de qualidade em todos os testes (CLSI, 2013, 2014).

3.3 EXTRAÇÃO DE DNA, PESQUISA DE GENES CODIFICADORES DE BETA-LACTAMASES E GENOTIPAGEM

O DNA das estirpes produtoras de ESBL foi extraído pelo método de fervura descrito por Chapman et al. (2001). Os genes codificadores de ESBL (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-8}, *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{CTX-M-15}) e de AmpC plasmidial (*bla*_{CMY-2}) foram pesquisados por PCR e sequenciamento, utilizando primers e condições previamente descritos (CERGOLENOVELLA et al., 2011; JEONG et al., 2011). A enzima carbapenemase KPC-2 também foi pesquisada por PCR para as estirpes de *Klebsiella pneumoniae* com sensibilidade reduzida ao imipenem.

O perfil genotípico das estirpes produtoras de CTX-M-type e pAmpC foi avaliado por ERIC-PCR (*E. coli* e *K. pneumoniae*) (SYRMIS et al., 2004) e Multilocus Sequence Typing (MLST) (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella* spp., *P. aeruginosa*) (www.pubmlst.org).

3.4 DETERMINAÇÃO DO GRUPO FILOGENÉTICO DE *E. coli* PRODUTORA DE CTX-M-15

O grupo filogenético dos isolados de *E. coli* foi determinado segundo o esquema proposto por Clermont et al. (2000), baseado na amplificação dos genes *chuA*, *yjaA* e *TspE4.C2*.

3.5 TRANSFERÊNCIA DE PLASMÍDEOS POR TRANSFORMAÇÃO E CONJUGAÇÃO

Para avaliar a transferência horizontal dos plasmídeos carregando genes codificadores de beta-lactamases de amplo espectro foram realizados experimentos de transformação. Inicialmente, os plasmídeos das estirpes doadoras foram extraídos por hidrólise alcalina segundo protocolo previamente descrito por Birboim e Doly (1979). A estirpe *E. coli* Top10, utilizada como linhagem receptora, foi tratada com cloreto de cálcio 0.1M e os plasmídeos foram inseridos por choque térmico, ou seja, a estirpe receptora juntamente com os plasmídeos foi incubada a 42°C por 2 min e imediatamente incubada a 0°C (SAMBROOK et al., 2001). As estirpes transformadas foram selecionadas em meio MacConkey contendo 2 µg/ml de cefotaxima. Para as estirpes cuja transformação não resultou em nenhuma transformante, os experimentos foram repetidos utilizando a técnica de conjugação. Os experimentos de conjugação foram realizados utilizando a estirpe *E. coli* C600 como linhagem receptora. Na proporção de 1:5, ambas as linhagens, doadora e receptora, na fase de crescimento, foram cultivadas juntas em meio de cultura Luria Bertani por 6 horas. A cultura mista foi plaqueada em meio MacConkey suplementado com 2 mg/ml de estreptomicina e 2 µg/ml de cefotaxima e incubada por 24 horas. As colônias lactose negativa, sugestivas da estirpe conjugante, foram repicadas em meio Luria Bertani para extração de DNA. A aquisição de genes codificadores de beta-lactamases foi confirmada pela reação de PCR e determinação da CIM para ambos experimentos, transformação e conjugação.

3.6 DETECÇÃO DO GRUPO DE INCOMPATIBILIDADE (INC) DOS PLASMÍDEOS CARREADORES DE GENES BLA_{ESBL} E DO AMBIENTE GENÉTICO DO GENE $BLA_{CTX-M-15}$

O grupo de incompatibilidade dos plasmídeos foi determinado por PCR utilizando *primers* e condições previamente descritos (CARATTOLI, 2005). O ambiente genético do gene $bla_{CTX-M-15}$ presente nas estirpes de *E. coli* e *P. aeruginosa* foi investigado por PCR segundo descrito previamente (DHANJI et al., 2011).

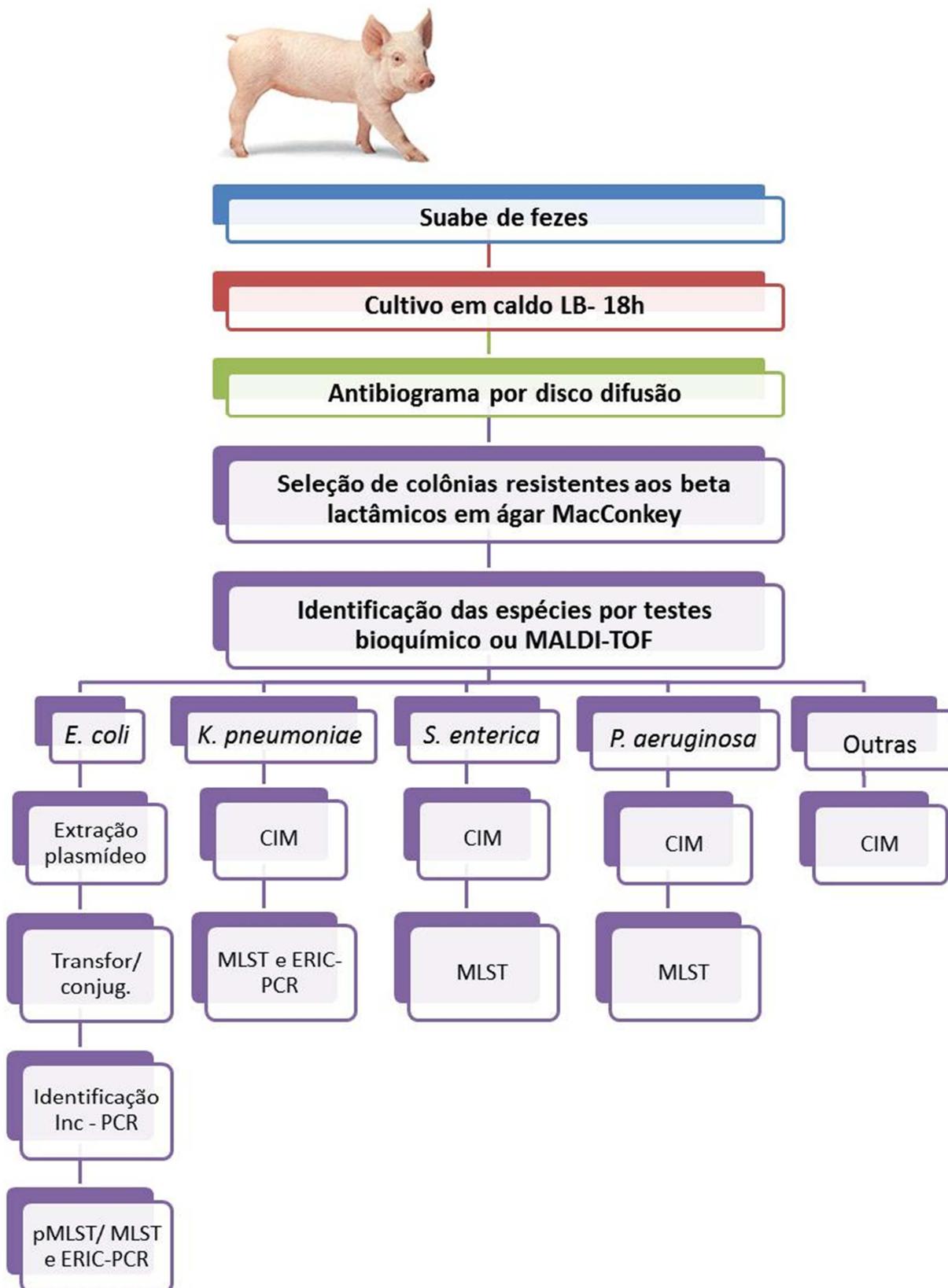
3.7 MLST DE PLASMÍDEOS INCF

A determinação da fórmula FAB para os plasmídeos do tipo IncF carregando o gene *bla*_{CTX-M-15} foi realizada segundo primers e condições descritas no banco de dados para pMLST (<http://pubmlst.org/plasmid/>).

3.8 SEQUENCIAMENTO PARCIAL DE PLASMÍDEOS CARREGANDO O GENE *BLA*_{CTX-M-15}

Do total de cinco plasmídeos, oriundos das estirpes produtoras de CTX-M-15, adquiridos pela estirpe receptora *E. coli* Top 10, dois plasmídeos representativos foram sequenciados utilizando a tecnologia Illumina, e montados utilizando os software *Spades*.

Figura 1 - Fluxograma ilustrando as principais etapas do estudo



Fonte: (SILVA, K. C., 2016)

4 RESULTADOS

Foram avaliados 400 suabes retais de suínos saudáveis de granjas brasileiras, sendo identificadas 66 estirpes de enterobactérias positivas para produção de ESBL e três positivas para pAmpC (Tabela 1, Gráfico 1). *Escherichia coli* foi a espécie mais frequentemente isolada, totalizando 48 estirpes, seguida de *Klebsiella pneumoniae* (cinco estirpes), as quais apresentaram altos valores de CIM para cefotaxima ($\geq 128 \mu\text{g/ml}$), ceftriaxona ($\geq 256 \mu\text{g/ml}$) e ciprofloxacina ($\geq 4 \mu\text{g/ml}$) e resistência variável a cefepime ($\text{MIC}_{50} = 16 \mu\text{g/ml}$), ceftazidima ($\text{MIC}_{50} = 8 \mu\text{g/ml}$) e ceftazidima ($\text{MIC}_{50} = 16 \mu\text{g/ml}$). Além disso, uma estirpe de *K. pneumoniae* produtora de ESBL apresentou perfil de resistência intermediário ao imipenem ($\text{MIC} = 2 \mu\text{g/ml}$) e uma estirpe foi resistente a piperacilina/tazobactam.

Em menor proporção, o gene *bla*_{CTX-M-2} foi detectado em estirpes de *Proteus mirabilis*, *Proteus penneri*, *Salmonella enterica*, *Morganella morganii* e *Pseudomonas aeruginosa*. Além disso, uma estirpe de *P. aeruginosa* e outra de *Enterobacter cloacae* carregavam o gene *bla*_{CTX-M-15}.

O gene *bla*_{CTX-M-15} estava flanqueado pela sequência de inserção *ISEcp1* e *open reading frame* ORF477 tanto nas estirpes de *E. coli* quanto *P. aeruginosa* (Figuras 2 e 3). Além disso, o gene *bla*_{CTX-M-15} estava associado a plasmídeos do grupo IncF nas estirpes de *E. coli*. Plasmídeos representativos dos ST224 e ST410 de *E. coli* foram sequenciados para caracterização detalhada do ambiente genético do gene *bla*_{CTX-M-15} e análise dos genes de resistência co-transferidos (Figura 2). De fato, os genes *tetA*, *aadA*-type e *sul1* foram co-transferidos com o gene *bla*_{CTX-M-15} em ambos, ST224 e ST410 das estirpes doadoras. O sequenciamento completo do plasmídeo oriundo da estirpe 181 de *E. coli* transferido revelou ainda a co-transferência dos genes *aadA1*, *aadA2*, *aadA5*, *aac(3)-IIa*, *aac(6')Ib-cr*, *blaOXA-1*, *catB3*, *sul1*, *sul3*, *dfrA12* e *dfrA17*. A determinação da fórmula FAB obtida pelo pMLST mostrou que os plasmídeos transferidos a estirpe receptora *E. coli* TOP10 carregando o gene *bla*_{CTX-M-15} pertenciam ao grupo de incompatibilidade IncF, com fórmula F-:A9:B1 (ST224) and C1:A9:B1 (ST410).

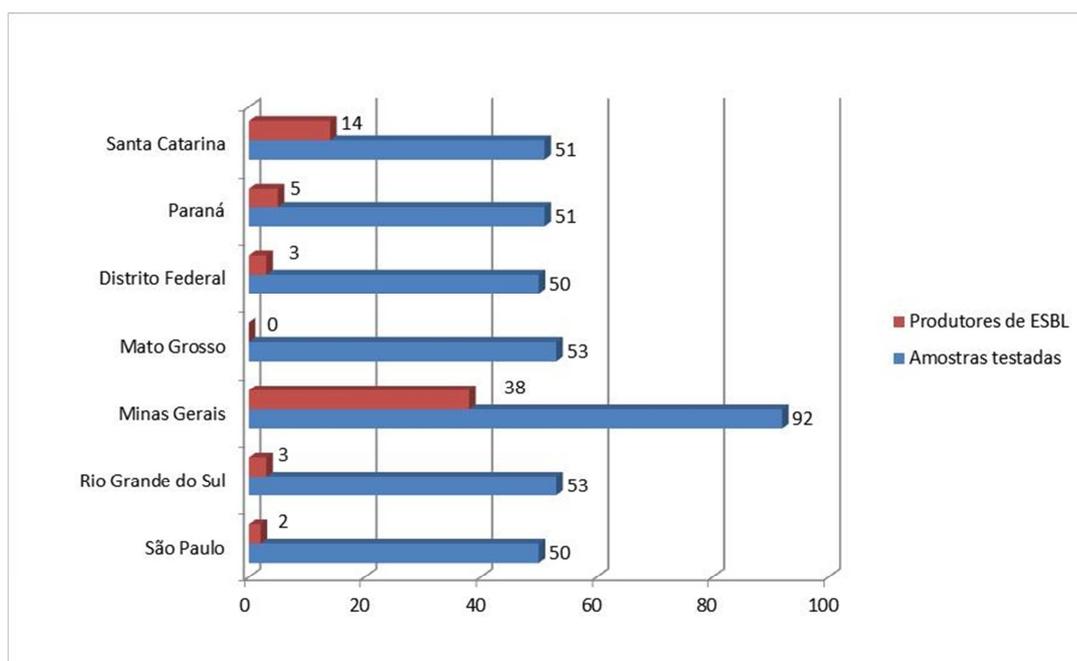
De modo semelhante, o gene *bla*_{CTX-M-2} foi transferido com sucesso para as estirpes receptoras *E. coli* TOP10 e *E. coli* C600 por transformação e conjugação, respectivamente, sendo associado a plasmídeos do grupo de incompatibilidade IncF.

Um total de quatro estirpes produtoras de CTX-M-2 também carregavam o gene *bla*_{CTX-M-8}, o qual não foi adquirido pelas estirpes receptoras. Essas quatro estirpes pertenciam aos novos STs 5845, ST5847, ST5848 e ST5850.

Novos ST também foram encontrados para as estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* 190A, 220B e 228A, pertencentes aos grupos ST3201, ST3202 e ST 3203, respectivamente.

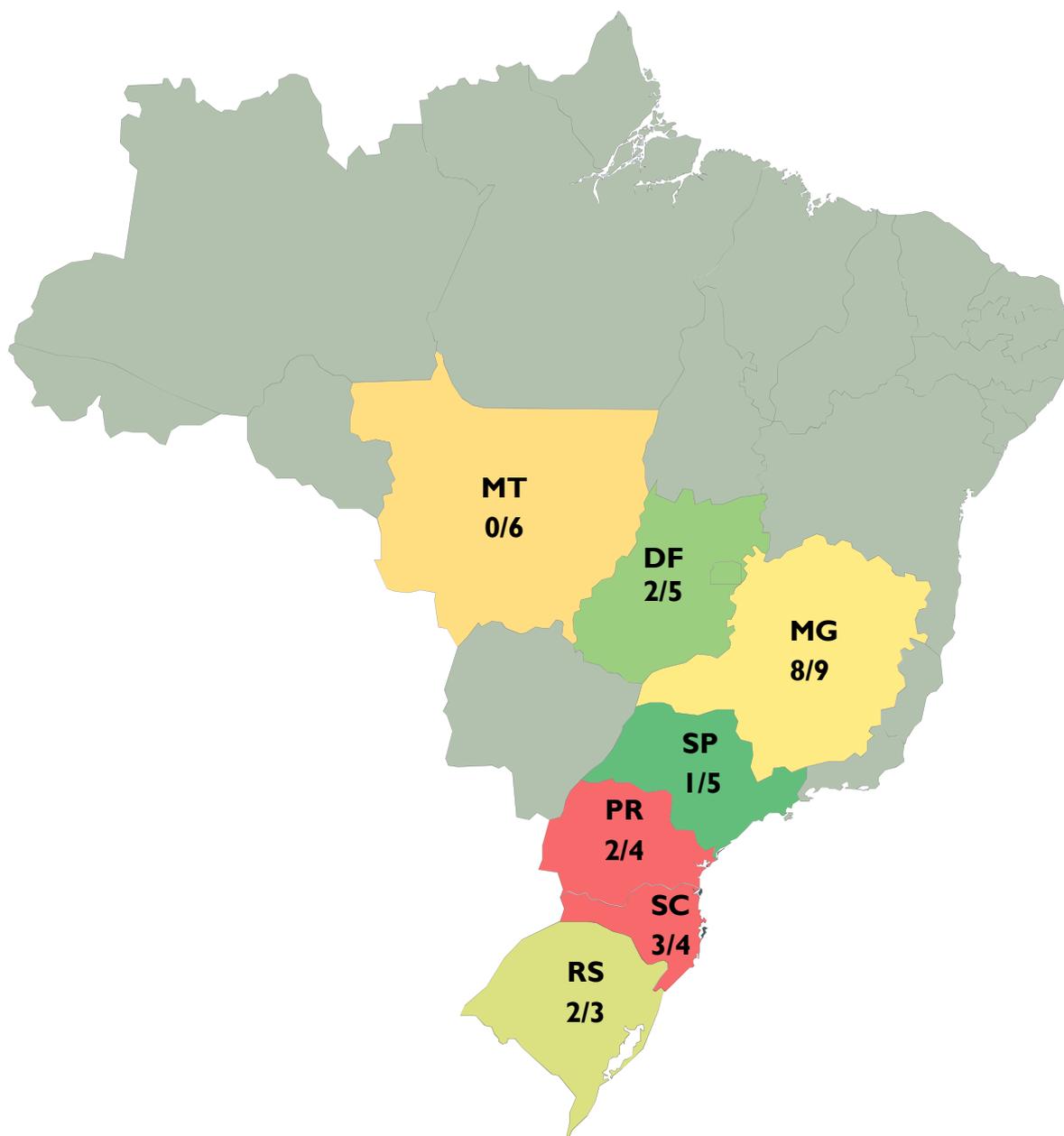
Considerando a ocorrência de amostras positivas entre os estados, Minas Gerais apresentou a maior taxa de produtores de ESBL enquanto no estado do Mato Grosso não foram isoladas estirpes resistentes ao ceftiofur (Gráfico 1). A identificação de animais eliminando enterobactérias produtoras de ESBL nas granjas estudadas foi variável nos diferentes Estados (Mapa 1).

Gráfico 1- Distribuição das amostras avaliadas e das amostras positivas para estirpes produtoras de ESBL dentre as 400 suabes de fezes de suínos avaliados



Fonte: (SILVA, K. C.; 2016).

Mapa 1- Total de granjas avaliadas em cada estado com o correspondente número de granjas positivas para produtores de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL)



Fonte: (SILVA, K. C.; MORENO, M.; 2016).

Tabela 1 - Distribuição por estado de estirpes produtoras de ESBL e pAmpC isolados de suabes retais de suínos

Espécie (n)	Estados (n)	Granjas	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	<i>bla</i> _{CTX-M-8}	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>bla</i> _{CMY-2}
<i>Escherichia coli</i> (48)	DF (1), MG (27), PR (2), SP (2), SC (14), RS (2)	13, 14, 16, 17, 20, 22, 23, 35, 41, 46, 48	0	41	4	8	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (3)	DF (1), MG (2)	19, 22	0	2	0	1	0
<i>Proteus mirabilis</i> (4)	MG (2), PR (2)	16, 41, 51	0	4	0	0	0
<i>Proteus penneri</i> (1)	PR (1)	42	0	1	0	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i> (1)	MG (1)	18	0	0	0	1	0
<i>Salmonella enterica</i> (2)	MG (1), RS (1)	21, 25	0	1	0	0	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (5)	DF (1), MG (4)	17, 36, 51	1	2	0	3	0
<i>Morganella morganii</i> (1)	MG (1)	17	0	1	0	0	0

Tabela 2 - Características de fenotípicas e genotípicas de *E. coli* produtoras de CTX-M-2 e/ou pAmpC isoladas de suínos e transformantes obtidas.

(continua)

Estirpe	Estado/ Granja	Beta- lactamase	Concentração Inibitória Mínima (mg/L)*														
			CEP	POD	CRO	FEP	CFT	CTX	CAZ	CTX/C	CAZ/C	FOX	IPM	MER	GEN	CIP	P/T
123A	SP/13	CTX-M-2, TEM-1	≥32	32	32	8	256	8	0.5	≤0.12/4	≤0.12/4	≤4	≤0.5	≤1	≤4	≥4	≤4/4
Top10 (123A -T)	-	CTX-M-2	≥32	≥64	32	8	32	16	2	≤0.12/4	0.5/4	≤4	≤0.5	≤1	≤4	≤1	≤4/4
123B	SP/13	CTX-M-2, TEM-1, SHV-type	≥32	32	16	8	64	16	1	≤0.12/4	0.5/4	8	≤0.5	≤1	≤4	≥4	≤4/4
TOP10 (123B-T)	-	CTX-M-2	≥32	≥64	64	8	32	32	4	≤0.12/4	0.5/4	≤4	≤0.5	≤1	≤4	≤1	≤4/4
135	SC/14	CTX-M-2, TEM-1, SHV-type	≥32	≥64	32	16	≥512	16	4	≤0.12/4	0.25/4	≤4	≤0.5	≤1	≤4	≤1	8/4
136	SC/14	CMY-2, TEM-1	≥32	≥64	8	≤1	128	8	8	4/4	4/4	64	≤0.5	≤1	≤4	≤1	≤4/4
140	SC/14	CMY-2, TEM-1, SHV-type	≥32	≥64	8	8	64	8	8	8/4	4/4	64	≤0.5	≤1	≤4	≤1	≤4/4
143	SC/14	CTX-M-2, TEM-1	≥32	≥64	128	4	256	16	0.5	≤0.12/4	≤0.12/4	≤4	≤0.5	≤1	≤4	≤1	≤4/4

(continuação)

Estirpe	Estado/ Granja	Beta- lactamase	Concentração Inibitória Mínima (mg/L)*														
			CEP	POD	CRO	FEP	CFT	CTX	CAZ	CTX/C	CAZ/C	FOX	IPM	MER	GEN	CIP	P/T
TOP10 (143-T)	-	CTX-M-2	≥32	≥64	32	8	32	16	2	≤0.12/4	0.5/4	≤1	≤0.5	≤1	≤4	≤1	≤4/4
C600 (143B-C)		CTX-M-2	≥32	≥64	32	8	32	16	2	≤0.12/4	0.5/4	≤1	≤0.5	≤1	≤4	≤1	≤4/4
144A	SC/14	CTX-M-2, TEM-1	≥32	≥64	128	8	256	64	2	≤0.12/4	0.25/4	≤4	≤0.5	≤1	≤4	≥4	≤4/4
C600 (144A-C)	-	CTX-M-2	≥32	≥64	64	8	64	32	2	≤0.12/4	0.5/4	≤1	≤0.5	≤1	≤4	≤1	≤4/4
144B	SC/14	CTX-M-2, TEM-1	≥32	≥64	128	4	256	32	2	≤0.12/4	0.25/4	≤4	≤0.5	≤1	≤4	≥4	≤4/4
146A	SC/14	CTX-M-2, CMY-2, TEM-1	≥32	≥64	4	≤1	64	4	4	4/4	2/4	64	≤0.5	≤1	≤4	≤1	≤4/4
160	MG/16	CTX-M-2, TEM-1	≥32	≥64	64	8	≥256	16	4	≤0.12/4	0.5/4	≤4	≤0.5	≤1	≤4	≤1	≤4/4
162A	MG/16	CTX-M-2	≥32	≥64	128	8	≥512	64	4	≤0.12/4	0.5/4	≤4	≤0.5	≤1	≥32	≤1	≤4/4
167A	MG/16	CTX-M	≥32	≥64	128	8	≥512	64	4	≤0.12/4	0.5/4	≤4	≤0.5	≤1	≥32	≤1	≤4/4

(continuação)

Estirpe	Estado/ Granja	Beta- lactamase	Concentração Inibitória Mínima (mg/L)*														
			CEP	POD	CRO	FEP	CFT	CTX	CAZ	CTX/C	CAZ/C	FOX	IPM	MER	GEN	CIP	P/T
167B	MG/16	CTX-M-2, TEM-1	≥32	≥64	128	8	≥512	64	4	≤0.12/4	0.5/4	≤4	≤0.5	≤1	≥32	≤1	≤4/4
171B	MG/17	CTX-M-2, TEM-1	≥32	32	32	8	≥256	16	1	≤0.12/4	0.25/4	≤4	≤0.5	≤1	≤4	≥4	≤4/4
172	MG/17	CTX-M-1, CTX-M-2, TEM-1	≥32	≥64	128	16	≥512	64	4	≤0.12/4	0.5/4	≤4	2	≤1	≥32	≤1	≤4/4
200A	MG/20	CMY-2, TEM-1	≥32	≥64	128	4	≥512	≥128	128	≥128/4	64/4	≥128	≤0.5	≤1	≤4	≤1	≥128/4
200B	MG/20	CTX-M-2, TEM-1	≥32	≥64	64	16	256	≥128	4	≤0.12/4	0.5/4	≤4	≤0.5	≤1	≤4	≥4	≤4/4
202A	MG/20	CTX-2, TEM-1	≥32	≥64	32	8	128	32	1	≤0.12/4	≤0.12/4	≤4	≤0.5	≤1	≤4	≤1	≤4/4
202B	MG/20	CTX-M-2, TEM-1, SHV-type	≥32	≥64	64	16	64	16	1	≤0.12/4	≤0.12/4	≤4	≤0.5	≤1	≤4	≥4	≤4/4
203A	MG/20	CTX-M-2, TEM-1, SHV-type	≥32	≥64	64	16	256	16	1	≤0.12/4	≤0.12/4	≤4	≤0.5	≤1	≤4	≥4	≤4/4
203B	MG/20	CTX-M-2, TEM-1	≥32	≥64	64	16	256	16	1	≤0.12/4	≤0.12/4	≤4	≤0.5	≤1	≤4	≥4	≤4/4
C600 (203B- C)		CTX-M-2	≥32	≥64	32	8	64	16	2	≤0.12/4	0.5/4	≤1	≤0.5	≤1	≤4	≤1	≤4/4

(continuação)

Estirpe	Estado/ Granja	Beta- lactamase	Concentração Inibitória Mínima (mg/L)*														
			CEP	POD	CRO	FEP	CFT	CTX	CAZ	CTX/C	CAZ/C	FOX	IPM	MER	GEN	CIP	P/T
204A	MG/20	CTX-M, TEM-1	≥32	≥64	128	16	≥512	≥128	4	≤0.12/4	≤0.12/4	≤4	≤0.5	≤1	≥32	≥4	≤4/4
204B2	MG/20	CTX-M-2, TEM-1, SHV-type	≥32	≥64	32	8	256	16	2	≤0.12/4	≤0.12/4	≤4	≤0.5	≤1	≥32	≥4	≤4/4
206A	MG/20	CTX-M-2, TEM-1, SHV-type	≥32	≥64	≥256	≥32	256	≥128	32	≥128/4	64/4	8	≤0.5	≤1	≥32	≥4	≥128/4
206B	MG/20	CTX-M-2, TEM-1	≥32	≥64	≥256	8	256	≥128	2	≤0.12/4	≤0.12/4	≤4	≤0.5	≤1	16	≥4	≤4/4
207A	MG/20	CTX-M-2, TEM-1	≥32	≥64	32	8	256	≥128	1	≤0.12/4	0.25/4	16	≤0.5	≤1	≤4	≥4	≤4/4
207C	MG/20	CTX-M-2, TEM-1	≥32	≥64	≥256	16	256	≥128	2	≤0.12/4	0.5/4	≤4	≤0.5	≤1	16	≥4	≤4/4
208A	MG/20	CTX-M-2, TEM-1, SHV-type	≥32	≥64	64	8	≥512	64	4	≤0.12/4	0.25/4	≤4	≤0.5	≤1	≤4	≥4	≤4/4
208B	MG/20	CTX-M-2, TEM-1, SHV-type	≥32	≥64	32	8	128	16	2	≤0.12/4	≤0.12/4	≤4	≤0.5	≤1	≤4	≥4	≤4/4
219A	MG/22	CTX-M-2, TEM-1	≥32	32	32	4	32	16	0.5	≤0.12/4	0.25/4	≤4	≤0.5	≤1	≤4	≤1	≤4/4
219B	MG/22	CTX-M-2, TEM-1	≥32	≥64	64	16	64	32	2	≤0.12/4	0.25/4	≤4	≤0.5	≤1	≤4	≤1	≤4/4

(continuação)

Estirpe	Estado/ Granja	Beta- lactamase	Concentração Inibitória Mínima (mg/L)*														
			CEP	POD	CRO	FEP	CFT	CTX	CAZ	CTX/C	CAZ/C	FOX	IPM	MER	GEN	CIP	P/T
220A	MG/22	CTX-M-2, TEM-1, SHV-type	≥32	8	≤1	≤1	128	≤0.25	0.5	0.25/4	0.5/4	64	≤0.5	≤1	≤4	≥4	≤4/4
220C	MG/22	CTX-M-2, TEM-1, SHV-type	≥32	≥64	64	4	≥512	32	2	≤0.12/4	0.25/4	≤4	≤0.5	≤1	≤4	≤1	≤4/4
224A	MG/22	CTX-M-2, TEM-1, SHV-type	≥32	≥64	128	8	256	64	2	≤0.12/4	0.25/4	≤4	≤0.5	≤1	≤4	2	≤4/4
227B	MG/22	CTX-M-2, TEM-1	≥32	≥64	≥256	16	128	≥128	2	≤0.12/4	0.25/4	8	≤0.5	≤1	≤4	2	≤4/4
228B	MG/22	CTX-M-2, TEM-1	≥32	≥64	≥256	8	256	64	1	≤0.12/4	≤0.12/4	≤4	≤0.5	≤1	≤4	≤1	≤4/4
235	RS/23	CTX-M-2, TEM-1, SHV-type	≥32	≥64	128	8	256	64	4	≤0.12/4	0.25/4	8	≤0.5	≤1	≤4	≤1	≤4/4
236	RS/23	CTX-M-2, TEM-1, SHV-type	≥32	≥64	≥256	16	≥512	≥128	4	≤0.12/4	0.5/4	16	≤0.5	≤1	≤4	≤1	≤4/4
417	DF/35	CTX-M-2, TEM-1	≥32	≥64	≥256	≥32	≥512	≥128	64	≤0.12/4	0.5/4	≤4	≤0.5	≤1	≤4	≥4	32/4
484A	PR/41	CTX-M-2, TEM-1	≥32	≥64	≥256	16	≥512	≥128	4	≤0.12/4	0.25/4	8	≤0.5	≤1	≥32	≥4	≤4/4
487	PR/41	CTX-M-2, TEM-1	≥32	≥64	≥256	≥32	≥512	≥128	8	≤0.12/4	0.5/4	8	≤0.5	≤1	16	2	≤4/4

(conclusão)

Estirpe	Estado/ Granja	Beta- lactamase	Concentração Inibitória Mínima (mg/L)*														
			CEP	POD	CRO	FEP	CFT	CTX	CAZ	CTX/C	CAZ/C	FOX	IPM	MER	GEN	CIP	P/T
532	SC/46	CTX-M-2, TEM-1	≥32	≥64	64	8		32	2	≤0.12/4	≤0.12/4	8	≤0.5	≤1	≤4	≤1	≤4/4
564	SC/48	CTX-M-2, TEM-1	≥32	≥64	≥256	16	≥512	≥128	4	≤0.12/4	0.25/4	8	≤0.5	≤1	≤4	≤1	≤4/4
566A	SC/48	CTX-M-2, TEM-1	≥32	≥64	≥256	16	≥512	≥128	4	≤0.12/4	≤0.12/4	≤4	≤0.5	≤1	≤4	≤1	≤4/4
566B	SC/48	CTX-M-2, TEM-1	≥32	≥64	≥256	16	256	≥128	2	≤0.12/4	0.5/4	≤4	≤0.5	≤1	16	≥4	≤4/4
567A	SC/48	CTX-M-2, TEM-1	≥32	≥64	≥256	16	128	≥128	8	≤0.12/4	0.5/4	≤4	≤0.5	≤1	≥32	≤1	≤4/4
574A	SC/48	CTX-M-2, TEM-1	≥32	≥64	64	16	128	64	2	≤0.12/4	0.25/4	32	≤0.5	≤1	≤4	≤1	≤4/4
574B	SC/48	CTX-M-2, TEM-1	≥32	≥64	≥256	≥32	256	≥128	2	≤0.12/4	0.25/4	≤4	≤0.5	≤1	≤4	≥4	≤4/4

* CEP, cefalotina; POD, cefpodoxima; CRO, ceftriaxona; FEP, cefepime; CFT, ceftiofur; CTX, cefotaxima; CAZ, ceftazidima; CTX/C cefotaxima+clavulanico; CAZ/C, ceftazidima/clavulanato; FOX, cefoxitin; IPM, imipenem; MER, meropenem; GEN, gentamicina; CIP, ciprofloxacina, P/T, piperacilina/tazobactam.

Tabela 3 - Características fenotípicas e genotípicas de *E. coli* produtoras de CTX-M-15 isoladas de suínos

Ident.	Granja/Estado ^b / Ano	ST/phy	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL) ^c																		
			AMP	CEF	CTX	CRO	EFT	CPD	CAZ	FEP	FOX	IPM	MER	CIP	ENO	NOR	GEN	AMI	TET	SUL	SXT
180A	18/MG/2012	224/B1	≥32	≥32	≥128	≥256	≥128	≥64	16	16	8	≤0.5	≤1	≥64	≥64	≥128	≥32	16	≥128	≥512	≥32
T-180A	-	-	≥32	≥32	32	8	16	≥64	4	2	≤4	≤0.5	≤1	0.003	0.007	0.06	≤4	2	4	≤12	≤2
180B	18/MG/2012	224/B1	≥32	≥32	≥128	≥256	≥128	≥64	16	16	16	≤0.5	≤1	≥64	≥64	≥128	≥32	16	≥128	≥512	≥32
181	18/MG/2012	224/B1	≥32	≥32	≥128	≥256	≥128	≥64	16	8	8	≤0.5	≤1	≥64	≥64	≥128	≥32	16	≥128	≥512	≥32
T-181	-	-	≥32	≥32	≥128	≥256	≥128	≥64	16	8	8	≤0.5	≤1	0.003	0.007	0.12	≥32	2	≥128	≥512	≤2
187 ^a	18/MG/2012	224/B1	≥32	≥32	≥128	≥256	≥128	≥64	16	16	16	≤0.5	≤1	≥64	≥64	≥128	≥32	16	≥128	≥512	≥32
T-187 ^a	-	-	≥32	≥32	≥128	128	≥128	≥64	16	8	≤4	≤0.5	≤1	0.003	0.003	0.06	≥32	2	4	≥512	≤2
188	18/MG/2012	224/B1	≥32	≥32	≥128	≥256	≥128	≥64	16	16	16	≤0.5	≤1	≥64	≥64	≥128	≥32	8	≥128	≥512	≥32
T-188	-	-	≥32	≥32	≥128	≥256	128	≥64	16	16	8	≤0.5	≤1	0.003	0.007	0.12	≥32	2	4	≥512	≤2
223B ^a	22/MG/2012	410/A	≥32	≥32	≥128	≥256	≥128	≥64	32	16	16	≤0.5	≤1	≥64	≥64	≥128	≤4	8	≥128	≥512	≥32
T-223B ^a	-	-	≥32	≥32	≥128	≥256	≥128	≥64	32	16	≤4	≤0.5	≤1	0.003	0.003	0.12	≤4	8	≥128	≥512	≤2
468	40/PR/2012	1284/B1	≥32	≥32	≥128	≥256	≥128	≥64	16	16	16	≤0.5	≤1	≥64	≥64	≥128	≥32	16	≥128	≥512	≥32
470	40/PR/2012	1284/B1	≥32	≥32	≥128	≥256	≥128	≥64	16	≥32	8	≤0.5	≤1	≥64	≥64	≥128	≥32	8	≥128	≥512	≥32
Top10	-	-	≤8	≤8	≤0.2	≤1	0.5	1	0.5	≤1	≤4	≤0.5	≤1	0.003	0.003	0.06	≤4	2	4	≤12	≤2

^a Plasmídeos representativos IncF de *E. coli* ST224 and ST410 foram selecionados para derterminação do pMLST, obtendo a fórmula FAB F-:A9:B1 (ST224) and C1:A9:B1 (ST410), respectively.

^b MG, Minas Gerais; PR, Paraná.

^c CIMs foram determinadas por microdiluição e/ou agar diluição; o perfil resistente é indicado em negrito de acordo com os *breakpoints* estabelecidos pelos CLSI. AMP, ampicilina; CEF, Cefalotina; CTX, cefotaxima; CRO, ceftriaxona; EFT, ceftiofur; CPD, cefpodoxima; CAZ, ceftazidima, FEP, cefepime; FOX, ceftioxina; IPM, imipenem; MEM, meropenem; CIP, ciprofloxacina; ENO, enrofloxacina; NOR, norfloxacina; GEN, gentamicina; AMI, amicacina; TET, tetraciclina; SUL, sulfonamida; SXT, sulfametoxazol/trimethoprim.

Figura 2 - Ambiente genético do gene *bla*_{CTX-M-15} identificado em *Escherichia coli* isoladas de suabes retais de suínos

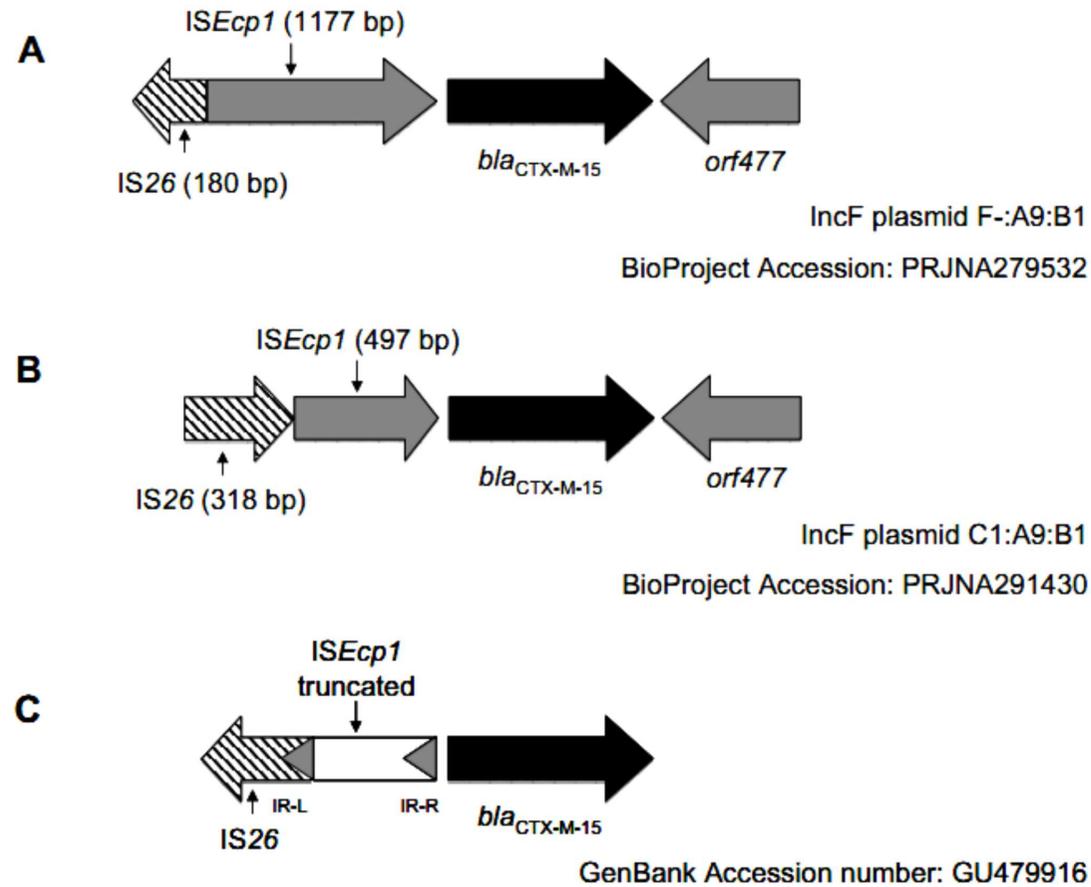


Tabela 4 - Características dos novos *Sequence Types* (STs) de *E. coli* produtoras de CTX-M-8 isoladas de suínos

Estirpe	Estado/ Granja/ ST	Beta-lactamase	Concentração Inibitória Mínima (mg/L)*														
			CEP	POD	CRO	FEP	CFT	CTX	CAZ	CTX/C	CAZ/C	FOX	IPM	MER	GEN	CIP	P/T
123A	SP/13/5845	CTX-M-8, CTX-M-2, TEM-1	≥32	32	32	8	256	8	0.5	≤0.12/4	≤0.12/4	≤4	≤0.5	≤1	≤4	≥4	≤4/4
Top10 (123A -T)	-	CTX-M-2	≥32	≥64	32	8	32	16	2	≤0.12/4	0.5/4	≤4	≤0.5	≤1	≤4	≤1	≤4/4
135	SC/14/5847	CTX-M-8, CTX-M-2, TEM-1, SHV-type	≥32	≥64	32	16	≥512	16	4	≤0.12/4	0.25/4	≤4	≤0.5	≤1	≤4	≤1	8/4
143	SC/14/5848	CTX-M-8, CTX-M-2, TEM-1	≥32	≥64	128	4	256	16	0.5	≤0.12/4	≤0.12/4	≤4	≤0.5	≤1	≤4	≤1	≤4
TOP10 (143-T)	-	CTX-M-2	≥32	≥64	32	8	32	16	2	≤0.12/4	0.5/4	≤1	≤0.5	≤1	≤4	≤1	≤4
203B	MG/20/5850	CTX-M-8, CTX-M-2, TEM-1	≥32	≥64	64	16	256	16	1	≤0.12/4	≤0.12/4	≤4	≤0.5	≤1	≤4	≥4	≤4/4

* CEP, cefalotina; POD, cefpodoxima; CRO, ceftriaxona; FEP, cefepime; CFT, ceftiofur; CTX, cefotaxima; CAZ, ceftazidima; CTX/C cefotaxima+clavulanico; CAZ/C, ceftazidima/clavulanato; FOX, cefoxitin; IPM, imipenem; MER, meropenem; GEN, gentamicina; CIP, ciprofloxacina, P/T, piperacilina/tazobactam

Tabela 5 - Caracterização fenotípica e genotípica de estirpes de *K. pneumoniae* produtoras de CTX-M-15 isoladas de suínos

Estirpe	<i>bla</i> _{CTX-M}	Granja	Estado	ERIC	MLST	Concentração Inibitória Mínima (mg/L)*															
						CAZ	FAZ	FEP	FOX	CEF	POD	CTX	CRO	IMI	MER	GEN	AMP	CIP	P/T	CTX/C	CAZ/C
427	CTX-M-2	36	DF	B	378	32	≥32	≥32	64	≥32	≥64	≥128	≥256	≤0.5	≤1	16	≥32	≥4	≥128/4	1/4	0.25/4
601B	CTX-M-15	51	MG	C	15	32	≥32	16	≤4	≥32	≥64	≥128	≥256	≤0.5	≤1	≤4	≥32	≥4	≤4/4	0.25/4	≤0.12/4
606B	CTX-M-15	51	MG	D	340	32	≥32	16	≤4	≥32	≥64	≥128	≥256	≤0.5	≤1	≥32	≥32	≥4	≤4/4	0.5/4	≤0.12/4
606C	CTX-M-15	51	MG	D	340	32	≥32	16	≤4	≥32	≥64	≥128	≥256	≤0.5	≤1	≥32	≥32	≥4	≤4/4	0.5/4	≤0.12/4
608	CTX-M-15	51	MG	D	147	16	≥32	16	≤4	≥32	≥64	64	≥256	2	2	8	≥32	≥4	≤4/4	≤0.12/4	≤0.12/4

* AMP, ampicilina; FAZ, cefazolina; CEF, cefalotina; CTX, cefotaxima; CRO, ceftriaxona; EFT, ceftiofur; POD, cefpodoxima; CAZ, ceftazidima; FEP, cefepime; CTX/C, cefotaxima; CTX/C, cefotaxima+clavulanato; CAZ/C, ceftazidima+clavulanato; FOX, cefoxitin; IPM, imipenem; MER, meropenem; GEN, gentamicina; P/T, piperacilina/tazobactam; CIP, ciprofloxacina.

Tabela 6 - Caracterização fenotípica e genotípica de estirpes de *S. enterica* produtoras de CTX-M-2 e pAmpC isoladas de suínos

Estirpe	Sorotipo	<i>bla</i> _{CTX-M}	Granja	ST	Estado	Concentração Inibitória Mínima (mg/L)*															
						TAZ	FAZ	FEP	FOX	CEP	POD	FOT	AXO	IMI	MER	GEN	AMP	CIP	P/T	CTX/C	CAZ/C
93	Agona	CMY-2	24	19	RS	32	≥32	≤1	≥128	≥32	≥64	16	16	≤0.5	≤1	≥32	≥32	≥4	8/4	16/4	16/4
219C	<i>S. enterica</i>	CTX-M-2	22	19	MG	2	≥32	8	≤4	≥32	≥64	16	64	≤0.5	≤1	≥32	≥32	≥4	16/4	0.5/4	0.5/4

* AMP, ampicilina; FAZ, cefazolina; CEF, cefalotina; CTX, cefotaxima; CRO, ceftriaxona; EFT, ceftiofur; POD, cefpodoxima; CAZ, ceftazidima; FEP, cefepime; CTX/C, cefotaxima; CTX/C, cefotaxima+clavulanato; CAZ/C, ceftazidima+clavulanato; FOX, cefoxitin; IPM, imipenem; MER, meropenem; GEN, gentamicina; P/T, piperacilina/tazobactam; CIP, ciprofloxacina.

Tabela 7 - Caracterização fenotípica e genotípica de estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de CTX-M-like isoladas de suínos

Estirpe	<i>bla</i> _{CTX-M}	Granja	Estado	ST/ERIC	Concentração Inibitória Mínima (mg/L)*																
					TAZ	FAZ	FEP	FOX	CEP	POD	FOT	AXO	IMI	MER	GEN	AMP	CIP	P/T	CTX/C	CAZ/C	
190A	CTX-M-15	19	MG	ST3201/A	1	≥32	2	≥64	≥32	≥64	16	32	4	≤1	≤4	≥32	≥4	≤4/4	2/4	64/4	
220B	CTX-M-2	22	MG	ST3202/B	4	≥32	2	≥64	≥32	≥64	32	64	1	≤1	≤4	≥32	≤1	8/4	2/4	≥128/4	
228A	CTX-M-2	22	MG	ST3203/B	2	≥32	≤1	≥64	≥32	≥64	8	64	1	≤1	≤4	≥32	≤1	8/4	2/4	32/4	

* AMP, ampicilina; FAZ, cefazolina; CEF, cefalotina; CTX, cefotaxima; CRO, ceftriaxona; EFT, ceftiofur; POD, cefpodoxima; CAZ, ceftazidima; FEP, cefepime; CTX/C, cefotaxima; CTX/C, cefotaxima+clavulanato; CAZ/C, ceftazidima+clavulanato; FOX, cefoxitin; IPM, imipenem; MER, meropenem; GEN, gentamicina; P/T, piperacilina/tazobactam; CIP, ciprofloxacina.

Figura 3 - Ambiente genético do gene *bla*_{CTX-M-15} identificado em *P. aeruginosa* isoladas de suabes retais de suínos

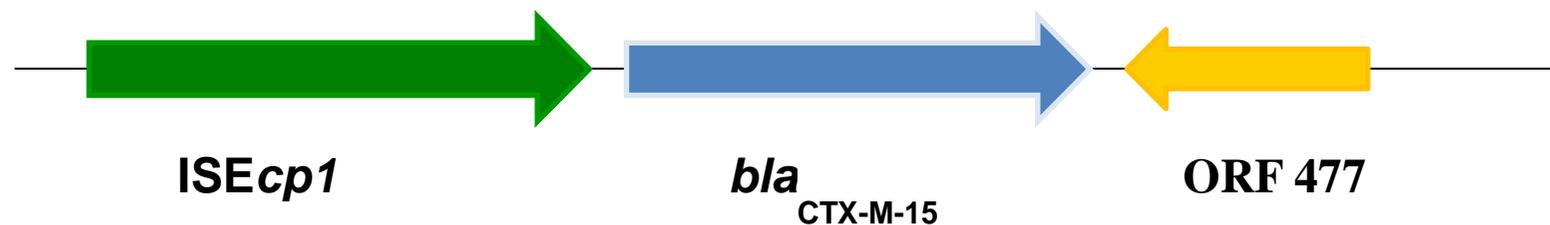


Tabela 8 - Características de enterobactérias lactose-negativas isoladas de fezes de suínos.

Estirpe	Espécie	Granja /Estado	Beta-Lactamase	Concentração Inibitória Mínima (mg/L)														
				CEP	POD	CRO	FEP	CFT	CTX	CAZ	CTX/C	CAZ/C	FOX	IPM	MER	GEN	CIP	P/T
168C	Não identificado	MG/16	CTX-M-2, TEM-1	≥32	≥64	≥256	16	≥512	≥128	4	≤0.12/4	0.5/4	≤4	≤0.5	≤1	16	≤1	8/4
172B	<i>Morganella morganii</i>	MG/17	CTX-M-2, TEM-1	≥32	2	≤1	≤1	64	≤0.25	≤0.25	¼	1/4	16	≤0.5	≤1	8	≥4	≤4/4
168A	<i>Proteus mirabilis</i>	MG/16	CTX-M, TEM-1	≥32	32	64	16	≥512	64	≤0.25	≤0.12/4	≤0.12/4	≤4	2	≤1	8	≥4	≤4/4
478B	<i>Proteus mirabilis</i>	PR/41	CTX-M-2, TEM-1	≥32	≥64	128	≥32	≥512	≥128	2	≤0.12/4	≤0.12/4	≤4	≤0.5	≤1	≤4	≤1	≤4/4
479B	<i>Proteus mirabilis</i>	PR/41	CTX-M-2, TEM-1	≥32	≥64	64	16	64	32	0.5	≤0.12/4	≤0.12/4	≤4	≤0.5	≤1	≥32	2	≤4/4
606A	<i>Proteus mirabilis</i>	MG/51	CTX-M-2, TEM-1	≥32	≥64	≥256	≥32	≥512	64	1	≤0.12/4	≤0.12/4	8	2	≤1	16	≥4	≤4/4
484B	<i>Proteus penneri</i>	PR/42	CTX-M-2, TEM-1	≥32	≥64	32	8	32	16	0.5	≤0.12/4	≤0.12/4	8	1	≤1	≤4	≥4	≤4/4
189	<i>Enterobacter cloacae</i>	MG/18	CMY-2, CTX-M-2, CTX-M-15, TEM-1	≥32	≥64	≥256	≥32	≥256	≥128	32	4/4	8/4	≥128	≤0.5	≤1	≥32	≥4	16/4

5 DISCUSSÃO

No presente estudo observou-se que a ocorrência de produtores de ESBL é variável entre as granjas avaliadas e entre os estados. Isso se deve a práticas distintas de manejo adotadas pelos produtores, o que envolve diversidade na prática de medidas sanitárias e diferentes protocolos de administração de antimicrobianos.

5.1 PRODUÇÃO DE CTX-M-2 E pAmpC POR ESTIRPES DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE SUABES RETAIS DE SUÍNOS

As clássicas enzimas do tipo TEM e SHV constituem as principais beta-lactamases de amplo espectro no continente Europeu e Estados Unidos, sendo recentemente substituídas por ESBL da família CTX-M, as quais hidrolisam preferencialmente cefotaxima e ceftazidima. Por outro lado, as ESBLs prevalentes na América do Sul têm sido as do tipo CTX-M, especialmente as do grupo CTX-M-2. O primeiro caso de produção de CTX-M-2 reportada no Brasil ocorreu no ano de 2000, em estirpes de *Proteus mirabilis* isoladas em hospitais (BONNET et al., 2000). Posteriormente, em 2007 foi reportado pela primeira vez estirpes *Escherichia coli* de origem comunitária produtoras de CTX-M-2 (MINARINI et al., 2007). No mesmo ano, um estudo europeu identificou o gene *bla*_{CTX-M-2} em *E. coli* isolada de frangos importados do Brasil (WARREN et al., 2008).

De fato a presença de *bla*_{CTX-M-2} tem sido intensamente relatada no Brasil em estirpes de *E. coli*, tanto em amostras humanas de origem clínica e comunitária como de animais (MINARINI et al., 2007; WARREN et al., 2008; ROSSI, 2011; SILVA; LINCOPAN, 2012).

Neste estudo foram isoladas 44 estirpes de *E. coli* produtoras de CTX-M-2 de 9 granjas localizadas em São Paulo, Paraná, Minas Gerais e Santa Catarina (Tabela 1, Tabela 2). Essas estirpes apresentaram altos valores de CIM (mg/L) para cefalotina ($CIM \geq 32$), cefpodoxime ($CIM \geq 64$) e ceftiofur ($CIM_{50} = 256$) e resistência variável a ceftriaxona ($256 \leq CIM \leq 1$), cefotaxima ($128 \leq CIM \leq 0.25$), cefepime ($32 \leq CIM \leq 1$), cefoxitin ($128 \leq CIM \leq 4$), ceftazidima ($128 = CIM \leq 0.5$), gentamicina ($32 \leq CIM \leq 4$), ciprofloxacina ($4 \leq CIM \leq 1$) e

piperacilina/tazobactam ($128/4 \leq \text{CIM} \leq 4/4$). Apenas amicacina e carbapenens foram efetivos contra todos os isolados.

Um total de 23 estirpes não foram suscetíveis a ciprofloxacina, antimicrobiano com estrutura química muito similar a enrofloxacina, que é comumente utilizada na produção animal. Além disso, 10 estirpes foram resistentes a gentamicina. Infelizmente, a produção de ESBL associada a determinantes de resistência para antimicrobianos não-beta-lactâmicos limita ainda mais as opções terapêuticas em potenciais infecções por essas estirpes.

Curiosamente, duas estirpes foram resistentes à associação piperacilina/tazobactam ($\text{MIC} \geq 128/4$). A resistência a piperacilina/tazobactam pode ser mediada pela produção de AmpC beta-lactamases, hiper produção de enzimas TEM-1 ou ainda pela perda da expressão de porinas na membrana externa bacteriana. Ambas as estirpes, 200A e 206A, foram positivas para TEM-1, sendo que a estirpe 200A produziu a pAmpC da família CMY-2. A produção de enzimas do tipo SHV também tem sido descrita como um fator para a diminuição da sensibilidade a inibidores de beta-lactamases, tais como o tazobactam (LEE et al., 2013).

Além das enzimas CTX-M-2, 16 estirpes de *E. coli* também produziam ESBL do tipo SHV. Embora menos prevalentes que as enzimas do tipo CTX-M, as SHV também tem sido descritas no Brasil, predominantemente em estirpes de *Klebsiella pneumoniae* (DROPA et al., 2010; TOLLENTINO et al., 2011; VERAS et al., 2011). A enzima TEM-1 também foi amplamente identificada nesse estudo, porém, essa enzima TEM-1 não é classificada como ESBL, sendo responsável pela hidrólise de penicilinas, mas cuja hiperprodução pode mediar resistência a piperacilina-tazobactam.

Os experimentos de transformação e conjugação resultaram na obtenção de três estirpes transformantes 123A-T, 123B-T e 143-T e três estirpes conjugantes 143-C, 144A-C e 203B as quais adquiriram o gene *bla*_{CTX-M-2} a partir das estirpes 123A, 123B, 143, 144A e 203B, respectivamente. O gene *bla*_{CTX-M-2} estava associado a presença de plasmídeos do tipo IncF. Plasmídeos da família IncF são associados a disseminação de diversos fatores de resistência e virulência e constituem um dos grupos de incompatibilidade mais detectados dentre enterobactérias. Neste trabalho, relatamos a disseminação dos plasmídeos IncF carregando o gene *bla*_{CTX-M-2} dentro da produção de suínos, os quais tornam-se reservatórios desses plasmídeos de resistência, que podem ser disseminados para o ambiente e/ou população humana.

Finalmente, os padrões obtidos por ERIC-PCR revelaram a disseminação multiclonal das estirpes produtoras de ESBL, com a existência de diferentes perfis, confirmando a disseminação do plasmídeo de resistência carregando genes *bla*_{CTX-type} no território brasileiro, uma vez que foram isoladas estirpes de *E. coli* CTX-M-like-positivas em nove granjas de quatro estados geograficamente distantes, São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Santa Catarina. Por outro lado, vemos uma concentração de estirpes resistentes no estado de Minas Gerais, o que pode estar indicar uma maior utilização de antimicrobianos nestas granjas.

Além das estirpes produtoras de ESBL, foram isoladas seis estirpes resistentes a cefoxitina, das quais três foram positivas para o gene CMY-2. Durante um longo período de tempo, as descrições de pAmpC ao redor do mundo permaneceram restritas a hospitais. Atualmente, as beta-lactamases pAmpC se disseminaram na comunidade, animais de companhia, animais de produção e ambiente, além dos relatos no ambiente hospitalar terem aumentado significativamente (PAVEZ et al., 2008; MATASEJE et al., 2010; GUO et al., 2014). Logo, as pAmpC se tornarão uma ameaça global muito mais preocupante do que se pensava inicialmente, principalmente se elas se diversificarem e disseminarem de forma tão eficaz como ocorreu com as ESBL nos últimos anos.

A esse respeito, as cefalosporinas CMY-2 são as pAmpC mais prevalentes e mundialmente distribuídas (MAMMERI et al., 2010). No Brasil, o gene *bla*_{CMY-2} foi primeiramente descrito em três estirpes de *Salmonella* Heidelberg (PEIRANO et al., 2006). Logo depois, a produção de CMY-2 foi identificada em estirpes de *E. coli* resistentes ao carbapenem isoladas de amostras clínicas de um homem de 46 anos que, morreu de septicemia (PAVEZ et al., 2008); e, mais recentemente sua ocorrência em carne de frango tem sido descrita (BOTELHO et al., 2015). Aqui, reportamos pela primeira vez no Brasil a produção de CMY-2 por *E. coli* de origem suína. Vale ressaltar ainda que plasmídeos do tipo IncII estão intensamente relacionados a disseminação de *bla*_{CMY-2} (<http://pubmlst.org/plasmid/>).

5.2 *Escherichia coli* PRODUTORA DE CTX-M-15

O gene *bla*_{CTX-M-15} foi detectado em oito estirpes de *E. coli* agrupados em 3 *clusters* pertencentes aos *sequence types* (STs) ST224, ST410 e ST1284 (Tabela 3). As estirpes CTX-

M-15-positivas exibiram altos valores de CIM para as cefalosporinas de uso humano e veterinário (Tabela 3), apresentando também resistência a ciprofloxacina (CIM \geq 64 μ g/ml), enrofloxacin (CIM \geq 64 μ g/ml), norfloxacina (CIM \geq 128 μ g/ml), gentamicina (CIM \geq 32 μ g/ml), tetraciclina (CIM \geq 128 μ g/ml) e sulfonamidas (CIM \geq 512 μ g/ml), confirmando um fenótipo multirresistente (MR). Por outro lado, todas as estirpes permaneceram suscetíveis às cefamicinas, amicacina, piperacilina/tazobactam e carbapenems.

Os produtores de CTX-M-15 pertenciam a três perfis clonais: ST224 (4 isolados, granja 18, MG), ST410 do Complexo clonal 23 (1 isolado da granja 22, MG) e ST1284 (2 estirpes, granja 41, PR). Apesar de nenhum dos oito estirpes pertencerem ao grupo filogenético B2, caracterizado por estirpes altamente virulentas, elas pertenciam aos filogrupos de baixa virulência A e B1. Para as estirpes de *E. coli* ST224 e ST410, o gene *bla*_{CTX-M-15} foi transferido com sucesso para a estirpe receptora Top10 *E. coli*, sendo associado a presença de plasmídeos do grupo de incompatibilidade IncF, com tamanhos de 40-90kb. Finalmente, os plasmídeos IncF-positivos originários das estirpes pertencentes aos ST224 e ST410 foram selecionados para obtenção do perfil segundo o pMLST, sendo que as estirpes pertencentes ao ST224 apresentaram plasmídeos IncF com a fórmula F-:A9:B1 enquanto as do ST410 apresentaram a fórmula C1:A9:B1. De fato, Plasmídeos do tipo IncF têm sido amplamente descritos em *Enterobacteriaceae* carregando genes de resistência e acredita-se que eles sejam predominantes na disseminação de genes codificadores de beta-lactamases dentre enterobactérias (VILLA et al., 2010; OGBOLU et al., 2013). Neste estudo observa-se a diversidade de plasmídeos IncF carregando o gene *bla*_{CTX-M-15}, demonstrando a aquisição de diferentes plasmídeos de resistência por *E. coli* nas granjas de suínos.

As estirpes representativas de *E. coli* CTX-M-15 positivas 181 e 223B, pertencentes aos ST224 e ST410, respectivamente, apresentam diferentes arranjos genéticos na posição upstream ao gene *bla*_{CTX-M-15}, de acordo com os resultados obtidos com o sequenciamento parcial dos plasmídeos IncF F-:A9:B1 e C1:A9:B1 transferidos para a estirpe *E. coli* Top10 (Figura 2). Neste sentido, a estirpe 223B apresenta a sequência de inserção *ISEcp1* flanqueada pela sequência IS26 upstream ao gene *bla*_{CTX-M-15} em estrutura similar já descrita previamente (DHANJI et al., 2011), mas com uma deleção de 727pb na sequência *ISEcp1*. O gene *bla*_{CTX-M-15} também foi previamente identificado junto a sequência de inserção *ISEcp1* truncado ao elemento IS26 em estirpes de *E. coli* pertencente ao ST410 isolado em amostras de origem clínica e de alimentos do sul da Espanha (LÓPEZ-CERERO et al., 2011); de qualquer forma a sequência IS26 tem sido identificada em direção oposta (Figura 2). Por outro lado, um novo

contexto genético do gene *bla*_{CTX-M-15} foi observado na estirpe *E. coli* pertencente ao ST224, que apresenta uma sequência *ISEcp1* de tamanho 1177 truncada por uma transposase IS26 incompleta em posição upstream *bla*_{CTX-M-15}, estrutura semelhante aquela encontrada em estirpes de *E. coli* produtoras de CTX-M-15 no Reino Unido isoladas de mastite bovina (TIMOFTE et al., 2014).

Além do gene *bla*_{CTX-M-15}, os genes *aac(3)-IIa*, *sul1* e *tetA*, determinantes de resistência a gentamicina, sulfas e tetraciclina, foram co-transferidos para a estirpe receptora *E. coli* TOP10, conferindo altos valores de CIM para esses antibióticos. De fato, o sequenciamento completo do plasmídeo adquirido pela estirpe 181, revelou a aquisição dos genes *bla*_{OXA-1}, determinante de beta-lactamases; *aadA1*, *aadA2*, *aadA5* e *aac(3)-IIa* que conferem resistência aminoglicosídeos, destacando-se o gene *aac(3)-IIa*, o qual confere resistência a gentamicina; *catB3*, relacionado a resistência de fenicóis; *sul1* e *sul3*, que confere resistência a sulfonamidas; *dfrA12* e *dfrA17* que hidrolisam trimetoprim e o gene variante *aac(6')Ib-c*, relacionados a resistência de aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, embora a estirpe transformante 181-T tenha permanecido sensível a fluoroquinolonas.

Finalmente, trata-se do primeiro relato da ocorrência de estirpes multirresistentes de *E. coli* isoladas de suínos comerciais carregando o gene *bla*_{CTX-M-15} no Brasil. Em destaque, descrevemos a produção de CTX-M-15 pelo ST410, pertencente ao complexo clonal 23, que foi previamente identificado em animais de produção e amostras clínicas, evidenciando sua potencial transmissão entre humanos e a animais (LÓPEZ-CERERO et al., 2011). Além disso, o clone ST410/CTX-M-15⁺ tem sido predominante dentre produtores de ESBL em hospitais brasileiros (PEIRANO et al., 2011). Por outro lado, estirpes *E. coli* ST224 isoladas de pacientes têm sido associadas a produção de diferentes beta-lactamases de grande importância clínica, tais como NDM-1, KPC-2, e também CTX-M-15 (BARANIAK et al., 2011; MSHANA et al., 2011 ; LIU et al., 2013); e mais recentemente, a produção de CTX-M-8 em *E. coli* ST224 isolada de rebanhos de búfalos comerciais foi documentada no Brasil (AIZAWA et al., 2014).

Diante disso, a detecção dos grupos genéticos de baixa-virulência A e B1 sugere a seleção de reservatórios silenciosos de *bla*_{CTX-M-15} dentre estirpes comensais intestinais de *E. coli* em suínos saudáveis, representando um grande problema de saúde pública, pois produtores de ESBL de origem comensal podem exercer um importante papel como patógenos oportunistas em hospedeiros animais e humanos. Em relação a isso, o intenso uso do ceftiofur na produção de suínos pode estar associado a seleção e persistência de *E. coli*

intestinal com fenótipo resistentes a cefalosporinas (LUTZ et al., 2011), onde genes *bla*_{CTX-M}-type podem se disseminar rapidamente dentre suínos saudáveis.

5.3 *ESCHERICHIA COLI* PRODUTORA DE CTX-M-8

O sequenciamento das enzimas CTX-M-like das estirpes 123A, 135, 143 e 203B revelou a ocorrência de ESBL do grupo CTX-M-8 na produção suína (Tabela 4). Neste contexto, as enzimas do tipo CTX-M-8 foram descritas pela primeira vez no ano 2000, em estirpes de *Enterobacter* spp. e *Citrobacter* sp. isoladas em hospitais no Rio de Janeiro (BONNET et al., 2000). Posteriormente, o gene *bla*_{CTX-M-8} foi identificado em estirpes de *K. pneumoniae*, também na cidade do Rio de Janeiro (PEIRANO et al., 2009). Por sua vez, os relatos na produção animal são recentes. Aizawa et al. (2014) descrevem a ocorrência de *E. coli* produtora de CTX-M-8 na produção leiteira de búfalos enquanto Ferreira et al. (2014) descrevem a disseminação do gene *bla*_{CTX-M-8} em frangos de corte. Mais recentemente, Botello et al. (2015) isolou estirpes de *E. coli* produtoras de CTX-M-8 em carcaças congeladas de frango vendidas em supermercados, demonstrando a persistência de fenótipos resistentes no produto final, que chega ao consumidor.

No presente estudo, relata-se pela primeira vez no Brasil, a ocorrência de *E. coli* CTX-M-8-positivas na produção suína, as quais foram caracterizadas como novos STs ST5845, ST5847, ST5848, ST5850. As estirpes produtoras de CTX-M-8 também produziram a enzima CTX-M-2, a qual foi transferida com sucesso para as linhagens receptoras *E. coli* C600 e *E. coli* Top10 por conjugação e transformação, respectivamente. Entretanto, o gene *bla*_{CTX-M-8} detectado nestas estirpes e associado a plasmídeos da família Inc11, não foi adquirido pelas estirpes receptoras (FERREIRA et al., 2014).

5.4 *Klebsiella pneumoniae* PRODUTORA DE ESBL

Klebsiella pneumoniae é um dos agentes infecciosos de grande importância no ambiente hospitalar. Neste estudo foi isolada uma estirpe de *K. pneumoniae* produtora de CTX-M-2, sendo positiva para ambos os genes *bla*_{CTX-M-2} e *bla*_{CTX-M-1} (Tabela 5). Além disso,

quatro estirpes eram produtoras de CTX-M-15, das quais três eram clonais segundo o ERIC-PCR, sendo provenientes de granjas de Minas Gerais. A estirpe restante foi isolada de amostras do Distrito Federal, mostrando a disseminação de enzimas CTX-M-like em diferentes regiões do território brasileiro.

As estirpes de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL apresentaram altos valores de CIM (mg/L) para cefotaxima (≥ 128) e ceftriaxona (≥ 256), e perfil variável a cefoxitina (MIC₅₀=), cefepime (MIC₅₀=16), gentamicina (MIC₅₀=16), sendo que uma estirpe apresentou perfil intermediário ao imipenem (MIC=2), o que pode ser mediado pela perda da expressão de porinas, uma vez que o gene *bla*_{KPC-2} não foi identificado. Além disso, a estirpe produtora de CTX-M-2 foi resistente a piperacilina/tazobactam. Todos os isolados permaneceram sensíveis ao meropenem e ampicacina.

Estima-se que aproximadamente 50% dos isolados humanos de *Klebsiella spp.* no Brasil sejam produtores de ESBL, resultando em falha terapêutica e surtos por estirpes resistentes no ambiente hospitalar, o que tem alto impacto na saúde pública diante das características de patogenicidade e endemicidade da bactéria (CORKILL et al., 2001; KIFFER et al., 2005; MARRA et al., 2006; ROSSI, 2011; VILLEGAS et al., 2011. De fato, *K. pneumoniae* produtora de ESBL está amplamente disseminada no ambiente hospitalar e na comunidade, e, recentemente, tem sido descrita também no meio ambiente (OLIVEIRA et al., 2014). Porém, os relatos de ESBL na produção animal permanecem escassos. Neste estudo, descrevemos pela primeira vez a ocorrência de *K. pneumoniae* produtores de CTX-M-like na produção suína brasileira.

Duas estirpes de *K. pneumoniae* produtoras de CTX-M-15 pertenciam ao ST340 do Complexo Clonal 11 (Tabela 5). Esse clone tem sido amplamente descrito no Brasil, geralmente carregando determinantes para a carbapenemase KPC-like. Realmente, hospitais dos estados de Alagoas, Piauí, Espírito Santo e São Paulo, mais o Distrito Federal, tem reportado a disseminação do clone ST340/KPC⁺. A estirpe pertencente a esse clone isolada no presente estudo não carregava genes *bla*_{KPC}. Em 2007, estirpes *K. pneumoniae* produtoras de CTX-M-15 foram isoladas em um hospital terciário do estado de São Paulo (TOLLENTINO et al., 2011) e, recentemente, Oliveira et al. (2014) relatou a ocorrência de estirpes do clone *K. pneumoniae* ST340/KPC-2⁺ co-produtora de CTX-M-15 em águas dos rios Tietê e Pinheiros, no estado de São Paulo. Essa estirpe possuía plasmídeos de resistência carregando os genes *bla*_{CTX-M-15} e *bla*_{KPC-2} demonstrando a promiscuidade desse clone, com aquisição de novos

determinantes de resistência. Infelizmente, os experimentos de transferência de plasmídeos foram negativos para as estirpes de *K. pneumoniae*.

Além do ST340, outros STs pertencentes ao complexo clonal 11 tem se disseminado por pelo menos 11 estados brasileiros, sendo epidêmicos nos cinco continentes, confirmando que o CC11 pode ser considerado como o mais importante complexo clonal relacionado a dispersão de genes *bla*_{KPC-like} ao redor do mundo. Dessa maneira, fica evidente a importância que o clone ST340/CTX-M-15⁺ isolado de suínos comerciais assume na epidemiologia de fenótipos resistentes a antibióticos beta-lactâmicos.

Além do ST340, outro ST de grande importância clínica isolado no presente estudo foi o ST15, o qual tem sido frequentemente descrito em animais de companhia (DONATI et al., 2014) e como clone epidêmico na Europa (NIELSEN et al., 2011). As estirpes restantes pertenciam ao ST147 e ST378. O ST378 foi descrito em amostras clínicas humanas. O ST147 tem sido associado a produção de CTX-M-15, além da co-produção de NDM-7 carbapenemase e RmtF metilase (LEE et al., 2014; RODRIGUES et al., 2014). No Brasil, o clone *K. pneumoniae* ST147 foi identificado carregando determinantes de resistência a fluoroquinolonas em pacientes com infecção urinária (ROCHA et al., 2014).

5.5 PRODUÇÃO DE CTX-M-2 E CMY-2 POR *Salmonella enterica* ISOLADAS DE SUABES RETAIS DE SUÍNOS

Salmonella enterica tem assumido grande importância epidemiológica devido ao crescente número de surtos e infecções relacionadas ao consumo de água e alimentos contaminados, especialmente de origem animal (VAN AMSON; HARACEMIV; MASSON, 2006; CENTER FOR DISEASE CONTROL, 2007; BRASIL, 2009). A administração de antibióticos para o tratamento faz-se necessária em casos de infecções extra intestinais ou em grupos mais susceptíveis da população (crianças, idosos e imunossuprimidos). Logo, a ocorrência de fenótipos resistentes é uma questão de saúde pública.

Neste estudo, apenas duas estirpes de *Salmonella* spp. resistentes ao ceftiofur foram isoladas, uma produtora de cefamicinase CMY-2 e outra carregando o gene *bla*_{CTX-M-2}. A estirpe produtora de CMY-2 apresentou alto valor de CIM (mg/L) para cefoxitin (MIC_≥128)

assim como a estirpe carregando o gene *bla*_{CTX-M-2} apresentou altos valores de CIM para cefotaxima e ceftriaxona (CIM_≥64).

Contrariamente a *K. pneumoniae* e *E. coli*, relatos de *Salmonella* produtoras de ESBLs são incomuns, uma vez que a maioria dos estudos incluindo *Salmonella* spp. relatam resistência, mas não contemplam os mecanismos envolvidos. Porém, dentre as ESBLs já descritas em salmonelas não-tifóides no Brasil, estão as enzimas OXA-53, CTX-M-8 e CTX-M-9 (MULVEY et al., 2004; FONSECA et al., 2006; PEIRANO et al., 2006). Recentemente, a produção de CTX-M-2 foi descrita em espécimes de *Salmonella* Typhimurium recuperadas de produtos de origem aviária e fontes relacionadas, como também em pacientes pediátricos no Brasil (FERNANDES et al., 2009). Posteriormente, Silva et al. (2013) reportaram a presença do gene *bla*_{CTX-M-2} em *Salmonella enterica* pertencente aos sorotipos Schwarzengrund e Agona isolados da produção avícola. Considerando a produção suína, esse é o primeiro relato de *S. enterica* produtora de CTX-M-2 nas granjas brasileiras, confirmando a aquisição e disseminação do gene *bla*_{CTX-M-2} em *Salmonella enterica* isoladas da produção animal.

As enzimas CMY-2-type constituem as mais prevalentes e mundialmente distribuídas pAmpC. No Brasil, o primeiro relato do gene *bla*_{CMY-2}, foi em estirpes de *Salmonella enterica* de origem clínica e animal (PEIRANO et al., 2006). Logo depois, sua ocorrência em estirpes de *E. coli* isoladas de paciente com septicemia foi reportada. Aqui, relata-se a ocorrência do gene *bla*_{CMY-2} na produção de suínos. A esse respeito, plasmídeos do grupo de incompatibilidade IncII têm sido largamente associados a disseminação do gene *bla*_{CMY-2}. A esse respeito, *Salmonella enterica* tem sido o principal patógeno a carregar plasmídeos IncII-*bla*_{CMY-2} (<http://pubmlst.org/plasmid/>), demonstrando a importância de *Salmonella enterica* na disseminação de pAmpC.

Ambas as estirpes 93.1.1 e 219C pertenciam ao clone ST19 de *Salmonella enterica*, o qual já foi descrito na produção de suínos em Portugal apresentando fenótipo MR, mas sem produzir beta-lactamases. O ST19 tem sido descrito como o principal ST abrigo estirpes de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Porém, a estirpe 93.1.1 pertence ao sorotipo *S. Agona*. Este dado indica que o ST19 abriga diferentes sorotipos de *Salmonella* spp. neste contexto, *Salmonella Agona* tem sido descrita causando surtos em hospitais pediátricos no Brasil (ASENSI et al., 1994), além de ser o segundo sorotipo isolado em frigoríficos de suínos do Rio Grande do Sul (BESSA et al., 2004), reafirmando que os suínos podem ser uma fonte de contaminação de patógenos humanos. Além disso, esse sorotipo já foi descrito na

produção avícola Brasileira como produtor de CTX-M-2 (SILVA et al; 2013).

5.6 *Pseudomonas aeruginosa*: PRODUTORA DE ESBL

Embora a colonização seja um fator importante para infecção, *P. aeruginosa* não tem grande importância na produção de suínos, sendo dificilmente associada a infecções primárias. Na clínica humana *P. aeruginosa* também se configura como agente oportunista, sendo que aproximadamente 30% de todas as infecções do trato respiratório inferior no Brasil são causadas por *P. aeruginosa* (SADER et al., 2003).

Dentre as beta-lactamases descritas em *P. aeruginosa* no Brasil, podemos citar CTX-M-2, GES-1, GES-5, IMP-1 e SPM-1, sendo que SPM-1 já foi descrita tanto em hospitais quanto no ambiente. Neste estudo, relatamos a aquisição dos genes *bla*_{CTX-M-2} e *bla*_{CTX-M-15} por estirpes de *P. aeruginosa* na produção de suínos. Essas estirpes permaneceram sensíveis a ceftazidima e cefepime. Com respeito às cefalosporinas classicamente hidrolizadas pelas enzimas CTX-M-like, isto é, cefotaxima e ceftiofur, elas não possuem significado clínico para *P. aeruginosa*, não havendo padronização dos valores de CIM dentro do CLSI para esses antimicrobianos.

De modo semelhante às estirpes de *E. coli* CTX-M-15+, o gene *bla*_{CTX-M-15} em *P. aeruginosa* estava flanqueado pela sequência de inserção ISEcp1 e pela open reading frame ORF477 (Figura 3), sugerindo a aquisição do gene pelas estirpes de *E. coli*, uma vez que ambas espécies CTX-M-15+ foram isoladas na mesma granja. A análise do MLST revelou a emergência de novos clones, designados ST3201, ST3202 e ST3203 (Tabela 7).

Assim, diante da importância que *P. aeruginosa* assume em medicina veterinária e humana, a descrição de suínos como reservatórios de estirpes carregando genes de resistência torna-se um alerta no manejo de suínos a fim de impedir a veiculação desse patógeno pelo consumo de alimentos de origem animal.

5.7 PRODUÇÃO DE CTX-M-LIKE POR ENTEROBACTÉRIAS LACTOSE-NEGATIVAS ISOLADAS DE FEZES DE SUÍNOS COMERCIAIS

Neste estudo, isolamos cinco estirpes de *Proteus* spp., uma estirpe de *Morganella*

morganni e uma estirpe de *Enterobacter cloacae* produtoras de CTX-M-2 e CTX-M-1, CTX-M-2 e CTX-M-15, respectivamente (Tabela 8).

O primeiro caso de produção de CTX-M-2 reportada no Brasil ocorreu no ano 2000, em estirpes de *Proteus mirabilis* isoladas em hospitais (BONNET et al., 2000). Subsequentemente, essas enzimas se disseminaram na comunidade, em pets, animais de produção e alimentos relacionados. Neste estudo, reportamos o isolamento de estirpes de *Proteus mirabilis* e *Proteus penneri* carregando o gene *bla*_{CTX-M-2} na produção suína, o que já tem sido relatado em produtos aviários (CASELLA et al., 2015). *Proteus* spp. tem sido relacionado frequentemente a infecções urinárias e sepse e humanos, de modo que a disseminação pela cadeia de produção de alimentos deve ser contida (CABRAL et al., 2015).

Com relação à *Morganella morgani*, enzimas do tipo CTX-M já têm sido descritas no Brasil em infecções hospitalares, sendo esse o primeiro relato dessa espécie carregando genes *bla*_{CTX-M-2} na produção animal brasileira (DROPA et al., 2009).

Finalmente, *E. cloacae* assume grande importância em medicina humana, sendo o quarto principal agente associado a infecções hospitalares, incluindo septicemia, infecções do trato respiratório inferior e do trato urinário (SADER, 2001). Esse é o primeiro relato de *E. cloacae* produtor de CTX-M-15 na produção animal. Porém o gene *bla*_{CTX-M-15} em estirpes de *Enterobacter* spp. tem sido reportado no ambiente hospitalar, incluindo infecções de corrente circulatória (SEKI et al., 2013; CARVALHO-ASSEFI, 2014), o que demonstra a necessidade de conter a disseminação desses clones.

As cefamicinas (cefotaxima) têm sido utilizadas como alternativa no tratamento de infecções por produtores de ESBL. Especificamente em relação ao *Enterobacter cloacae*, a espécie é intrinsecamente resistente às cefamicinas devido a produção cromossomal de AmpC, assim como as demais espécies do grupo CESP (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter* sp., *Serratia marcescens* and *Providencia* sp). Além disso, a estirpe 189 apresentou altos valores de CIM para quinolonas (CIM_≥4mg/L), alternativa no tratamento de fenótipos resistentes a cefalosporinas. Dessa maneira, a ocorrência de *E. cloacae* produtor de CTX-M-15 na produção animal torna-se um problema de saúde pública.

Na suinocultura mundial, a ocorrência de infecções bacterianas entéricas, respiratórias e sistêmicas gera altas perdas econômicas, assim, a identificação de clones resistentes ao

ceftiofur e aos diferentes princípios ativos avaliados atinge diretamente esse setor econômico, limitando as alternativas terapêuticas. Além disso, como resultado da produção de ESBL, há resistência cruzada a cefalosporinas de uso humano, tornando a disseminação de estirpes resistentes na produção suína uma questão de saúde pública, pelo risco de disseminação na população humana através do consumo de alimentos de origem animal e/ou profissionais que manejam esses animais. Além das infecções intestinais, *E. coli* que foi a espécie com maior frequência de resistência neste estudo é o principal agente Gram-negativo relacionado a infecções urinárias em humanos, o que nos alerta ainda mais sobre a urgência em impedir a disseminação desses fenótipos.

6 CONCLUSÕES

- O estado de Minas Gerais concentrou o maior número de estirpes produtoras de ESBL;
- *Sequence types* de *E. coli* epidêmicos na clínica humana, ST224 e ST410/CC23 foram identificados na produção suína carregando o gene *bla*_{CTX-M-15};
- Novos STs de *E. coli* foram identificados como reservatórios do gene *bla*_{CTX-M-8} na produção suína;
- Os STs de *K. pneumoniae* ST340/CC11, ST15 e ST147 de grande importância clínica humana, também estão presentes na produção suína;
- Novos STs de *P. aeruginosa* (ST3201, ST3202 e ST3203) carregam o gene *bla*_{CTX-M-15};
- A ocorrência de estirpes de enterobactérias pertencentes a complexos clonais potencialmente virulentos e produtores de ESBL revelam a necessidade de vigilância de fenótipos resistentes na produção de suínos.

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F. Sustainable farming: get pigs off antibiotics. **Nature**, v. 486, n. 465-466, p. 465-466, 2012.
- AIZAWA, J. ; NEUWIRT, N; BARBATO, L; NEVES, P. R.; LEIGUE, L.; PADILHA, J.; PESTANA DE CASTRO, A. F.; GREGORY, L; LINCOPAN N. Identification of fluoroquinolone-resistant extended-spectrum β -lactamase (CTX-M-8)-producing *Escherichia coli* ST224, ST2179 and ST2308 in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, p. 2866-2869, 2014.
- AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamases. **Philosophical Transactions Royal Society London**, Series B, Biological Sciences, v. 289, n. 1036, p. 321-331, 1980.
- ANDRYSIAK, A. K.; OLSON, A. B.; TRACZ, D. M.; DORE, K.; IRWIN, R.; NG, L. K.; GILMOUR, M. W.; CANADIAN INTEGRATED PROGRAM FOR ANTIMICROBIAL RESISTANCE SURVEILLANCE COLLABORATIVE. Genetic characterization of clinical and agri-food isolates of multi drug resistant *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from Canada. **BMC Microbiology**, v. 8, p. 89, 2008.
- ASENSI, M. D; SOLARI, C. A.; HOFER, E. A *Salmonella* Agona outbreak in a pediatric hospital in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 1, p. 1-4, 1994 .
- BARANIAK, A.; FIETT, J.; SULIKOWSKA, A.; HRYNIEWICZ, W.; GNIADKOWSKI, M. Countrywide spread of CTX-M-3 extended-spectrum beta-lactamase-producing microorganisms of the family Enterobacteriaceae in Poland. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 15115-9, 2002.
- BARIE, P. S. Multidrug-resistant organisms and antibiotic management. **Surgical Clinics North America**, v. 92, n. 2, p. 345- 391, 2012.
- BESSA, M. C.; COSTA, M. da; CARDOSO, M. Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos em frigoríficos do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, p. 80-84, 2004.
- BIRBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 7, n. 6, p. 1513-1523, 1979.
- BONNET, R.; DUTOUR, C.; SAMPAIO, J. L.; CHANAL, C.; SIROT, D.; LABIA, R.; DE CHAMPS, C.; SIROT, J. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency

due to substitution Asp-240 Gly. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 8, p. 1936-1942, 2001. →

BONNET, R.; SAMPAIO, J. L.; LABIA, R.; de CHAMPS, C.; SIROT, D.; CHANAL, C; SIROT J. A novel CTX-M β -lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 7, p. 1936-42, 2000.

BOTELHO, L. A.; KRAYCHETE, G. B.; COSTA E SILVA, J. L.; REGIS, D.V.; PICÃO, R. C.; MOREIRA, B. M.; BONELLI, R. R. Widespread distribution of CTX-M and plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Escherichia coli* from Brazilian chicken meat. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 2, p. 249-54, 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/menu++noticias+anos/2010+noticias/venda+de+antibioticos+so+podera+ocorrer+com+retencao+da+receita+na+farmacia>. Acesso em: 05 jan. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. **Análise Epidemiológica dos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil**. 2009. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/surtos_dta_15.pdf>. Acesso em: 3 mar. 2013.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of B-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969-976, 2010.

BUSH, K.; JACOBY, G. **β -lactamases classification and amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant enzymes**. 2016. Disponível em: <<http://www.lahey.org/studies/>>. Acesso em: 3 jan. 2016.

CABRAL, A. B.; MACIEL, M. A. V.; BARROS, J. F.; ANTUNES, M. M.; LOPES, A. C. S. Detection of *bla*_{KPC-2} in *Proteus mirabilis* in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 1, p. 94-95, 2015.

CARATTOLI, A. Plasmids in Gram negatives: molecular typing of resistance plasmids. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, n. 8, p. 654-658, 2011.

CARATTOLI, A. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, 2227-2238, 2009.

CARATTOLI, A.; BERTINI, A.; VILLA, L.; FALBO, V.; HOPKINS, K. L.; THRELFALL, E. J. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. **Journal of Microbiological Methods**, v. 63, p. 219-228, 2005.

CARATTOLI, A.; MIRIAGOU, V.; BERTINI, A.; LOLI, A.; COLINON, C.; VILLA, L.; WHICHARD, J. M.; ROSSOLINI, G. M. Replicon typing of plasmids encoding resistance to newer B-lactams. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, p. 1145-1148, 2006.

CARVALHO-ASSEF, A. P.; PEREIRA, P. S.; ALBANO, R. M.; BERIÃO, G. C.; TAVARES, C. P.; CHAGAS, T. P.; MARQUES, E. A.; TIMM, L. N.; DA SILVA, R. C.; FALCI, D. R.; ASENSI, M. D. Detection of NDM-1-, CTX-M-15-, and qnrB4-producing *Enterobacter hormaechei* isolates in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 4, p. 2475-2476, 2014.

CASELLA, T.; RODRÍGUEZ, M. M.; TAKAHASHI, J. T.; GHIGLIONE, B.; DROPA, M.; ASSUNÇÃO, E.; NOGUEIRA, M.L.; LINCOPAN, N.; GUTKIND, G.; NOGUEIRA M. C. Detection of *bla*_{CTX-M-type} genes in complex class 1 integrons carried by *Enterobacteriaceae* isolated from retail chicken meat in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 197, p. 88-91, 2015.

CENTER FOR DISEASE CONTROL (CDC). **Surveillance for foodborne disease outbreaks-United States**. 2007. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 2007. Available from: <http://www.cdc.gov/outbreaknet/surveillance_data.html>. Acesso em: 12 out. 2010.

CERGOLE-NOVELLA, M. C.; GUTH, B. E.; CASTANHEIRA, M.; CARMO, M. S.; PIGNATARI, A. C. First description of *bla*_{CTX-M-14} and *bla*_{CTX-M-15}-producing *Escherichia coli* isolates in Brazil. **Microbial Drug and Resistance**, v. 16, n. 3, p. 177-184, 2010.

CHAPMAN, P. A. ; ELLIN, M.; ASHTON, R.; SHAFIQUE, W. Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *Escherichia coli* O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on naturally contaminated rae meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 68, p. 11-20, 2001.

CHENG K, CHUI H, DOMISH L, HERNANDEZ D, WANG G. Recent development of mass spectrometry and proteomics applications in identification and typing of bacteria. **Proteomics Clinical Applications**, In press, 2016.

CLERMONT, O. ; LAVOLLAY, M.; VIMONT, S.; DESCHAMPS, C.; FORESTIER, C.; BRANGER, C.; DENAMUR, E.; ARLET G. The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 5, p. 1024-1028, 2008.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 4555-4558, 2000.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **VETO1-S2**: performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacterial from animals. Wayne, PA: CLSI, 2013.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M100-S24**: performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 24. ed. CLSI, Wayne, PA: CLSI, 2014.

CORKILL, J. E.; CUEVAS, L. E.; GURGEL, R. Q.; GREENSILL, J.; HART, C. A. SHV-27, a novel cefotaxime-hydrolysing β -lactamase, identified in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a Brazilian hospital. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, p. 463-465, 2001.

CROXATTO, A.; PROD'HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS Microbiology Review**, v. 36, n. 2, p. 380-407, 2012.

DA SILVA, G. J.; MENDONÇA, N. Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*. **Virulence**, v. 3, n. 1, p. 18-28, 2012.

DAHMEN, S.; HAENNI, M.; CHÂTRE, P.; MADEC, J. Y. Characterization of *bla*_{CTX-M} IncFII plasmids and clones of *Escherichia coli* from pets in France. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 12, p. 2797-801, 2013.

DHANJI, H. Variation in the genetic environments of *bla*_{CTX-M-15} in *Escherichia coli* from the faeces of travellers returning to the United Kingdom. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 5, p. 1005-1012, 2011.

DONATI, V.; FELTRIN, F.; HENDRIKSEN, R. S.; SVENDSEN, C. A.; CORDARO, G.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, A.; LORENZETTI, S.; LORENZETTI, R.; BATTISTI, A.; FRANCO, A. Extended-spectrum-beta-lactamases, AmpC beta-lactamases and plasmid mediated quinolone resistance in *Klebsiella* spp. from companion animals in Italy. **PLoS One**, v. 4, n. 93, p. e90564, 2014.

DROPA, M.; BALSALOBRE, L. C.; LINCOPAN, N.; MAMIZUKA, E. M.; CASSETTARI, V. C.; MATTÉ, G. R.; MATTÉ, M. H. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carrying the novel extended-spectrum beta-lactamase gene variants *bla*_{SHV-40}, *bla*_{TEM-116} and the class 1

integron-associated *bla*_{GES-7} in Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 16, n. 6, p. 630-632, 2010.

DROPA, M.; BALSALOBRE, L. C.; LINCOPAN, N.; MAMIZUKA, E. M.; MURAKAMI, T.; CASSETTARI, V. C.; FRANCO, F.; GUIDA, S. M.; BALABAKIS, A. J.; PASSADORE, L. F.; SANTOS, S. R.; MATTÉ, G. R.; MATTÉ, M. H. Extended-spectrum beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* isolated in a public hospital in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 4, p. 203-209, 2009.

FERNANDES, S. A.; PATERSON, D. L.; GHILARDI-RODRIGUES, A. C.; ADAMS-HADUCH, J. M.; TAVECHIO, A. T.; DOI, Y. CTX-M-2- producing *Salmonella* Typhimurium isolated from pediatric patients and poultry in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 15, n. 4, p. 317-321, 2009.

ANUÁRIO DA PECUÁRIA BRASILEIRA - ANUALPEC, 2007.. São Paulo: FNP Consultoria e comércio. 2006. 868 p.

FONSECA, E. L.; MYKYTCZUK, O. L.; ASENSI, M. D.; REIS, E. M.; FERRAZ, L. R.; PAULA, F. L.; NG, L. K.; RODRIGUES, D. P. Clonality and antimicrobial resistance genes profiles of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Infantis isolates from four public hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 2767-2772, 2006.

FRANCIA, M. V.; VARSAKI, A.; GARCILLAN-BARCIA, M. P.; LATORRE, A.; DRAINAS, A.; DE LA CRUZ, F. A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. **FEMS Microbiology Reviews**. **28**:79–100, 2004.

GARCIA-ALVAREZ, L.; DAWSON, S.; COOKSON, B.; HAWKEY, P. Working across the veterinary and human health sectors. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. i37-i49, 2012. Supplement, 1.

GILBERT, N. Rules tighten on use of antibiotics on farms: clampdown aims to stop the spread of drug-resistant microbes. **Nature**, v. 481, n. 7380, p. 125, 2012.

HUMENIUK, C.; ARLET, G.; GAUTIER, V.; GRIMONT, P.; LABIA, R.; PHILIPPON, A. β -lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 9, p. 3045-3049, 2002.

JACOBY, G. A. Mechanisms of resistance to quinolones. **Clinical Infectious Diseases**, v. 15, n. 41, p. 120-126, 2005. Supplement, 2.

JEONG, H. S.; BAE, I. K.; SHIN, J. H.; JUNG, H. J.; KIM, S. H.; LEE, J. Y.; OH, S. H.; KIM, H. R.; CHANG, C. L.; KHO, W. G.; LEE, J. N. Prevalence of Plasmid-Mediated quinolone resistance and its association with Extended-spectrum beta-lactamase and AmpC in *Enterobacteriaceae*. **Korean Journal of Laboratory Medicine**, v. 31, p. 257-64, 2011.

KIFFER, C.; HSIUNG, A.; OPLUSTIL, C.; SAMPAIO, J.; SAKAGAMI, E.; TURNER, P.; MENDES, C.; MYSTIC BRAZIL GROUP. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC Program Brazil 2003. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n.3, p. 216-24, 2005.

LEE, C. S.; VASOO, S.; HU, F.; PATEL, R.; DOI Y. *Klebsiella pneumoniae* ST147 coproducing NDM-7 carbapenemase and RmtF 16S rRNA methyltransferase in Minnesota. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 11, p. 4109-10, 2014.

LEE, J.; OH, C. E.; CHOI, E. H.; LEE, H. J. The impact of the increased use of piperacillin/tazobactam on the selection of antibiotic resistance among invasive *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 8, p. e638-43, 2013.

LÓPEZ-CERERO L, EGEA, P.; SERRANO, L.; NAVARRO, D.; MORA, A.; BLANCO, J.; DOI, Y.; PATERSON, D. L.; RODRÍGUEZ-BAÑO, J.; PASCUAL, A. Characterisation of clinical and food animal *Escherichia coli* isolates producing CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamase belonging to ST410 phylogroup A. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 37, p. 365-367, 2011.

LUTZ, E. A.; MCCARTY, M. J.; MOLLENKOPF, D. F.; FUNK, J. A.; GEBREYES, W. A.; WITTUM, T. E. Ceftiofur use in finishing swine barns and the recovery of fecal *Escherichia coli* or *Salmonella* spp. resistant to ceftriaxone. **Foodborne Pathogens Diseases**, v. 8, p. 1229-1234, 2011.

MAMMERI, H.; GUILLON, H.; EB, F.; NORDMANN P. Phenotypic and biochemical comparison of the carbapenem-hydrolyzing activities of five plasmid-borne AmpC β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 11, p. 4556-4560, 2010.

MARCADÉ, G.; DESCHAMPS, C.; BOYD, A.; GAUTIER, V.; PICARD, B.; BRANGER, C.; DENAMUR, E.; ARLET, G. Replicon typing of plasmids in *Escherichia coli* producing extended-spectrum B-lactamases. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 63, p. s67-71, 2009.

MARRA, A. R.; PEREIRA, C. A.; CASTELO, A.; DO CARMO FILHO, J. R.; CAL, R. G.; SADER, H. S.; WEY, S.B. Health and economic outcomes of the detection of *Klebsiella pneumoniae*-produced extended-spectrum β -lactamase (ESBL) in a hospital with high

prevalence of this infection. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 10, n. 1, p. 56-60, 2006.

MARRA, A. R.; WEY, S. B.; CASTELO, A.; GALES, A. C.; CAL, R. G.; FILHO, J. R.; EDMOND, M. B.; PEREIRA, C. A. Nosocomial bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae*: impact of extended- spectrum beta-lactamase (ESBL) production on clinical outcome in a hospital with high ESBL prevalence. **BMC Infectious Diseases**, v. 6, p. 24, 2006.

MARSHALL, B. M.; LEVY, S. B. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 718-733, 2011.

MINARINI, L. A. R.; CAMARGO, I. L.; PITONDO-SILVA, A.; DARINI, A. L. Multilocus sequence typing of uropathogenic ESBL-producing *Escherichia coli* isolated in a Brazilian community. **Current Microbiology**, v. 55, p. 524-529, 2007.

MULVEY, M. R.; SUSKY, E.; MCCRACKEN, M.; MORCK, D. W.; READ, R. R. Similar cefoxitin-resistance plasmids circulating in *Escherichia coli* from human and animal sources. **Veterinary Microbiology**, v. 134, p. 279-87, 2004.

MULVEY, M. R.; BOYD, D. A.; BAKER, L.; MYKYTCZUK, O.; REIS, E. M.; ASENSI, M. D.; RODRIGUES, D. P.; NG, L. K. Characterization of *Salmonella enterica* serovar Agona strain harbouring a class 1 integron containing novel OXA-type B-lactamase (blaOXA-53) and 6'-N-aminoglycoside acetyltransferase genes [acc(6)-130]. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 354-359, 2004.

NIELSEN, J. B.; SKOV, M. N.; JØRGENSEN, R. L.; HELTBERG, O.; HANSEN, D. S.; SCHØNNING, K. Identification of CTX-M15-, SHV-28-producing *Klebsiella pneumoniae* ST15 as an epidemic clone in the Copenhagen area using a semi-automated Rep-PCR typing assay. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 30, n. 6, p. 773-778, 2011.

NORDSTROM, L.; LIU, C. M.; PRICE, L. B. Foodborne urinary tract infections: a new paradigm for antimicrobial-resistant foodborne illness. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. 29, p. 1-6, 2013.

NOVAIS, A.; CANTÓN, R.; MOREIRA, R.; PEIXE, L.; BAQUERO, F.; COQUE, T. M. Emergence and dissemination of *Enterobacteriaceae* isolates producing CTX-M-1-like enzymes in Spain are associated with IncFII (CTX-M-15) and broad-host-range (CTX-M-1, -3, and 32) plasmids. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 796-799, 2007.

NOVICK, R. P. Plasmid incompatibility. **Microbiological Reviews**, v. 51, p. 381-395, 1987.

OGBOLU, D. O.; DAINI, O. A.; OGUNLEDUN, A.; TERRY ALLI, O. A.; WEBBER, M. A. Dissemination of IncF plasmids carrying beta-lactamase genes in Gram-negative bacteria from Nigerian hospitals. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 7, n. 5, p. 382-90, 2013.

INTERNATIONAL ANIMAL HEALTH CODE (OIE). OIE list of antimicrobials of veterinary importance. Disponível em: http://web.oie.int/downld/Antimicrobials/OIE_list_antimicrobials.pdf Acesso em: 20 dez. 2015.

OLAITAN, A. O.; MORAND, S.; ROLAIN, J. M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 26, n. 5, p. 643, 2014.

OLIVEIRA, S.; MOURA, R. A.; SILVA, K. C.; PAVEZ, M.; MCCULLOCH, J. A.; DROPA, M.; MATTÉ, M. H.; MAMIZUKA, E. M.; SATO, M. I.; PESTANA DE CASTRO, A. F.; LINCOPAN N. Isolation of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains belonging to the high-risk multiresistant clonal complex 11 (ST437 and ST340) in urban rivers. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 3, p. 849-852, 2014.

PARTRIDGE, S. R.; ZONG, Z.; IREDELL, J. R. Recombination in IS26 and Tn2 in the evolution of multiresistance regions carrying *bla*_{CTX-M-15} on conjugative IncF plasmids from *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 4971-4978, 2011.

PAVEZ, M.; NEVES, P.; DROPA, M.; MATTÉ, M. H.; GRINBAUM, R. S.; ELMOR DE ARAÚJO, M. R.; MAMIZUKA, E. M.; LINCOPAN, N. Emergence of carbapenem-resistant *Escherichia coli* producing CMY-2- type AmpC beta-lactamase in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, p. 1590-1592, 2008.

PEIRANO, G.; ASENSI, M. D.; PITONDO-SILVA, A.; PITOUT, J. D. Molecular characteristics of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from Rio de Janeiro, Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 7, p. 1039-43, 2011.

PEIRANO, G.; AGERSØ, Y.; AARESTRUP, F. M.; DOS REIS, E. M.; DOS PRAZERES RODRIGUES, D. Occurrence of integrons and antimicrobial resistance genes among *Salmonella enterica* from Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, p. 305-309, 2006.

PEIRANO, G.; SEKI, L. M.; VAL PASSOS, V. L.; PINTO, M. C.; GUERRA, L. R.; ASENSI, M. D. Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 2, p.265-268, 2009.

PHILLIPS, I.; CASEWELL, M.; COX, T.; DE GROOT, B.; FRIIS, C.; JONES, R.; NIGHTINGALE, C.; PRESTON, R.; WADDELL, J. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 28–52, 2004.

POIREL, L.; KÄMPFER, P.; NORDMANN, P. Chromosome-encoded Ambler class A β -lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 12, p. 4038-4040, 2002.

REGITANO, J. B.; LEAL, R. M. P. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 34, p. 601-616, 2010.

ROCHA, L. K.; DOS SANTOS NETO, R. L.; DA COSTA GUIMARÃES, A. C.; ALMEIDA, A. C.; VILELA, M. A.; DE MORAIS, M. M. Plasmid-mediated qnrA1 in *Klebsiella pneumoniae* ST147 in Recife, Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 26, p. 49-50, 2014.

RODRIGUES, C.; MACHADO, E.; RAMOS, H.; PEIXE, L.; NOVAIS, Â. Expansion of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* in hospitalized patients: a successful story of international clones (ST15, ST147, ST336) and epidemic plasmids (IncR, IncFIK). **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 8, p. 1100-1108, 2014.

ROSSI, F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. **Clinical infectious diseases**, v. 52, n. 9, p. 1138-43, 2011.

SADER, H. S.; GALES, A. C.; PFALLER, M. A.; MENDES, R. E.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; JONES, R. N. Pathogen Frequency and Resistance Patterns in Brazilian Hospitals: Summary of Results from Three Years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 5, n. 4, p. 200-14, 2001.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual.**, 3rd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SEKI, L. M.; PEREIRA, P. S.; DE SOUZA CONCEIÇÃO, M.; SOUZA, M. J.; MARQUES, E. A.; CARBALLIDO, J. M.; DE CARVALHO, M. E.; ASSEF, A. P.; ASENSI, M. D. Molecular epidemiology of CTX-M producing *Enterobacteriaceae* isolated from bloodstream

infections in Rio de Janeiro, Brazil: emergence of CTX-M-15. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 6, p. 640-646, 2013.

SILVA, K. C.; KNÖBL, T.; MORENO, A. M. Antimicrobial resistance in veterinary medicine: mechanisms and bacterial agents with the greatest impact on human health, **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, n. 3, p. 171-183, 2013.

SILVA, K. C.; LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, p. 91-98, 2012.

SILVA, K. C. 30 de janeiro de 2016.

SILVA, K. C.; MORENO, M. 30 de janeiro de 2016.

SYRMIS, M. W. ; O'CARROLL, M.R.; SLOOTS, T. P.; COULTER, C.; WAINWRIGHT, C.E.; BELL, S. C.; NISSEN, M. D. Rapid genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolates harboured by adult and paediatric patients with cystic fibrosis using repetitive-element-based PCR assays. **J Med. Microbiol.** 53: 1089-1096, 2004.

TIMOFTE, D.; MACIUCA, I. E.; EVANS, N. J.; WILLIAMS, H.; WATTRET, A.; FICK, J. C.; WILLIAMS, N. J. Detection and molecular characterization of *Escherichia coli* CTX-M-15 and *Klebsiella pneumoniae* SHV-12 β -lactamases from bovine mastitis isolates in the United Kingdom. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, p. 789-794, 2014.

TOLLENTINO, F. M.; POLOTTO, M.; NOGUEIRA, M. L.; LINCOPAN, N.; NEVES, P.; MAMIZUKA, E. M.; REMELI, G. A.; DE ALMEIDA, M. T.; RÚBIO, F. G.; NOGUEIRA, M. C. High prevalence of *bla*_{CTX-M} extended spectrum beta-lactamase genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a tertiary care hospital: first report of *bla*_{SHV-12}, *bla*_{SHV-31}, *bla*_{SHV-38}, and *bla*_{CTX-M-15} in Brazil. **Microbial Drug and Resistance**, v. 17, n. 1, p. 7-16, 2011.

UNION OF CONCERNED SCIENTISTS (UCS). **Hogging it**: Estimates of antimicrobial abuse in livestock. Disponível em: <http://www.ucsusa.org/punlications/>. Acesso em: 20 set. 2011.

VAN AMSON, G.; HARACEMIV, S. M. C.; MASSON, M. L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/ surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no estado do Paraná Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 6, p. 1139-1145, 2006 .

VAZ, C. S.; STRECK, A. F.; MICHAEL, G. B.; MARKS, F. S.; RODRIGUES, D. P.; DOS REIS, E. M.; CARDOSO, M. R.; CANAL, C. W. Antimicrobial resistance and subtyping of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Enteritidis from human outbreaks and poultry in southern Brazil. **Poultry Science**, v. 89, p. 1530-1536, 2010.

VERAS, D. L.; ALVES, L. C.; BRAYNER, F. A.; GUEDES, D. R.; MACIEL, M. A.; ROCHA, C. R.; DE SOUZA LOPES, A. C. Prevalence of the blaSHV gene in *Klebsiella pneumoniae* isolates obtained from hospital and community infections and from the microbiota of healthy individuals in Recife, Brazil. **Current Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1610-1616, 2011.

VILLA, L.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, A.; FORTINI, D.; CARATTOLI, A. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 12, p. 2518-2529, 2010.

VILLEGAS, M. V.; BLANCO, M. G.; SIFUENTES-OSORNIO, J.; ROSSI, F. Increasing prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase among Gram-negative *bacilli* in Latin America: 2008 update from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 34-39, 2011.

WARREN, R. E.; ENSOR, V. M.; O'NEILL, P.; BUTLER, V.; TAYLOR, J.; NYE, K.; HARVEY, M.; LIVERMORE, D. M.; WOODFORD, N.; HAWKEY, P. M. Chicken meat as a potential source of quinolone-resistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in the UK. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, p. 504-508, 2008.

WELDHAGEN, G. F. Integrons and beta-lactamases- a novel perspective on resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 23, n.6, p. 556-562, 2004.

WORLD HEALTHY ORGANIZATION (WHO). **Critically Important antimicrobials for human medicine**: categorization for the development of risk management strategies to contain antimicrobial resistance due to non-human antimicrobial use. Report of the second WHO Expert Meeting Copenhagen, 2007. Disponível em: www.who.int/foodborne_disease/resistance/antimicrobials_human.pdf. Acesso em: 20 dez. 2015.

YONG, D.; TOLEMAN, M. A.; GISKE, C. G.; CHO, H. S.; SUNDMAN, K.; LEE, K.; WALSH, T. R. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5046-5054, 2009.